



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Naturales y Museo.

TESIS DOCTORAL

**Estudio de la expresión de mucinas epiteliales, de
carbohidratos asociados y de Romboide 2 (Rhbdd2) en
ratas adultas y embrionarias.**

**Lic. Valeria Alejandra Ferretti.
2013**

**Directora: Prof. Dra. María Virginia Croce.
Co-Director: Prof. Dr. Claudio Gustavo Barbeito.**

*A mi papá, Osmar,
a mi mamá, Sonia,
a mi compañero de vida, Elías,
y a mi hija, Lola.*

Mi agradecimiento,

En primer lugar quiero agradecer a la Universidad Nacional de La Plata, porque me brindó la posibilidad de tener una formación universitaria de excelencia y de acceso gratuito.

A la CICPBA y al CONICET, por otorgarme una beca, que me permitió dedicarme de forma exclusiva a mi trabajo doctoral.

A las autoridades de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata por brindarme el lugar de trabajo.

A la Prof. Dra. Amada Segal-Eiras por brindarme el Centro de Investigaciones Inmunológicas Básicas y Aplicadas (Facultad de Ciencias Médicas, UNLP) para la realización de esta tesis.

A la Prof. Dra. María Virginia Croce por haberme iniciado en la investigación científica y por la dirección de esta tesis doctoral.

Al Prof. Dr. Claudio Gustavo Barbeito por su co-dirección, su asesoramiento, su constante estímulo, su desinteresada colaboración y su apoyo permanente.

A mis compañeros actuales: Daniel, Martín R., Romina, y a los que ya no están: Andrea, Mani, Agus, Emilia. Quiero agradecer especialmente a Martín Abba, por enseñarme todo lo vinculado al estudio de muestras de ARN, a Ezequiel, por ayudarme en la confección de los mapas de calor y a Mari, por ser, además de una excelente compañera, una gran amiga.

A la Cátedra de Histología y Embriología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP por brindarme un segundo lugar de trabajo. Quiero agradecer especialmente a Rubén Mario, por enseñarme las técnicas histológicas y por su gran colaboración en la obtención de cortes histológicos.

Al Prof. Dr. Pedro González, profesor titular de la Cátedra de Patología B de la Facultad de Ciencias Médicas, UNLP, por su colaboración en la obtención de cortes histológicos y al Señor Técnico Juan Carlos Molina por su desinteresada ayuda.

A la Cátedra de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP por permitirme el empleo de los lectores de placas.

Al Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP) por permitirme el uso varios de sus equipos.

Al Dr. Rodolfo Goya, investigador superior del INIBIOLP, por su contribución en la obtención de muestras tumorales de ratas.

Al Instituto de Genética Veterinaria (IGEDET) por permitirme el empleo del equipo Nanodrop®.

A los profesionales del Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP, que me ayudaron en el cuidado y tratamiento de los animales.

Deseo además expresar mi agradecimiento a mis seres queridos:

Al Dr. Osmar Alberto Ferretti (Q.E.P.D.), mi papá, por ser el ejemplo de vida, de persona y de profesional que quiero ser.

A mi mamá, Sonia, a mis amores, Elías y Lola, por acompañarme incondicionalmente en toda o parte de esta etapa.

A mis tíos, Silvia y Miguel, a mis primos, Lauri, Jere, Lucas y Sole, a mis abuelas, Molly y Agustina y a mis abuelos, Mingo y Tito, que ya no están físicamente conmigo.

Especialmente a mi sobrina y ahijada, Azul, por sacarme siempre una sonrisa.

A mis amigos de toda la vida, Bar, Poli, Guido, Yani, Ale, porque siempre están, en las buenas y en las malas.

A Angelita, Marian R., Juan, Paola, Marian A., Laura, Lourdes, Darío, Mabel, por escucharme tantas veces quejarme y hablar de lo mismo.

ÍNDICE GENERAL.

INTRODUCCIÓN.

1. Consideraciones generales del desarrollo.....	2
1.1. Mecanismos biológicos del desarrollo embrionario.....	3
1.2. Desarrollo prenatal en la rata (<i>Rattus norvegicus</i>).....	6
1.2.1. Desarrollo de los sistemas digestivo y respiratorio.....	7
1.2.2. Desarrollo del sistema urinario.....	11
1.2.3. Desarrollo del tegumento.....	14
1.3. Desarrollo de la glándula mamaria en la rata (<i>Rattus norvegicus</i>).....	16
2. Mucinas (MUCs/Mucs).....	20
2.1. Consideraciones generales.....	20
2.2. Clasificación de mucinas.....	22
2.3. Estructura de las mucinas.....	22
2.3.1. Mucinas secretadas.....	24
2.3.2. Mucinas asociadas a membrana.....	27
2.4. Funciones de las mucinas.....	29
2.5. Expresión de las mucinas.....	32
2.6. Glicosilación de mucinas.....	33
3. Familia de genes romboide (RHBDs/Rhbds).....	37
4. Cáncer.....	38
4.1. Consideraciones generales del cáncer.....	39
4.2. Mecanismos moleculares en el desarrollo del cáncer.....	41
4.3. Rol de las mucinas en los mecanismos biológicos del cáncer y del desarrollo embrionario.....	43
4.4. Rol de los carbohidratos asociados a mucinas en los mecanismos biológicos del cáncer y del desarrollo embrionario.....	46

OBJETIVOS.

1. Objetivo general.....51
2. Objetivos específicos.....51

MATERIALES Y MÉTODOS.

1. Grupo de estudio y muestras.....54
 - 1.1. Animales.....54
 - 1.2. Procesamiento de muestras embrionarias y fetales.....54
 - 1.3. Procesamiento de muestras de neonatos y adultos.....55
2. Anticuerpos utilizados.....56
3. Inmunohistoquímica (IHQ).....57
4. Obtención de homogenados y fracciones subcelulares.....58
5. Medición de la concentración proteica mediante el método de Bradford.....58
6. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE).....59
7. Western blot (WB).....59
8. Dot blot.....60
9. Análisis de la expresión de los transcritos de Muc1, Muc2 y Muc5ac mediante retrotranscripción (RT).....61
 - 9.1. Obtención de ARN a partir de muestras de tejido fresco.....61
 - 9.2. Obtención de ARN a partir de muestras de tejido parafinado.....62
 - 9.3. Electroforesis desnaturizante y control de calidad de ARN.....63
 - 9.4. Síntesis de ADNc mediante RT-PCR.....64
 - 9.5. Medición de la concentración de ADNc.....64
 - 9.6. Cebadores (Primers).....65
 - 9.7. Detección de los productos de amplificación de Muc1, Muc2, Muc5ac y ARN 18S mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....67

10. Análisis estadístico.....	67
10.1. Prueba de Chi Cuadrado de Pearson.....	68
10.2. Coeficiente Gamma (γ) de Goodman y Kruskal y coeficiente de correlación de Kendall.....	68
10.3. Análisis mediante mapas de calor y agrupamientos jerárquicos.....	69
10.4. Análisis factorial.....	69

RESULTADOS.

1. Análisis de la expresión de las mucinas Muc1, Muc2 y Muc5ac, de los antígenos carbohidratos Tn, TF, Le x y sLe x, y de Romboide 2 (Rhbdd2) en tejidos adultos.....	72
1.1. Muc1, Muc2 y Muc5ac.....	72
1.2. Antígenos carbohidratos Tn, TF, Le x y sLe x.....	73
1.3. Romboide 2 (Rhbdd2).....	75
2. Análisis de la expresión de las mucinas Muc1, Muc2 y Muc5ac en tejidos embrionarios.....	77
2.1. Muc1.....	77
2.2. Muc2.....	85
2.3. Muc5ac.....	90
3. Análisis de la expresión y localización de antígenos carbohidratos en tejidos embrionarios.....	97
3.1. Tn.....	97
3.2. TF.....	98
3.3. Le x y sLe x.....	98
4. Análisis de la expresión del gen Rhbdd2 en tejidos embrionarios.....	100
5. Análisis de la expresión de las mucinas Muc1, Muc2 y Muc5ac, en el desarrollo postnatal normal y de tumores asociados a la glándula mamaria.....	103
5.1. Muc1, Muc2 y Muc5ac en el desarrollo postnatal normal de la glándula mamaria.....	103
5.2. Muc1, Muc2 y Muc5ac en muestras neoplásicas asociadas a glándula mamaria.....	106

6. Análisis mediante mapas de calor y agrupamientos jerárquicos, análisis factorial y resumen.....	108
--	-----

DISCUSIÓN.

1. Análisis de la expresión de las mucinas Muc1, Muc2 y Muc5ac, de los antígenos carbohidratos Tn, TF, Le x y sLe x, y de Rhbdd2 en tejidos adultos y embrionarios.....	115
1.1. Muc1.....	115
1.2. Muc2.....	120
1.3. Muc5ac.....	123
1.4. Antígenos carbohidratos.....	127
1.5. Rhbdd2.....	130
2. Análisis de la expresión de las mucinas Muc1, Muc2 y Muc5ac, en el desarrollo postnatal normal de la glándula mamaria y de tumores asociados a la misma.....	134
2.1. Muc1.....	134
2.2. Muc2.....	137
2.3. Muc5ac.....	138
3. Análisis mediante mapas de calor y agrupamientos jerárquicos, análisis factorial y resumen.....	140

CONCLUSIONES.....	142
--------------------------	------------

BIBLIOGRAFÍA.....	144
--------------------------	------------

INTRODUCCIÓN

1. *Consideraciones generales del desarrollo.*

Los organismos multicelulares se originan por un proceso relativamente lento de cambios progresivos que denominamos desarrollo y que comienza a partir de una célula, el cigoto. Las etapas del desarrollo comprendidas entre la fecundación y el nacimiento del individuo constituyen lo que denominamos desarrollo embrionario. Sin embargo, el desarrollo del animal no se detiene con el nacimiento, sino que continúa generalmente incluso luego de la madurez.

Inmediatamente luego de la fecundación se produce la segmentación, caracterizada por una serie de divisiones mitóticas que dan lugar a células pequeñas, denominadas blastómeros. Hacia el final de la segmentación, forman una esfera conocida como blástula (blastocisto en mamíferos). Luego los blastómeros sufren un proceso de reorganización celular que recibe el nombre de gastrulación. En esta etapa se forman las 3 capas germinales: endodermo, mesodermo y ectodermo. Finalmente, las células actúan recíprocamente entre ellas y se organizan para formar los tejidos y órganos del organismo. Esta etapa se denomina organogénesis. En el ectodermo se reconocen tres dominios principales: el ectodermo superficial, la cresta neural¹ y el tubo neural (Figura 1). El endodermo forma el revestimiento interno de los tubos digestivo y respiratorio, con sus órganos asociados, mientras que el mesodermo genera todos los órganos entre la pared del ectodermo y los tejidos endodérmicos. Se reconocen 5 regiones mesodérmicas: cordamesodermo, mesodermo paraxial o somítico, mesodermo intermedio, lámina del mesodermo lateral y mesodermo precordial [Gilbert, 2005] (Figura 2).

¹ cresta neural- las células de la cresta neural se originan en la región más dorsal del tubo neural, en la unión entre el ectodermo epidérmico superficial y el ectodermo neural presuntivo, y se caracterizan por tener la propiedad de migrar lejos de su fuente de origen hacia lugares específicos del embrión.

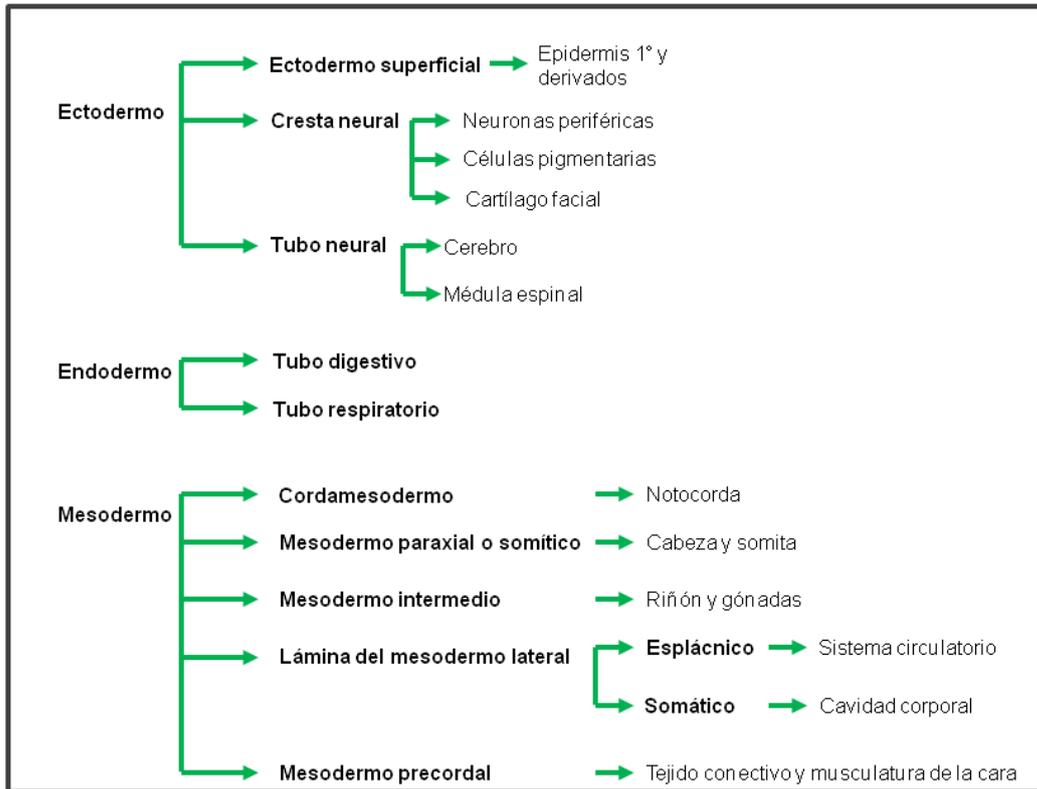


Figura 1. Principales derivados de las capas germinales (Modificado de Gilbert, 2005).

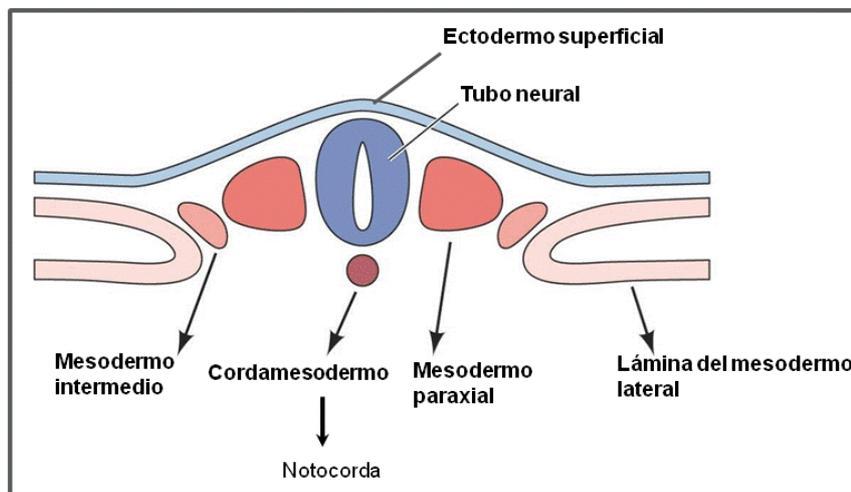


Figura 2. Esquema representativo de las regiones del mesodermo del tronco (Modificado de Gilbert, 2005).

1.1. Mecanismos biológicos del desarrollo embrionario.

En el desarrollo de un organismo multicelular intervienen procesos tales como los mecanismos de interacción inductiva entre las células embrionarias, la diferenciación, la proliferación, la muerte y la migración celular.

En el proceso de inducción intervienen dos componentes de características distintas. Una célula o grupo celular actúa como el inductor, cambiando el comportamiento de otra célula o tejido adyacente, causando modificaciones en su forma, índice mitótico y/o destino celular. El segundo componente es la célula o tejido que está siendo inducido, también denominado competente. Tal coordinación resulta necesaria en la organización precisa de los tejidos que forman los órganos. Las interacciones epitelio-mesenquimáticas constituyen un ejemplo de inducción que involucra la interacción de láminas de células epiteliales con células mesenquimáticas adyacentes. Todos los órganos están formados a partir de un epitelio y un mesénquima asociado, de modo tal que las interacciones epitelio-mesenquimáticas resultan tan importantes en la construcción de los mismos. A modo de ejemplo, podemos citar el caso de la piel, que está constituida por dos tejidos principales: la epidermis (tejido epitelial derivado del ectodermo) y la dermis (tejido mesenquimático derivado del mesodermo).

La señalización entre las células inductoras y el grupo celular competente se transmiten fundamentalmente a través de factores de señalización paracrinos, entre los cuales se encuentran los factores de crecimiento fibroblástico (FGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), los factores de crecimiento transformadores β (TGF- β), las proteínas Hedgehog, los Wnts². Estos factores se unen a receptores ubicados en la membrana de la célula que responde, y se inicia una cascada de interacciones entre proteínas que transmiten una señal a través de una vía desde el receptor de membrana al núcleo, denominada vía de transducción de señal. Se han descubierto varios tipos de vías de transducción de señal importantes en el desarrollo, entre ellas la vía de señalización Wnt

² Wnts- su nombre es una fusión del nombre del gen de *Drosophila wingless* -sin alas- con el nombre de uno de sus homólogos de vertebrados *integrated* -integrado [Sharma, 2013].

Introducción

y las vías de señalización RTK (receptores tirosín-quinasas), entre éstas últimas se incluyen, la vía de las proteínas Ras- MAPK (proteínas quinazas mitógeno-activadas) y la vía de EGFR (receptor del EGF).

Por otro lado, el desarrollo de un tipo celular especializado es denominado diferenciación. En este proceso la célula sufre modificaciones en su expresión génica, para adquirir la morfología y las funciones de un tipo celular específico y diferente al resto de los tipos celulares del organismo [Becker, 2009]. Durante la diferenciación, ciertos genes son expresados mientras que otros son reprimidos. Este proceso está controlado por distintos mecanismos de regulación de la expresión génica de las células, de manera tal que la célula diferenciada expresa determinados genes y adquiere determinadas funciones. Como sucede con otros procesos celulares, la diferenciación celular es promovida por las complejas cascadas de señalización.

Los procesos de proliferación o crecimiento celular involucran tanto un incremento en el número de divisiones mitóticas como un aumento del tamaño de las células. En los primeros estadios del desarrollo, las divisiones celulares son relativamente rápidas, mientras que al avanzar el desarrollo las divisiones se hacen más lentas, pero esta disminución en la velocidad de división no es homogénea en todo el embrión. Algunas poblaciones celulares permanecen estáticas o sin nuevas divisiones, mientras que otras poblaciones siguen siendo dinámicas, entre ellas están las que proliferan de manera acelerada y las que sufren divisiones mitóticas poco frecuentes pero el número de células aumenta gradualmente. La regulación del proceso de proliferación celular resulta de gran importancia en los organismos. Es sabido que determinadas alteraciones en el crecimiento celular pueden tener como consecuencia el posterior desarrollo de ciertas entidades patológicas tales como las neoplásicas, en las que un grupo de células

presenta un crecimiento incontrolado y una división más allá de los límites normales. Asimismo, la muerte celular programada, es un proceso desencadenado también por señales celulares, y constituye un mecanismo biológico importante tanto en el desarrollo embrionario normal como en la remoción de células con daño irreparable en el ADN, capaces de desencadenar enfermedades como el cáncer.

Por otra parte, la formación de un tejido durante el desarrollo embrionario requiere de movimientos celulares sincronizados en una dirección particular y hacia sitios específicos. Estos procesos se conocen con el nombre de migración celular, e involucran una serie de etapas bien integradas que regulan la morfogénesis³ embrionaria y contribuyen a la reparación y regeneración de tejidos durante la vida postnatal [Aman and Piotrowski, 2010]. Los errores en estos procesos tienen consecuencias tales como retraso mental, aterosclerosis y desarrollo de tumores y su posterior metástasis [Ridley et al., 2003].

1.2. Desarrollo prenatal en la rata (*Rattus norvegicus*).

El tiempo de gestación en la rata *Rattus norvegicus* es de alrededor de 21 días. Por convención se utiliza el término “embrión” para referirse al organismo en desarrollo que tiene hasta 16 días de gestación, mientras que a partir de los 17 días en adelante, se emplea el término “feto” [Witschi, 1962; Hill, 2010].

En la tabla 1 se resumen los principales eventos que ocurren en las distintas etapas del desarrollo embrionario de la rata.

³ Morfogénesis- es el proceso biológico que lleva a que un organismo, tejido u órgano pueda desarrollar su forma ordenada.

Introducción

Tabla 1. Esquema simplificado del desarrollo embrionario de la rata.

Días de Gestación	Etapas del desarrollo embrionario
	Segmentación
1	1 célula (en el oviducto)
4	mórula (16 células)
5	blastocisto (en el útero)
	Gastrulación
6	implantación del blastocisto
	Organogénesis
11	comienzan a diferenciarse los órganos a partir de las 3 capas embrionarias: endodermo, mesodermo y ectodermo.
	Etapa Fetal
17	Se produce el crecimiento de las estructuras formadas en la etapa previa.

A continuación, se comentarán brevemente, los principales eventos del desarrollo prenatal de los sistemas gastrointestinal, respiratorio y urinario, y del tegumento de la rata. Luego, se hará especial mención del desarrollo postnatal de la glándula mamaria.

1.2.1. Desarrollo de los sistemas digestivo y respiratorio.

La mayor parte de los componentes del sistema digestivo se desarrollan a partir del intestino primitivo tubular. Este se forma a partir de la banda endodérmica embrionaria plana, debido al plegamiento lateral del cuerpo embrionario y a la curvatura craneal y caudal del embrión. El intestino primitivo constituye un tubo endodérmico que se divide en 3 segmentos, anterior, medio y posterior (Figura 3).

En el intestino anterior se desarrolla una porción cefálica o faríngea que se extiende desde la cavidad bucal primitiva hasta el divertículo respiratorio o brote traqueobronquial, y una porción caudal, que se extiende hasta otro brote endodérmico denominado esbozo o divertículo hepático.

Hacia los 12 días de gestación, en el embrión de la rata aparece el divertículo o brote traqueobronquial que da origen al sistema respiratorio (Figura 4) [Monie, 1976; Hoar y Monie, 1981]. En el extremo del brote, se originan un par de yemas bronquiales que acabarán convirtiéndose en los bronquios principales o primarios. A medida que el

divertículo crece hacia la región caudal se separa del intestino primitivo por la aparición de un tabique traqueoesofágico. De esta manera, queda delimitado el esófago, hacia la región dorsal, y la tráquea y los bronquios principales, ventralmente.

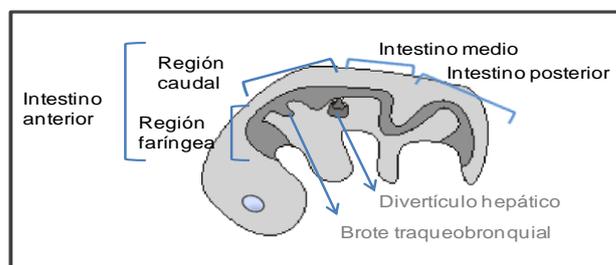


Figura 3. Representación esquemática del intestino primitivo y sus estructuras derivadas en un embrión de mamífero. El intestino primitivo comprende una porción anterior que se extiende desde la cavidad bucal hasta la primera parte del intestino propiamente dicho limitado por el divertículo hepático, un segmento medio que comprende la región media del intestino propiamente dicho y un segmento posterior que se extiende hacia el canal anal (Esquema realizado por Ferretti V., inspirado en Monie, 1976 y Hoar y Monie, 1981).

A los 14 días, los bronquios primarios presentan brotes secundarios, mientras que a los 16 días aparece un árbol bronquial más ramificado y los pulmones están vascularizados y lobulados. La diferenciación de los alvéolos respiratorios se inicia a partir de los 18 días de desarrollo [Qi et al., 2000], aunque la mayor parte de los alvéolos se forman después del nacimiento.

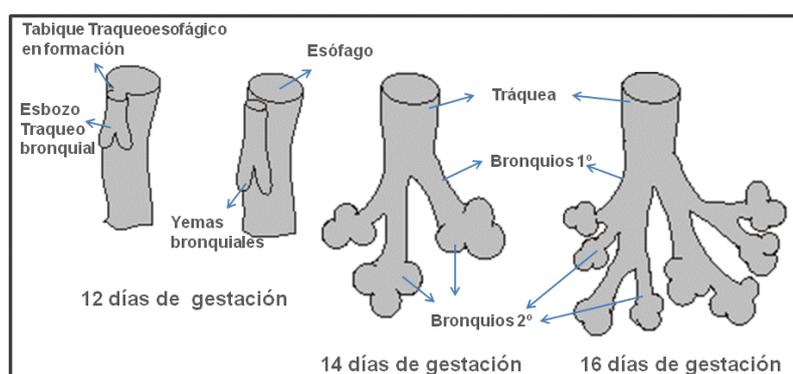


Figura 4. Representación esquemática del desarrollo del tracto respiratorio a lo largo de la embriogénesis de la rata - a los 12 días de gestación, comienza a formarse el tabique traqueoesofágico que llevará a la separación de esófago y tráquea; - a los 14 días de gestación, se diferencian bronquios primarios (1º) y secundarios (2º), - y a los 16 días de gestación, aparece un árbol bronquial más ramificado (Dibujo realizado por Ferretti V., basado en Hoar, 1976 y Gómez Dumm, 2003)

El segmento dorsal del intestino anterior, que constituye el esófago primordial, es muy

Introducción

corto al principio pero luego sufre un notable alargamiento y una serie de cambios importantes de diferenciación tisular.

La porción caudal del intestino anterior se dilata gradualmente hacia los 12 días de desarrollo para dar origen al estómago [Hoar, 1976] (Figura 5). Al principio esta estructura presenta un borde cóncavo hacia la región ventral y otro convexo hacia la región dorsal. El estómago adquiere su configuración adulta debido al movimiento de rotación de 90° sobre su eje longitudinal, de modo que el margen convexo dorsal se dirige hacia la izquierda y el cóncavo ventral hacia la derecha, formando las curvaturas mayor y menor del órgano, respectivamente. A nivel histológico, aparecen las rugosidades y fositas gástricas, y más tarde, durante la vida fetal se diferencian los distintos tipos celulares.

En mamíferos, el intestino propiamente dicho comprende una porción cefálica, derivada del intestino primitivo anterior y unida al estómago, y otra caudal, constituida por los segmentos medio y posterior del intestino primitivo. En el límite de las porciones anterior y media se originan los esbozos del hígado y del páncreas.

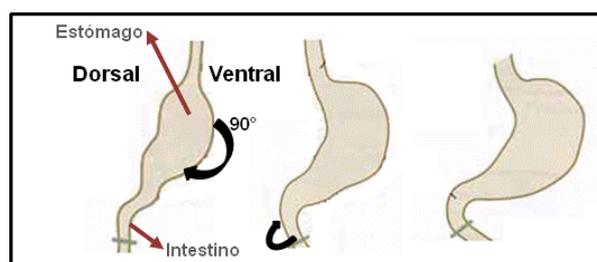


Figura 5. Representación esquemática de los movimientos a lo largo del tubo digestivo que llevan a la configuración del estómago adulto en mamíferos (Modificado de Carlson, 2005).

Los movimientos de rotación que sufre el intestino llevan a la configuración adulta del mismo y se deben en gran parte a que su longitud aumenta más que la del embrión.

El epitelio intestinal atraviesa una etapa de proliferación en la que la luz queda ocluida transitoriamente. Luego aparecen luces secundarias pequeñas en un epitelio

pluriestratificado que contribuirán a la formación de las vellosidades intestinales. Finalmente, el epitelio deja de ser estratificado para convertirse en cilíndrico simple.

Las principales actividades digestivas no aparecen hasta después del nacimiento cuando comienza la ingesta.

Hacia los 11 días de gestación se origina el divertículo hepático como un engrosamiento endodérmico que crece ventralmente manteniendo la conexión con la región del intestino que dará origen al duodeno [Hoar y Monie, 1981]. A medida que crece se desarrollan cordones hepáticos separados por los sinusoides del hígado. Entre éstos aparecen nidos celulares hematopoyéticos indicando la función hematopoyética del órgano durante la vida prenatal. Hacia los 12.5 días del desarrollo nace desde el intestino primitivo un brote pancreático dorsal, a la altura del divertículo hepático (Figura 6). Desde la extremidad proximal del conducto hepático surge el brote pancreático ventral. A los 13 días de gestación, los brotes dorsal y ventral entran en contacto fundamentalmente debido al crecimiento diferencial de la pared del duodeno y se fusionan manteniendo la comunicación con el intestino. Entre los 13 y 14 días de gestación se produce la elongación y ramificación de las yemas epiteliales pancreáticas, más tarde, se evidencian las estructuras tubulares en formación (15-16 días de gestación), y a partir de los 17 días de desarrollo, comienzan a desarrollarse los acinos pancreáticos [Parsa et al., 1969; Pictet et al., 1972; Hisaoka et al., 1993].

Hacia el día 14 del desarrollo de la rata, surgen los esbozos de las glándulas salivales como invaginaciones del epitelio oral que reviste la cavidad bucal, hacia el mesénquima subyacente, en forma de cordones celulares indiferenciados [Cutler and Chaudhry, 1973; Crema et al., 2008]. Durante los siguientes 4-5 días de gestación se producen repetidas ramificaciones, y a los 20 días de desarrollo, se diferencian los conductos excretores y los

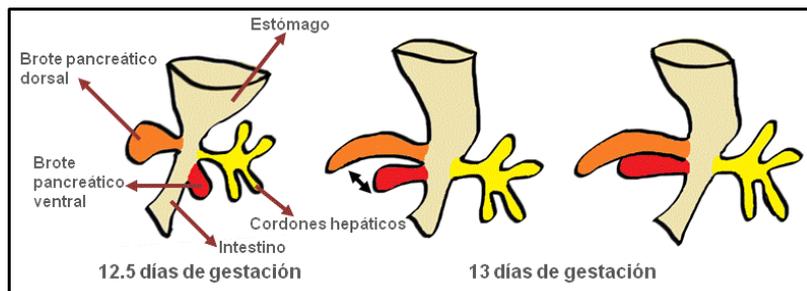


Figura 6. Representación esquemática del desarrollo del páncreas a lo largo de la embriogénesis de la rata - a los 12.5 días de gestación, aparecen los brotes pancreáticos dorsal y ventral; - a los 13 días de gestación, los brotes dorsal y ventral entran en contacto y se fusionan, manteniendo su conexión con el intestino (Esquema realizado por Ferretti V., inspirado en Hoar, 1976)

acinos secretores en los extremos distales de las bifurcaciones. Sin embargo, el desarrollo completo de estos órganos no se alcanza hasta después del nacimiento. En el ratón, esto ocurre a los 4 meses de vida [Srinivasan y Chang, 1979].

1.2.2. Desarrollo del sistema urinario.

El sistema urinario se halla íntimamente vinculado al sistema genital durante el desarrollo, debido a las interacciones inductivas que ocurren entre ellos. Ambos sistemas se forman dentro del mesodermo intermedio. El desarrollo del sistema urinario en mamíferos comprende 3 etapas sucesivas que corresponden a 3 sistemas renales diferentes: el pronefros, el mesonefros y el metanefros. El primero es rudimentario y no llega a funcionar; rápidamente involuciona y desaparece casi totalmente. Se discute si contribuye a la formación del segundo. El mesonefros funciona durante un tiempo breve, mientras que el tercero y último persiste como un riñón funcional y definitivo.

Hacia los 12 días de gestación de la rata, se origina el conducto pronefrico en el mesodermo intermedio, las células de este conducto migran caudalmente hasta la cloaca y la región anterior del conducto induce al mesénquima adyacente a formar los túbulos del pronefros [Hoar, 1976] (Figura 7). En mamíferos, los túbulos pronefricos y la porción anterior del conducto pronefrico degeneran, pero persisten las porciones más caudales

del conducto pronefrico, a menudo referido como el conducto néfrico o de Wolff. A medida que degeneran los túbulos pronefricos, la porción media del conducto néfrico induce un nuevo grupo de túbulos renales en el mesénquima adyacente, los túbulos mesonéfricos que constituyen el riñón mesonéfrico [Sainio y Raatikainen-Ahokas, 1999]. En algunas especies de mamíferos, el mesonefros funciona por poco tiempo en la filtración de orina, pero en ratas y ratones, no se encuentra como un riñón funcional. Sin embargo, el mesonefros proporciona importantes funciones de desarrollo durante su breve existencia. Por ejemplo, en los mamíferos machos, algunos túbulos mesonéfricos persisten para llegar a ser los conductillos eferentes de los testículos que transportan los espermatozoides mientras que el conducto mesonéfrico da origen al epidídimo y al conducto deferente (Figura 8).

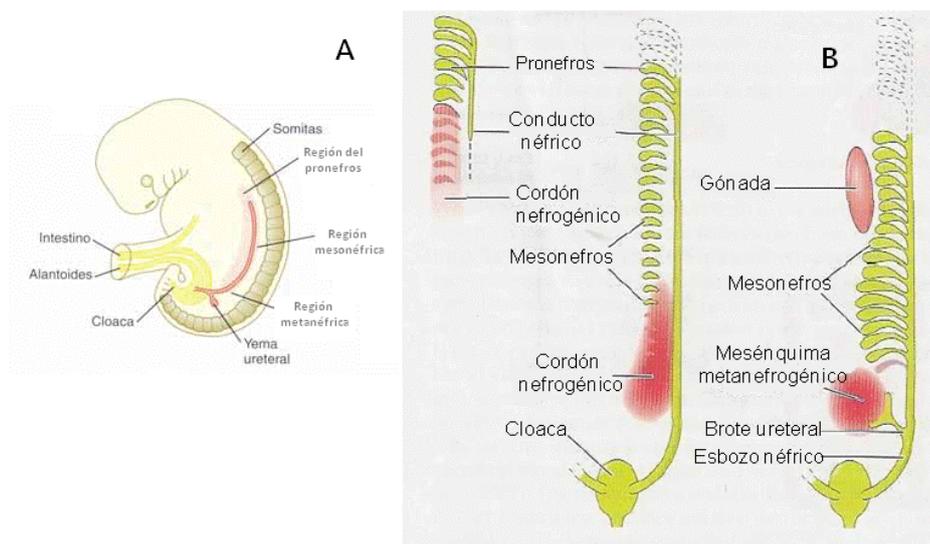


Figura 7. Primeras etapas en el establecimiento del sistema urinario. A- Subdivisión del mesodermo intermedio en las áreas que van a formar el pronefros, el mesonefros y el metanefros (Modificado de Carlson, 2005). B- Esquema general del desarrollo en el riñón de un vertebrado (Gilbert, 2005). Los túbulos originales, que constituyen el pronefros, son inducidos desde el mesénquima nefrogénico por el conducto pronefrico a medida que éste migra caudalmente. A medida que el pronefros degenera, se forman los túbulos mesonéfricos. Finalmente, el metanefros es inducido por el esbozo ureteral que se ramifica desde el conducto néfrico.

El riñón definitivo, el metanefros, es generado a partir de los 13.5 días de gestación de la rata [Hoar, 1976], por algunos de los mismos componentes que los tipos de riñones

Introducción

transitorios más tempranos (Figura 8). Se piensa que se origina mediante un complejo grupo de interacciones entre los componentes epitelial y mesenquimático del mesodermo intermedio. En las primeras etapas se forma un mesénquima metanefrogénico localizado en las regiones del mesodermo intermedio más posteriores, inducido por el brote ureteral que se ramifica desde cada uno del par de conductos néfricos o de Wolff. Los brotes ureterales finalmente se separan de los conductos néfricos y dan lugar a los uréteres que comunican a los riñones con la vejiga. Cuando los brotes ureterales surgen desde el conducto néfrico, ingresan en el mesénquima metanefrogénico y lo inducen a condensarse alrededor de éstos y a diferenciarse en las nefronas del riñón de mamíferos. Hacia los 16.5 días de desarrollo de la rata, el metanefros se halla encapsulado y su organización interna ya es la de un riñón de vertebrado [Hoar, 1976]. Sin embargo, la función de excreción en el embrión está principalmente a cargo de la placenta.

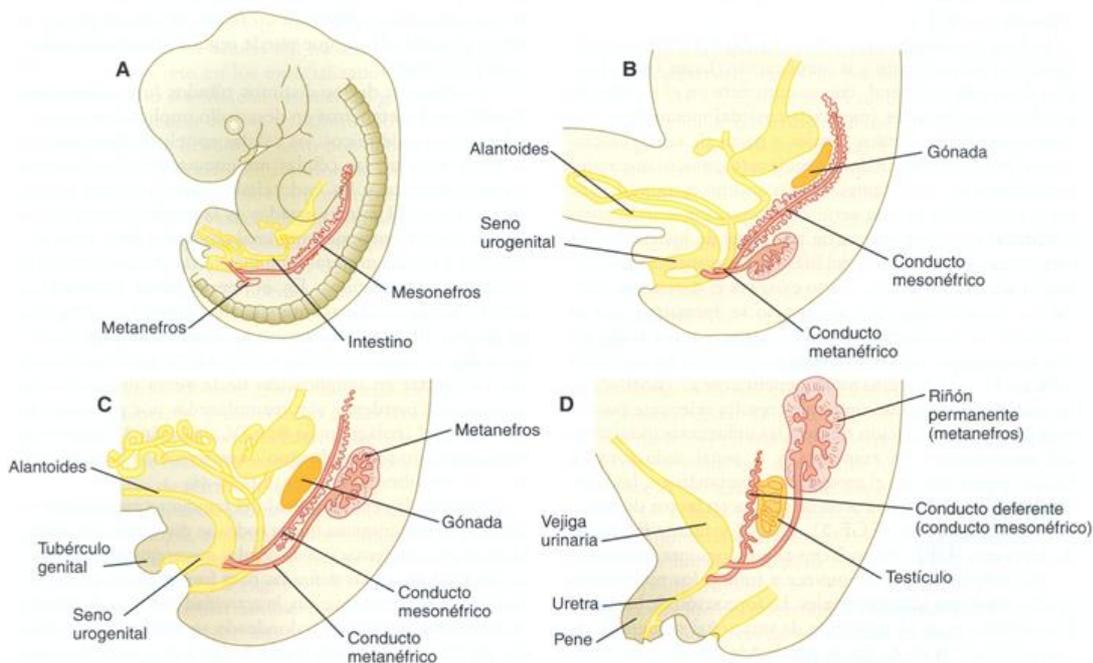


Figura 8. Etapas en la formación del riñón definitivo en mamíferos (Modificado de Carlson, 2005).

1.2.3. Desarrollo del tegumento.

El tegumento presenta un doble origen: la epidermis proviene del ectodermo superficial (con excepción de la cara y el cuello, donde se origina en las crestas neurales), mientras que la dermis subyacente es de origen mesodérmico. Primero se forma una capa de células ectodérmicas que cubren al embrión, la epidermis presuntiva, por debajo de la misma, el mesodermo da origen a las células mesenquimáticas (Figura 9). Rápidamente, la capa de células ectodérmicas se convierte en una estructura de dos capas de células. La capa más externa da origen al peridermo, una cubierta temporal que se desprenderá una vez que se diferencia la capa interna para formar la verdadera epidermis. El peridermo se compone de una capa de células aplanadas, y aparentemente, se relaciona con el intercambio de agua y sales entre el líquido amniótico y la epidermis [Carlson, 2005]. La capa interna, también denominada estrato germinativo, está constituida por células cúbicas que se dividen para dar lugar a otra población de células que forman el estrato espinoso. Estas células a su vez se dividen para producir la capa granulosa, que se caracteriza porque sus células contienen gránulos de queratohialina⁴. Estas células ya no se dividen, sino que se diferencian hacia queratinocitos, las células ricas en queratina. A medida que los queratinocitos envejecen, migran hacia afuera para formar el estrato córneo. Esta capa se compone de células muertas y aplanadas, con el citoplasma lleno de queratina y los núcleos desplazados a un lado de la célula.

En la epidermis de la rata hay una rápida proliferación celular entre los 16 y los 20 días de gestación, período en el que deja de ser un epitelio indiferenciado de 3-5 capas de espesor para transformarse al momento del nacimiento, en un epitelio pluriestratificado

⁴ Gránulos de queratohialina- intervienen en el proceso de queratinización de las células epidérmicas. Se componen principalmente de profilagrina, proteína precursora de la filagrina que interviene en el empaquetamiento de los filamentos de queratina.

Introducción

queratinizado [Green et al., 1984].

La epidermis y la dermis interactúan en sitios específicos para crear una gran variedad de derivados: las glándulas sudoríparas, sebáceas y mamarias en los mamíferos; los apéndices cutáneos, tales como el pelo en los mamíferos, las plumas de las aves y las escamas de las aves y los reptiles.

Los pelos de los mamíferos, son derivados ectodérmicos especializados que se forman como resultado de los estímulos inductores procedentes de la dermis [Carlson, 2005]. En la rata, los primeros esbozos del pelo aparecen hacia los 18 días de gestación [Green et al., 1984]. Se forman agregados de células en la capa basal de la epidermis, que son influenciados por las células fibroblásticas dérmicas subyacentes (Figura 10). Las células epidérmicas basales se alargan, se dividen y hunden en la dermis, formando los gérmenes de los folículos pilosos. Los fibroblastos dérmicos responden a este ingreso de células mediante la formación de un pequeño nódulo, la papila dérmica, por debajo del germen del pelo. Esta papila empuja hacia arriba estimulando a las células madre basales a dividirse más rápidamente y éstas responden produciendo células post-mitóticas que se diferencian para formar el pelo [Hardy, 1992; Miller et al., 1993]. A

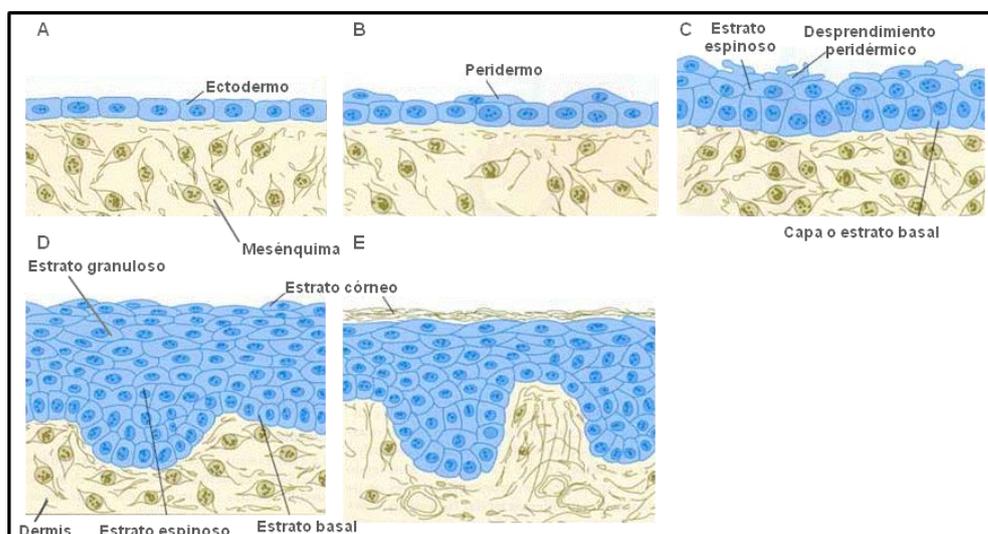


Figura 9. Estadios en la histogénesis de la piel de mamíferos (Modificado de Carlson, 2005).

medida que esto sucede aparecen dos prominencias epiteliales asociadas al folículo piloso en formación (Figura 10). Las células de la prominencia inferior conservan una población de células madre que regenerarán periódicamente el pelo cuando éste sea eliminado [Pinkus y Mehregan, 1981; Cotsarelis et al., 1990] y constituyen el lugar de anclaje del músculo erector del pelo o piloerector. Las células de la prominencia superior forman la glándula sebácea que produce una secreción oleaginosa, el sebo. En ratas y ratones, estas estructuras aparecen durante la primera semana después del nacimiento [Fluhr et al., 2004].

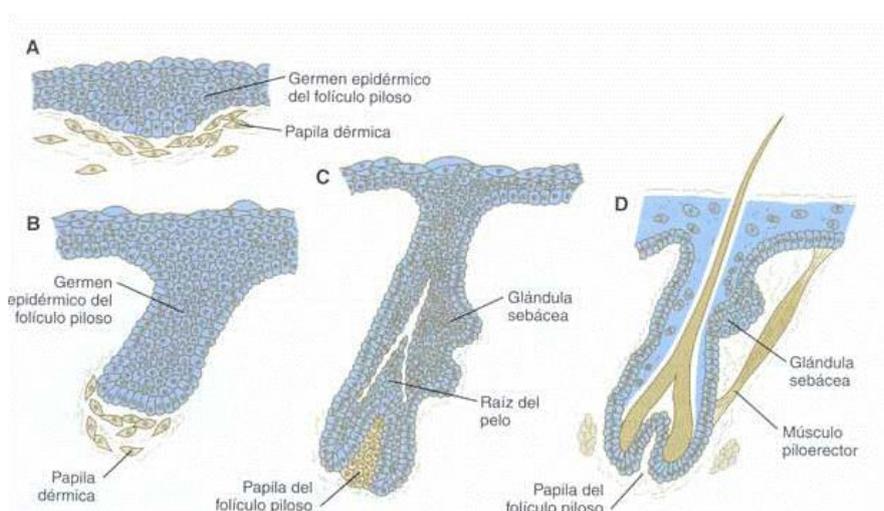


Figura 10. Etapas en el desarrollo del pelo (Carlson, 2005).

1.3. Desarrollo de la glándula mamaria en la rata (*Rattus norvegicus*).

La primera manifestación del desarrollo de la glándula mamaria ocurre durante la vida fetal de la rata pero continúa en la vida adulta, fundamentalmente durante la pubertad y la preñez, que es cuando adquiere funcionalidad [Robinson, 2007].

El desarrollo de la glándula mamaria se produce en 3 etapas reguladas diferencialmente: embrionaria, puberal y adulta [Gjorevski y Nelson, 2011]. Mientras que la fase embrionaria del desarrollo depende de señales de inducción locales entre el epitelio en

Introducción

crecimiento y el mesénquima subyacente, en las fases postnatales juega un rol preponderante la regulación hormonal.

Las glándulas mamarias están organizadas en localizaciones específicas a lo largo de dos líneas simétricas que recorren la superficie ventrolateral del cuerpo en dirección rostro-caudal (Figura 11). En la glándula se distinguen dos componentes: el componente epitelial o parénquima y el mesenquimático o estroma. El parénquima se compone de estructuras epiteliales en las que se distinguen células epiteliales lumbinales, que varían de cúbicas o columnares, en los ductos, a piramidales o aplanadas en los alvéolos, y células mioepiteliales, que se ubican por fuera de las células lumbinales y secretan los componentes de la membrana basal que separa al parénquima del estroma. Por otra parte, el estroma de la glándula está representado por el tejido conectivo que rodea a las estructuras epiteliales, el cual varía en cuanto a composición y densidad según la zona. En el estroma también se hallan células adiposas formando el panículo adiposo [Masso-Welch et al., 2000].

En la mayoría de los mamíferos, el desarrollo embrionario de la glándula comienza con un engrosamiento epidérmico en forma de banda que protruye ligeramente desde la pared del cuerpo (Figura 11 A). A partir de dicha banda se producen una serie de proliferaciones macizas denominadas placodas (1 par en seres humanos, 5 pares en ratones, 6 pares en ratas) que ocupan los sitios de las futuras glándulas. Dichas placodas se invaginan para formar las yemas mamarias. Hacia el final de la vida fetal, éstas originan varias ramificaciones, que a su vez se dividen en túbulos de menor calibre, y desembocan en una depresión en la superficie epitelial, mientras que el mesénquima prolifera por debajo de la epidermis que rodea dicha depresión para formar el pezón.

Este proceso de bifurcación y proliferación de los túbulos continúa hasta la etapa juvenil de la rata [Masso-Welch et al., 2000].

Probablemente la etapa puberal sea la más interesante en cuanto a la morfogénesis mamaria, impulsada por los elevados niveles de hormonas ováricas como los estrógenos.

Al comienzo de la pubertad, definida por el inicio del ciclo estral⁵ en mamíferos no primates, que ocurre entre los 20 y 35 días de vida en la rata [Arata de Bellabarba et al., 1981], los extremos de los conductos rudimentarios proliferan y dan lugar a las yemas terminales (TEBs - *terminal end buds*) (Figura 11 B). Las TEBs alcanzan su máximo número en la pubertad, y luego, se escinden en 3 - 5 yemas alveolares (ABs) [Russo et al., 1989]. Estas estructuras ingresan luego en sucesivas etapas de elongación, bifurcación y ramificación lateral hasta llegar a un árbol epitelial completo [Gjorevski y Nelson, 2011].

En la rata adulta virgen, luego de los 55 días de edad, el número de ramificaciones ductales permanece relativamente constante [Russo I y Russo J, 1996]. Mientras que, durante la preñez se produce una gran proliferación del epitelio glandular mamario, particularmente en las TEBs, las cuales, se escinden para formar ABs que se diferencian en lóbulos secretores. Hacia el final de la preñez, la glándula mamaria se encuentra casi completamente formada por lóbulos densamente empaquetados. Cuando la glándula ingresa en el período de lactancia, se produce un aumento en el tamaño de los lóbulos que se llenan de productos de secreción, fundamentalmente leche.

⁵ El ciclo estral de roedores se repite cada 4-5 días y consiste en los estados: diestro- fase de crecimiento folicular- proestro- fase de maduración folicular y preovulatoria- estro- ovulación y metaestro. En el *diestro* de la rata, ocurre un gradual incremento de estrógenos, liberados por el folículo ovárico en desarrollo. En el *proestro*, se produce el pico de foliculoestimulante (FSH) y luteinizante (LH) debido al aumento significativo de estrógenos. En el *estro* se desencadena la ovulación y los niveles de LH y estrógenos bajan a sus niveles mínimos basales. En el *metaestro* (fase lútea temprana) comienza a detectarse un aumento en los niveles de progesterona (producida por el cuerpo lúteo).

Introducción

Finalmente, luego del amamantamiento se produce una pérdida de tejido glandular con una reducción en el tamaño de los lóbulos, se elimina casi el 80% del tejido secretor por un proceso de apoptosis masiva [Gjorevski y Nelson, 2011]. Esta etapa se conoce como

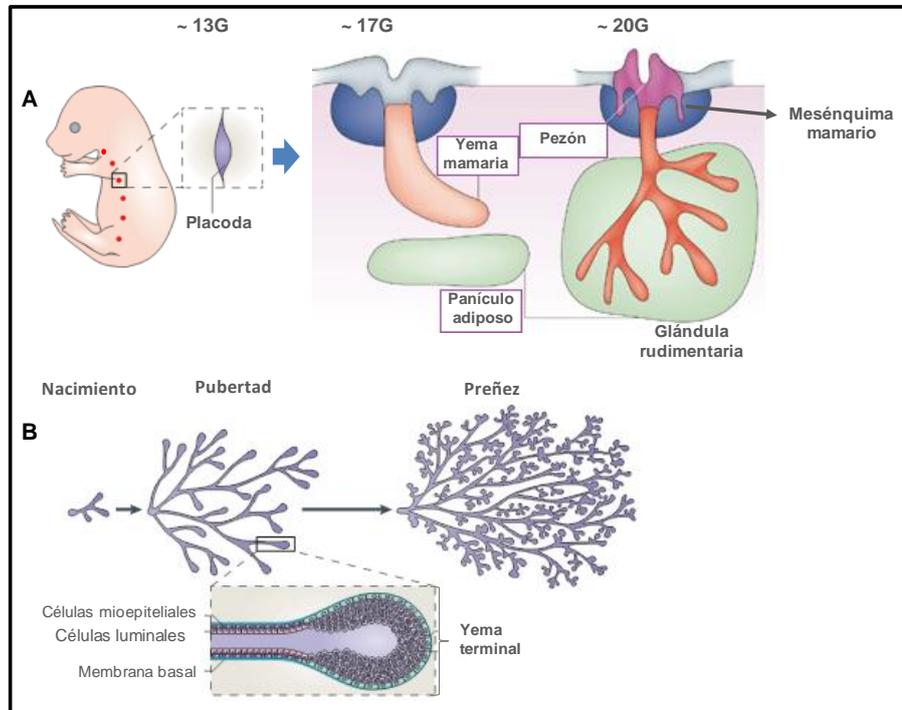


Figura 11. Desarrollo de la glándula mamaria en la rata (modificado de Gjorevski et al., 2011 y Robinson, 2008). A- Desarrollo prenatal de la glándula. Hacia el final de la vida fetal se forma una glándula rudimentaria que permanece sin cambios morfológicos hasta el inicio de la pubertad B- Desarrollo posnatal de la glándula mamaria. Hacia la pubertad, los niveles hormonales desencadenan el desarrollo de las yemas terminales, que ingresan en sucesivas etapas de elongación, bifurcación y ramificación lateral hasta formar un árbol epitelial completo.

período de involución post-lactancia de la glándula y se completa hacia los 10 días posteriores al amamantamiento [Russo I y Russo J, 1996].

Es destacable la capacidad de la glándula mamaria para llevar a cabo sucesivas modificaciones en su estructura durante la preñez, la lactancia y la involución post-lactancia, durante varias décadas en los primates y durante toda la vida en los mamíferos no primates.

En ratas de edad avanzada, existen diferencias en cuanto al aspecto de los lóbulos y ductos de glándula. También resulta habitual la presencia de estructuras anormales de

tipo quísticas que contienen un fluido blanquecino y hasta neoplasias benignas y malignas. Estos hechos se atribuyen a los desequilibrios hormonales que sufren las ratas viejas, que aún siguen experimentando episodios de celo [Russo I y Russo J, 1996].

Con la senescencia los niveles hormonales circulantes se alteran, disminuyen los niveles de estrógenos y progesterona, mientras que los niveles de prolactina continúan siendo elevados. Estos cambios hormonales implican un alargamiento del ciclo como paso previo a la estropausia. La estropausia es el proceso de la senescencia reproductiva en los roedores definido como un estado acíclico anestro (sin celo) [Conn, 2006]. Dicho proceso se inicia a los 9-12 meses de edad [Angulo et al., 2012].

2. *Mucinas (MUCs/Mucs).*

2.1. Consideraciones generales.

Las mucinas constituyen el principal componente del mucus que reviste las superficies epiteliales del sistema digestivo, las vías respiratorias, urogenitales y el aparato cardiovascular, que se hallan en contacto con ambientes diversos y relativamente cambiantes. El mucus proporciona una barrera de defensa de las células epiteliales, frecuentemente expuestas a agentes nocivos, tales como sustancias contaminantes, toxinas y microorganismos y sujetas a fluctuaciones en la composición molecular, como cambios en el pH y concentraciones iónicas [Baldus et al., 2004; Rose y Voynow, 2006]. Las mucinas tienen en consecuencia, un rol central en el mantenimiento de la homeostasis, promoviendo la supervivencia celular en tales condiciones variables.

Por convención, para referirse a una mucina se emplea el prefijo MUC seguido de un número que representa el orden en que fue descubierta esa mucina; si nos referimos a la

Introducción

proteína humana se emplea el prefijo en letras mayúsculas (MUC) y para las otras especies se lo escribe en letras minúsculas (Muc).

Las mucinas son glicoproteínas altamente glicosiladas (50 - 90% de carbohidratos), con una elevada densidad de O-glicosilación, una masa molecular relativamente grande (mayor a 10^5 Daltons) y un gran número de secuencias repetidas en tándem (TR) en su estructura primaria.

Se han identificado más de 20 genes de mucinas humanas y de ratón que se hallan depositadas en GenBank®⁶. Sin embargo, la definición del gen de mucina no resulta siempre consistente. Quizás el dominio TR rico en residuos de serina, treonina y prolina, sea lo que mejor define a una mucina [Rose y Voynow, 2006]. La presencia de dominios TR permite distinguir a las mucinas de otras glicoproteínas. Aunque existen macromoléculas tales como MUC14, MUC15 y MUC16 que han sido clasificadas como mucinas y no contienen TR. Actualmente, coexisten dos definiciones de mucinas, referentes ambas a parámetros estructurales:

- 1) Las mucinas se caracterizan por presentar dominios TR ricos en residuos de serina, treonina y/o prolina y una densa O-glicosilación;
- 2) Las mucinas en un sentido más amplio, se caracterizan por presentar gran cantidad de cadenas de carbohidratos que representan más del 50% del peso molecular de la glicoproteína [Dekker et al., 2002; Baldus et al., 2004].

⁶ GenBank®- base de datos génica del NCBI (Centro Nacional de Información en Biotecnología) que contiene secuencias nucleotídicas de más de 250.000 especies y es de público acceso.

2.2. Clasificación de mucinas.

Las mucinas se clasifican en dos grupos basándose en aspectos estructurales y rutas biosintéticas [Baldus, 2004; Rose y Voynow, 2006]:

- 1) Mucinas de secreción, forman geles que constituyen la primera línea de defensa de las superficies epiteliales (Figura 12). Dentro de este grupo se hallan las mucinas MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6 y MUC19, glicoproteínas de gran tamaño molecular con dominios ricos en cisteína. En tanto, MUC7 y MUC8 son mucinas secretadas que carecen de dominios ricos en cisteína.
- 2) Mucinas asociadas a membrana (MUC1, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17, MUC18 Y MUC20), poseen un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático, tienen funciones adicionales por sus capacidades para interactuar con muchas proteínas involucradas en la transducción de señal y en la adhesión celular. Diversos autores han postulado que estas mucinas constituyen una segunda línea de defensa, actuando como sensores de cualquier perturbación del medio ambiente y señalizando dicha información al interior celular (Figura 12) [Seregni et al., 1997; Gendler, 2001; Moniaux et al., 2001, Porchet et al., 2004].

2.3. Estructura de las mucinas.

El dominio estructural común a la mayor parte de las mucinas es el dominio repetido en tándem TR. Las secuencias nucleotídicas repetidas en tándem se encuentran típicamente codificadas por un único exón central en el gen de la mucina. Muchos de los genes que codifican mucinas son polimórficos, y contienen alelos que presentan un número variable de TRs (VNTR) [Fowler et al., 2001]. Se han detectado modificaciones en las

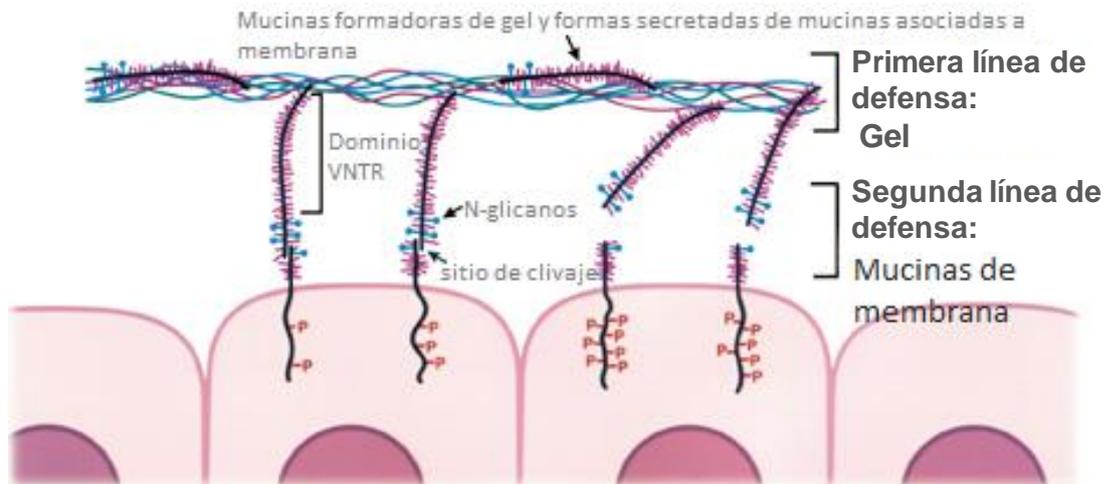


Figura 12. Esquema que representa la superficie de las células epiteliales protegida por mucinas. La primera línea de defensa está constituida por el gel formado por las mucinas secretadas y probablemente, las formas secretadas de las mucinas de membrana. Se muestran las mucinas asociadas a membrana, como una segunda línea de defensa, presentes en la superficie como un heterodímero que puede escindirse y liberar la porción extracelular al medio. La liberación del dominio extracelular podría actuar señalizando cualquier perturbación del medio al interior de la célula (Modificado de Gendler, 2001).

secuencias del VNTR asociadas a cáncer [Hollingsworth y Swanson, 2004], colitis ulcerosa [Kyo et al., 1999] y enfermedades respiratorias [Kamio et al., 2005]. Por otra parte, los genes de las mucinas pueden experimentar procesos de corte y empalme o *splicing* alternativo [Moniaux et al., 2000] que producen variaciones adicionales. Es por eso que distintos individuos pueden expresar de distintas formas el mismo gen MUC.

La secuencia específica y el número de repeticiones en tándem son altamente variables dentro de las diferentes mucinas y dentro de los ortólogos⁷ de mucinas de las diferentes especies (Figura 13). Algunas mucinas presentan dos dominios con diferentes secuencias TR, como es el caso de MUC2; otras glicoproteínas tales como MUC5AC y MUC5B, contienen, respectivamente, de 4 a 5 repeticiones de los TR en sus estructuras proteicas, separadas por dominios ricos en cisteínas.

El dominio TR comprende repeticiones de aminoácidos idénticas o altamente similares ricas en residuos de prolina, serina y/o treonina [Gendler et al., 1987]. Los residuos de

⁷ genes ortólogos- genes que provienen de un mismo gen ancestral y cuya divergencia proviene de un proceso de especiación.

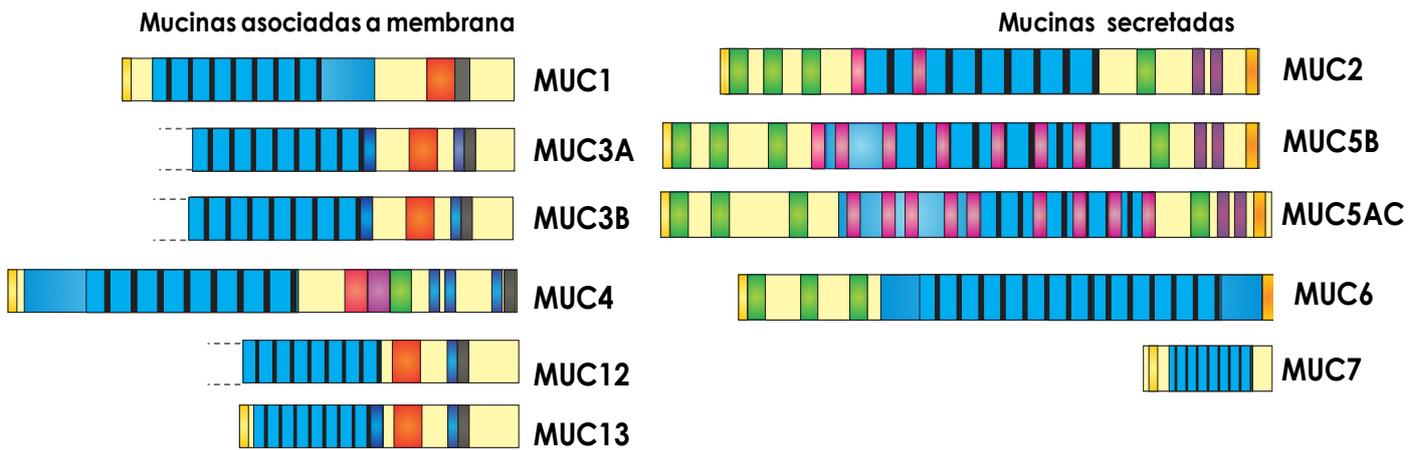
serina y treonina constituyen sitios de O-glicosilación, por lo que el dominio TR se halla altamente O-glicosilado. La presencia de las cadenas de O-glicanos puede alterar la masa molecular de la misma. De esta manera, el dominio TR y sus O-glicanos contribuyen a las propiedades biofísicas y biológicas del mismo moco, por ejemplo, mucinas más pesadas y voluminosas pueden aumentar la viscosidad del moco.

El dominio TR no suele estar conservado entre las distintas especies, en cambio los dominios proteicos ubicados fuera de la secuencia repetida en tándem, en las regiones amino y carboxilo terminal, suelen presentar una gran homología [Spicer et al., 1991], que entre la MUC1 humana y la Muc1 de ratón alcanza el 87% en sus regiones no-repetidas en tándem [Spicer et al., 1991; Vos et al., 1991], mientras que la MUC2 humana y la Muc2 de rata presentan una gran homología en sus regiones amino (80%) y carboxilo terminal (89%) [Gum et al., 1994; Ohmori et al., 1994].

2.3.1. *Mucinas secretadas.*

Las mucinas secretadas pueden ser divididas en mucinas formadoras de gel (MUC2, MUC5B, MUC5AC, MUC6, MUC19) y mucinas no formadoras de gel (MUC7, MUC8) [Andrianifahanana et al., 2006]. Las mucinas formadoras de gel se caracterizan por presentar dominios C y D, que contienen secuencias homólogas a los correspondientes dominios del factor de von Willebrand (vWF-C y vWF-D) y un dominio C-terminal o cisteína knot (CT o CK) conservado (Figura 14). Sin embargo, ninguno de tales dominios es específico de las mucinas, ya que vWF-C, vWF-D y el dominio CT se hallan en otras 78, 44 y 40 proteínas humanas, respectivamente [Schultz et al., 2000]. En tanto que, los dominios ricos en cisteína que se encuentran en las mucinas MUC2, MUC5AC y MUC5B

Introducción



- Secuencia señal:** secuencia de aminoácidos que dirige las proteínas hacia la membrana celular o a secreción.
- Región PTS:** regiones ricas en residuos de prolina, treonina y serina.
- Repetición en tándem:** regiones ricas en prolina, treonina y serina; altamente glicosiladas.
- Dominio SEA:** dominio extracelular que se encuentra en proteínas asociadas a la superficie celular que se hallan altamente glicosiladas. Interviene en la asociación de la proteína y los carbohidratos.
- Dominio transmembrana:** se encuentra en proteínas asociadas a la superficie celular. Atraviesa la membrana plasmática.
- Dominio similar al factor de crecimiento epidérmico (EGF):** Muestra homología con el EGF. Se relaciona con factores de crecimiento y citoquinas.
- Dominio NIDO:** Dominio que sólo se ha encontrado en MUC4 y en otras proteínas humanas no mucinas.
- Dominio AMOP:** Dominio extracelular de adhesión sólo descrito en la mucina MUC4 [Ciccarelli et al., 2002]
- Dominio D (D1, D2, D3, D4):** Muestra homología con el factor de von Willebrand-D. Median la oligomerización en las mucinas secretadas
- Dominio rico en cisteína.**
- Dominio C (C1, C2):** Muestra homología con el factor de von Willebrand-C.
- Dominio C-terminal.**

Figura 13. Representación esquemática de los principales dominios estructurales de las mucinas humanas, asociadas a membrana y secretadas.

son, por lo que se conoce hasta el momento, exclusivos de tales mucinas. Los dominios D y el dominio CT son los responsables de la oligomerización de estas moléculas. El dominio CT forma dímeros mediante uniones disulfuro en el retículo endoplasmático (RE), mientras que el dominio D3 es el que produce la trimerización de la MUC2 en el complejo de Golgi. Se presume que los dominios D hallados en MUC5AC, MUC5B y MUC6 también mediarían oligomerización. La capacidad que tienen estas mucinas de formar geles se debe a la oligomerización.

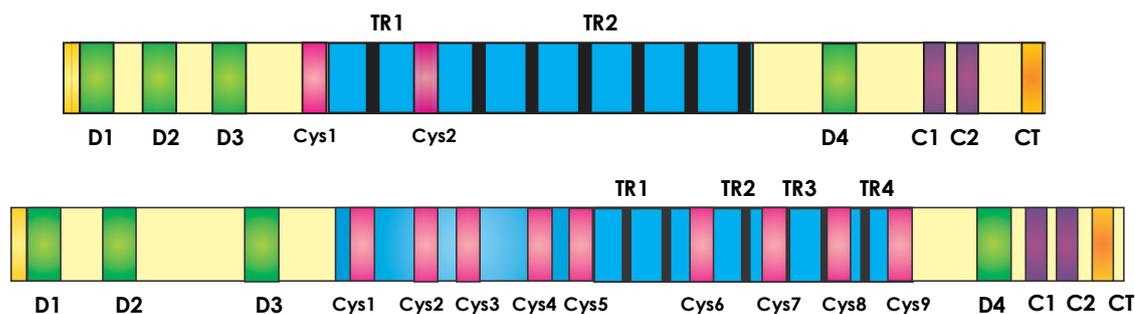


Figura 14. Representación esquemática de la estructura proteica de las mucinas formadoras de gel humanas, MUC2 (arriba) y MUC5AC (abajo). Ambas presentan 3 dominios D (D1, D2, D3) en la región amino-terminal y los dominios D4, C1, C2 y CT en la región C-terminal. En la región central, MUC2 contiene 2 dominios ricos en cisteína separados por los 2 dominios TR (TR1, TR2), mientras que MUC5AC contiene 9 dominios ricos en cisteína intercalados con 4 dominios TR (TR1, TR2, TR3, TR4).

Los genes que codifican a las mucinas formadoras de geles comparten cierta homología de secuencias, y se encuentran todos en la misma región cromosómica, tanto en humanos (cromosoma 11) como en ratas (cromosoma 1), constituyendo un grupo sinténico. Estas mucinas estarían relacionadas evolutivamente entre sí y se habrían originado presumiblemente a partir de un gen ancestral común por una serie de eventos de duplicación génica [Lang et al., 2007].

Homólogos de MUC2 han sido identificados en rata, ratón y conejo [Van Klinken et al., 1995]. Por otra parte, la organización estructural de la Muc5AC de la rata es muy similar a la humana [Bara et al., 1992, 1998].

Las mucinas secretadas MUC7 y MUC8 no tienen capacidad de oligomerizar por lo que son incapaces de formar geles. La mucina MUC7 es una pequeña glicoproteína que carece de los dominios ricos en cisteína característicos de las mucinas formadoras de gel (Figura 13). Mientras que MUC8 es una mucina secretada de gran tamaño, que carece del factor de von willebrand (FVW) D4 y de los dominios C1 y C2 típicamente presentes en otras mucinas de secreción de elevado peso molecular [Rose y Voynow, 2006].

2.3.2. *Mucinas asociadas a membrana.*

Las mucinas asociadas a membrana se componen típicamente por dímeros de dos subunidades diferentes unidas por enlaces no covalentes [Hattrup y Gendler, 2008]. La subunidad mayor es completamente extracelular, altamente glicosilada, y en el caso de MUC1, casi totalmente formada por el dominio VNTR. La subunidad menor consiste en una corta región extracelular, un dominio de transmembrana de paso simple y una cola citoplasmática (CT).

Luego de la transcripción, el precursor polipeptídico de MUC1 se escinde en el RE, en los dos fragmentos que constituyen el heterodímero. El núcleo proteico de la subunidad mayor (MUC1-N) presenta un tamaño de 120-300 KDa; mientras que la proteína madura, luego de la glicosilación, puede duplicar su tamaño. El fragmento menor es llamado colectivamente MUC1-C y contiene una porción extracelular compuesta por 58 aminoácidos (con múltiples sitios de O-glicosilación y 5 sitios de N-glicosilación), un corto dominio transmembrana, formado por 28 aminoácidos, y una CT de 72 aminoácidos (Figura 15) [Raina et al., 2013]. El eje proteico de la subunidad menor tiene un tamaño de aproximadamente 14 KDa, y puede alcanzar los 30-35 KDa luego de la glicosilación o fosforilación [Gendler, 2001]. La glicosilación se inicia durante la traducción con la adición de N-glicanos en el RE. Luego del clivaje de la proteína, la glicosilación adicional se produce en el complejo de Golgi.

El clivaje de la MUC1 es un proceso autoproteolítico y tiene lugar durante el plegamiento [Macao et al., 2006]. El sitio de clivado es N-terminal a un residuo de Ser que se encuentra en el dominio SEA [proteína de esperma -S (*sperm*)- de erizo de mar, E- enteroquinasa y A-agrina) [Parry et al., 2001] (Figura 15). La región N-terminal contiene al péptido señal que dirige la proteína madura hacia la membrana apical de las

células epiteliales polarizadas.

El dominio extracelular puede ser liberado hacia el espacio extracelular por acción de diversas proteasas, tales como ADAM17 en las células endometriales, en respuesta al factor de necrosis tumoral [Thathiah, 2004]. Estas enzimas actúan solo posteriormente a la autoproteólisis de la mucina, por lo que una mutación en el sitio de clivaje podría impedir el desprendimiento de la porción extracelular de la MUC1 [Lillehoj et al., 2003].

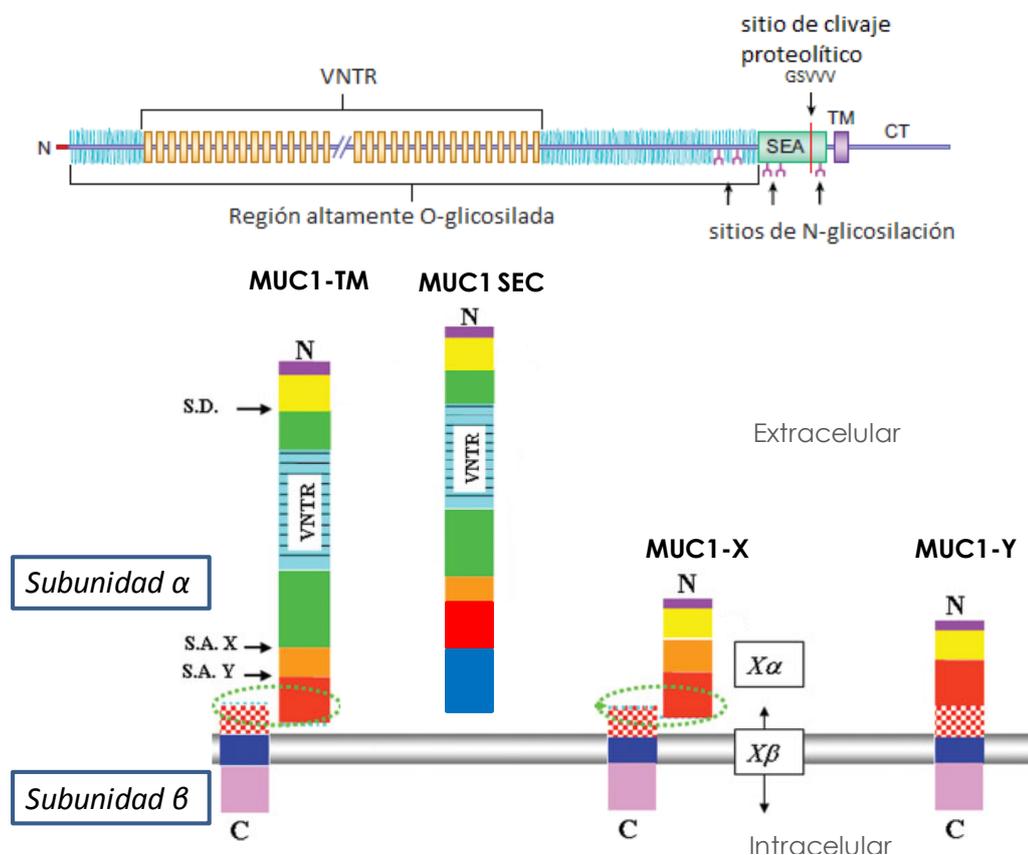


Figura 15. Representación esquemática de la mucina MUC1-TM (arriba), donde se representan el módulo SEA, la región transmembrana (TM) y la región citoplasmática (CT) (Modificado de Hatstrup y Gendler 2008); abajo se muestra un esquema comparativo de las diversas isoformas de MUC1 humanas. El *splicing* alternativo utiliza un donador (indicado como S.D.) y un aceptor de empalme, que en este caso puede ser S.A. X o S.A. Y, generando de esta manera las isoformas X o Y, respectivamente (Modificado de Rubinstein et al., 2009).

Este es uno de los mecanismos que resultan en la formación de una molécula de MUC1 soluble. Sin embargo, algunas formas solubles de MUC1 derivan probablemente de procesos de *splicing* alternativo. Se han descrito diversos productos de *splicing* alternativo del ARNm de MUC1, incluyendo formas secretadas que carecen de los

Introducción

dominios de membrana y citoplasmático (MUC1 SEC) y variantes asociadas a membrana que carecen de dominios TR (MUC1-X o MUC1-Z y MUC1-Y) (Figura 15). La forma MUC1-X comprende en su región extracelular, un módulo SEA de 120 aminoácidos, que se une directamente a la región N-terminal de 30 aminoácidos. El sitio de clivaje permanece intacto y el precursor polipeptídico se escinde en las subunidades α y β . Por otro lado, existen variantes asociadas a membrana, que carecen de dominios TR y que contienen un módulo SEA truncado (MUC1-Y). En estas formas el sitio de clivaje resulta modificado y la proteína no se escinde en las típicas subunidades α y β [Rubinstein et al., 2009].

Se ha identificado a la mucina Muc1 en ratas y ratones, pero no se han descrito productos de *splicing* alternativo del ARNm de Muc1. La Muc1 de rata se halla constituida por 655 aminoácidos [Strausberg et al., 2002], y presenta típicamente un dominio extracelular, un dominio transmembrana y una cola citoplasmática.

2.4. Funciones de las mucinas.

Las mucinas producidas por las células productoras de moco, en los epitelios de revestimiento, y por las glándulas mucosas y submucosas, constituyen el principal componente macromolecular del mucus viscoso que recubre las superficies mucosas. El gel mucoso relativamente impermeable, que actúa como una barrera física y una trampa para los microorganismos, proporciona una matriz para una gran variedad de moléculas antimicrobianas y, como se mencionó previamente, constituye la primera línea de defensa del organismo. Debajo de la capa de mucus, se halla una segunda capa constituida por glicoproteínas y glicolípidos, conocida como glicocáliz. Las mucinas asociadas a membrana constituyen el principal componente del glicocáliz. La

composición de ambas capas es altamente variable de un tejido a otro. La expresión de las mucinas puede estar regulada por citoquinas inflamatorias tales como interleuquinas IL-1, IL-4, IL-6, IL-9, IL-13, interferones, factor α de necrosis tumoral y óxido nítrico. Los productos microbianos también pueden generar un aumento en la síntesis de mucinas. Existen evidencias de que la adhesión de las bacterias probióticas produce un aumento en la producción de mucinas in vitro [Caballero-Franco et al., 2007], lo cual probablemente puede explicar parte del mecanismo por el cual las bacterias probióticas limitan la infección por patógenos [Mack et al., 2003]. En contraste, el lipopolisacárido del patógeno *Helicobacter pylori*, responsable de enfermedades gástricas, disminuye la secreción de mucinas en células epiteliales gástricas in vitro, representando un mecanismo por el cual el patógeno logra modificar en su beneficio la barrera mucosa [Slomiany B. y Slomiany A., 2006].

Por otra parte, se ha demostrado que la mucina MUC1 interviene en mecanismos de adhesión y anti-adhesión entre las células. El efecto antiadhesivo puede ser consecuencia de su tamaño, de su conformación extendida, y probablemente, del bloqueo de las interacciones celulares generado por la desestabilización de las uniones célula-célula y célula-matriz extracelular [Ligtenberg et al., 1992; Hilkens et al., 1992]. Diversos estudios han demostrado que la MUC1 se une a la β -catenina mediante un dominio similar al que se encuentra en la E-cadherina, de manera que la sobreexpresión de la mucina 1 puede reducir la cantidad de β -catenina disponible para interactuar con E-cadherina y así se inhibe la formación del complejo E-cadherina - β -catenina, disminuyendo la adhesión entre las células y promoviendo la migración celular [Yamamoto et al., 1997]. Se ha demostrado que la elevada densidad de MUC1/Muc1 en el epitelio uterino tiene una función protectora, pero también actúa como una barrera

Introducción

para la implantación de embriones que puedan resultar defectuosos. Esto se debe a su capacidad de inhibir las uniones celulares. Se ha visto que la expresión de Muc1 se pierde hacia el día 4 y el día 6 de gestación, en el ratón y en la rata, respectivamente, cuando el útero es receptivo para la implantación del blastocisto [DeSouza et al., 1999; Aplin et al., 2001; Brayman et al., 2004]. Por otro lado, en órganos como el páncreas o el colon, la MUC1 puede actuar como una molécula adhesiva debido a su contenido de carbohidratos, tales como sialil Lewis x, que se unen a las moléculas de tipo selectinas que se encuentran en las células endoteliales. Este mecanismo le permite ayudar a la diseminación metastásica del cáncer [Boshell et al., 1992; Satoh et al., 2000].

Las mucinas asociadas a membrana también participan en la transducción de señales. La cola citoplasmática de MUC1 (MUC1CT), la mucina de membrana mejor caracterizada en relación a la función de transducción de señales, interviene en numerosas vías de señalización, incluyendo aquellas que involucran a EGFR, Wnt, β -catenina, Ras y Src [Singh y Hollingsworth, 2006; Chakraborty et al., 2011]. La MUC1CT contiene numerosos sitios potenciales de fosforilación, que regulan la afinidad de unión de las diferentes clases de elementos involucrados en la transducción de señales. Los dominios transmembrana y CT se hallan altamente conservados entre las especies de mamíferos (88%), lo cual sugiere importantes roles funcionales [Spicer et al., 1995].

Se ha demostrado la presencia de MUC1CT en el núcleo, donde se cree que tiene un rol en la regulación transcripcional de genes. Dado que carece de dominios de unión al ADN conocidos, se especula que la MUC1CT interviene en la regulación transcripcional facilitando la formación de complejos con otros factores o modificando la afinidad de tales complejos por las secuencias cis reguladoras [Wen et al., 2003].

2.5. Expresión de las mucinas.

Las mucinas producidas por diversas células epiteliales se caracterizan por presentar un patrón de expresión bien definido, el cual puede ser modificado por alteraciones provenientes del ambiente o cambios intrínsecos que modifican la expresión génica o la tasa de secreción. Los principales órganos productores de mucinas son generalmente aquellos que pertenecen a los tractos digestivo, respiratorio y urogenital. Aunque también se encuentran en otros órganos como las glándulas mamarias y el ojo [Andrianifahanana et al., 2006]. Algunas mucinas como la MUC1, se hallan expresadas en todos, o casi todos, los epitelios humanos estudiados hasta el momento, indicando su participación en el funcionamiento general epitelial [Van Klinken et al., 1995]. La sobreexpresión de MUC1 en la mayoría de los carcinomas, en particular en el cáncer de mama, está bien documentada [Zotter et al., 1988; Girling et al., 1989], y se correlaciona con un alto potencial metastásico y una menor supervivencia [Croce et al., 1997; Guddo et al., 1998; Sagara et al., 1999; Demichelis et al., 2010].

La expresión de otras mucinas epiteliales se limita a tejidos específicos. La mucina MUC2 humana es expresada por las células caliciformes presentes en los sistemas digestivo y respiratorio [Rose y Voynow, 2006]. Por otra parte, MUC2 ha sido identificada en carcinomas gástricos [Reis et al., 2000], pero se ha visto un descenso de su expresión en cáncer colorectal [Weiss et al., 1996]. Se ha detectado hipersecreción de MUC2 en respuesta a patógenos, tales como *Pseudomonas aeruginosa*, en pacientes que sufren fibrosis quística [Mc Namara et al., 2001].

MUC5AC es la mucina predominante en las células mucosas del pulmón, ojos y estómago [Rose y Voynow, 2006]. Se han detectado alteraciones en la expresión génica de la MUC5AC en procesos neoplásicos e inflamatorios. Por ejemplo, se ha encontrado

expresión de MUC5AC en adenoma colorectal y en cáncer pancreático, aunque en intestino y páncreas normal esta mucina no se expresa [Bartman et al., 1999; Balague et al., 1995]. Por otra parte, en enfermedades crónicas de las vías respiratorias, tales como asma, fibrosis quística y bronquitis, se ha asociado el incremento en la producción de moco con un aumento en la expresión de la mucina, sugiriendo que la MUC5AC puede contribuir a la patogénesis de los trastornos respiratorios hipersecretorios [Temann et al., 1997].

2.6. Glicosilación de mucinas.

La masa molecular de las mucinas está representada en un 50-90% por carbohidratos. Esto se debe a la presencia del dominio TR, el cual presenta, como se mencionó previamente, numerosas repeticiones de secuencias de aminoácidos ricas en serina y treonina, sitios potenciales para la O-glicosilación.

Los procesos de N- y O- glicosilación constituyen modificaciones típicas de las glicoproteínas. Las mucinas presentan principalmente cadenas de O- oligosacáridos unidas, mientras que los N-glicanos están presentes en menor proporción. Generalmente, el proceso de O-glicosilación se inicia en el complejo de Golgi, cuando una enzima N-acetilgalactosaminil transferasa (GalNAc-transferasa) adiciona N-acetilgalactosamina (GalNAc) a un residuo serina o treonina en las regiones TR de una proteína MUC que atraviesa el Golgi. Cada O-glicano es luego elongado por la adición de hexosas, tales como galactosa (Gal), N-acetil-glucosamina (GlcNAc) y fucosa, o ácido siálico, mediante glicosil-transferasas (GT) específicas. Existe un gran número de GT identificadas, de las cuales al menos una docena participan en la síntesis de los O-glicanos asociados a mucinas [Brockhausen y Schachter, 1997]. Tradicionalmente, se

reconocen 3 regiones en las estructuras que forman los O-glicanos (Tabla 2): la región central o núcleo (*core*), contiene de 2 a 3 monosacáridos localizados proximalmente a la cadena polipeptídica; la región del eje principal (*backbone*), donde se alargan las cadenas de oligosacáridos y la región periférica, exhibe estructuras de gran complejidad y variabilidad [Hanisch, 2001].

Se han descrito al menos ocho estructuras *core*, de las cuales se han identificado cuatro estructuras *core* principales en los O-glicanos aislados de mucinas [Hounsell, 1994] (Figura 16). La transferencia de Gal al C-3 de GalNAc genera una estructura que va a formar un *core* tipo 1 o tipo 2. La siguiente GT puede adicionar un residuo a Gal (elongación del *core* 1) o de GalNAc formando una ramificación (*core* 2). De manera similar, GlcNAc puede adicionarse a GalNAc para formar el *core* 3, el cual puede ramificarse para formar el *core* 4. Las estructuras *core* pueden ser elongadas (región eje principal) por adición de unidades del disacárido Gal β 1-4GlcNAc (unidades de lactosamina) mediante Gal y GlcNAc transferasas. Tales estructuras pueden ser luego terminadas por la adición de determinantes de grupos sanguíneos⁸, ácido siálico, fucosa o sulfatos (región periférica) (Tabla 2).

Las unidades de ácido siálico y de sulfatos imparten cargas negativas a las mucinas, mientras que las fucosas proporcionan hidrofobicidad. Esto hace pensar que los azúcares periféricos pueden contribuir a la determinación de las propiedades físicas y

⁸ Los antígenos del grupo sanguíneo constituyen un grupo de determinantes expresados típicamente por eritrocitos en humanos. También se hallan expresados, en numerosas especies, por células epiteliales, en las que participan en procesos de crecimiento, diferenciación y homeostasis. Estos antígenos pueden ser del grupo ABH o del sistema Lewis. Los antígenos del grupo ABH incluyen los determinantes H, A y B. En el complejo de Golgi, glicosiltransferasas específicas adicionan determinados carbohidratos a un aceptor oligosacárido denominado antígeno H. La adición de GalNAc, lo convierte en el antígeno A, mientras que la adición de Gal genera el antígeno B [Smolarek et al., 2008]. En tanto que la no adición de sacáridos genera el grupo 0. Los determinantes del sistema Lewis incluyen a Lewis a, Lewis b, Lewis x, Lewis y, y sus variantes sialiladas, sialil Le a y sialil Le x.

Introducción

biológicas de las mucinas. Por lo tanto, las alteraciones de las glicosilaciones periféricas, que se producen probablemente en varias enfermedades, tienen la capacidad de alterar las propiedades físicas de las mucinas y del mucus que constituyen.

La glicosilación de las mucinas, así como la expresión génica de las mismas, está restringida a un tipo de tejido y a un tipo de célula determinada, y las estructuras *core* de los O-glicanos pueden ser modificados en diversas enfermedades [Rose, 1992]. Por ejemplo, los O-glicanos aislados de la mucina MUC1 sintetizada *in vitro* a partir de células mamarias de una mujer sana son predominantemente de core tipo 2, mientras que los que provienen de líneas celulares de cáncer de mama tienen estructuras core de tipo 1 [Hull et al., 1989]. Por otro lado, los O-glicanos de mucinas purificadas de tejido de colon normal son predominantemente estructuras de core 3 con una compleja ramificación. En contraste, los O-glicanos de líneas celulares de cáncer de colon presentan un incremento en los O-glicanos cortos (antígeno Tn, sialil Tn - sTn - y antígeno TF - Thomsen-Friedenreich, T o disacárido de estructura core 1) (Figura 16), un descenso de ácido siálico y sulfatos, y un aumento en estructuras de tipo sialil Le x [Byrd et al., 2004].

Mientras que la O-glicosilación es la predominante en las mucinas, muchas de ellas presentan también uno o más sitios de N-glicosilación. Este proceso ocurre cotraduccionalmente en el RE, y consiste en la adición de glicanos ricos en manosa al nitrógeno de residuos de asparagina [Asker et al., 1998].

La expresión de los carbohidratos asociados a mucinas son objeto de estudio, debido a su importancia en el diagnóstico del cáncer, en la patogenia de las metástasis y en las respuestas inmunológicas [Taylor-Papadimitriou et al., 1999]. Los O-glicanos cortos-antígenos Tn, sTn y TF - han sido ampliamente asociados a cáncer. En efecto, tales

epitopes permanecen cubiertos por extensos residuos carbohidratos y por lo tanto encriptados, en las células normales, mientras que resultan expuestos al sistema inmune, en la superficie de las células cancerosas [Cao et al., 2008]. Se han detectado en células tumorales mamarias, de colon, de pulmón, de piel, de vejiga y de próstata, y generalmente, se han asociado a un mal pronóstico. En determinados sitios y en cantidades limitadas, se han hallado expresados en tejidos adultos normales humanos, sin embargo, se han descrito principalmente como antígenos onco-fetales expresados por células cancerosas y fetales [Barr et al., 1989].

Tabla 2. Estructuras de los carbohidratos unidos O-glicosídicamente a las mucinas.

Estructuras core	
<i>Antígeno Tn</i>	GalNAc α -O-péptido
<i>Antígeno Sialil Tn</i>	NeuAc α 2-6 GalNAc α -O-péptido
<i>Core 1</i>	Gal β 1-3GalNAc α -O-péptido
<i>Core 2</i>	Gal β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc α -O-péptido
<i>Core 3</i>	GlcNAc β 1-3GalNAc α -O-péptido
<i>Core 4</i>	GlcNAc β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc α -O-péptido
<i>Core 5</i>	GalNAc α 1-3GalNAc α -O-péptido
<i>Core 6</i>	GalNAc β 1-6GalNAc α -O-péptido
Eje principal	
<i>Tipo 1</i>	Gal β 1-3GlcNAc
<i>Tipo 2</i>	Gal β 1-4GlcNAc
Región periférica	
<i>Antígeno H</i>	Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc β 1-
<i>Antígeno A</i>	GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-3GlcNAc β 1-
<i>Antígeno B</i>	Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-3GlcNAc β 1-
<i>Lewis a</i>	Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-
<i>Lewis b</i>	Fuc α 1-2Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-
<i>Lewis x</i>	Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-
<i>Lewis y</i>	Fuc α 1-2Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-
<i>sialil Lewis a</i>	NeuAc α 2-3Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-
<i>sialil Lewis x</i>	NeuAc α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-

Gal= galactosa, GalNAc= N-acetil-galactosamina, N-acetil-glucosamina, Fuc=fucosa, NeuAc= ácido acetil-neuramínico.

Por otra parte, numerosos investigadores han sugerido importantes roles de los complejos carbohidratos en los procesos del desarrollo, debido a que se han hallado expresados de un modo espacial y temporal específicos a lo largo de la embriogénesis [Haltiwanger y Lowe, 2004].

Introducción

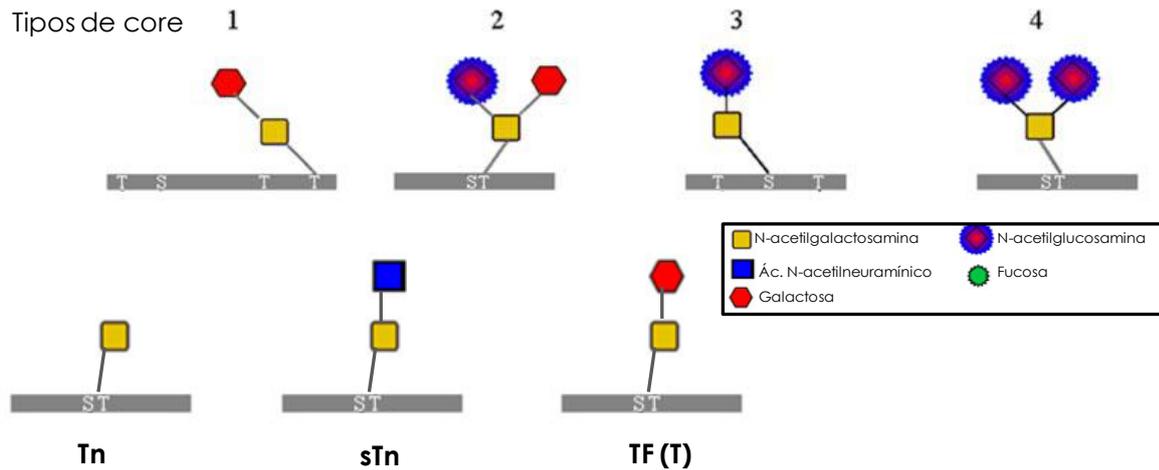


Figura 16. Representación esquemática de los cuatro principales tipos de core de O-glicanos asociados al eje proteico de las mucinas (apomucina) (arriba) y de antígenos carbohidratos cortos asociados a tumor- Tn, sTn y TF (T) (abajo) (Modificada de Callaghan Rose y Voynow, 2006).

3. Familia de genes romboide (RHBDs/Rhbds).

Los genes romboide codifican serín-proteasas intramembrana, que han sido conservadas a lo largo de la evolución y se caracterizan por presentar un residuo de serina en su sitio catalítico, dentro del plano de la membrana plasmática. Por convención, para referirse a una proteína romboide humana se emplea el prefijo en letras mayúsculas (RHBD), mientras que para otras especies de mamíferos se escribe en letras minúsculas (Rhbds). La familia de genes romboide se puede dividir en tres grupos principales: 1) Romboides activos (por ejemplo Romboide-1 en *Drosophila*, RHBDL-1/-2/-3 y RHBDD1 en humanos), 2) Romboides inactivos, que carecen de actividad catalítica (llamados también iRhoms, por ejemplo, RHBDF-1/-2) y 3) Romboides que se consideran inactivos dado que no existe evidencia de actividad catalítica, pero que se hallan alejados evolutivamente entre ellos mismos y con los otros romboides inactivos (por ejemplo RHBDD-2/-3) [Abba et al., 2009].

Romboide-1 de *Drosophila melanogaster* fue el primer miembro de esta familia de proteasas identificado, y es el responsable de la escisión de Spitz, el principal ligando de EGFR en *Drosophila* [Urban et al., 2001; Freeman, 2008] (Figura 17). Resulta interesante

destacar que la vía de señalización de EGFR regula numerosos aspectos de la embriogénesis en *Drosophila*, por lo que Romboide-1 estaría jugando un importante rol en el desarrollo normal de la misma. Por otro lado, también se ha involucrado la vía de EGFR en la progresión tumoral [Spano et al., 2008; Mitsudomi et al., 2010]. En años recientes, esta información ha conducido al estudio de la familia de genes romboide asociados a los procesos de proliferación celular, apoptosis y progresión tumoral. Se ha demostrado en células tumorales humanas que los genes RHBDD-1 y RHBDF-1 regulan los procesos de apoptosis y proliferación celular mediante la vía de señalización EGFR [Wang et al., 2008; Zou et al., 2009]. En estudios recientes se ha identificado al gen RHBDD2 humano (*Rhomboid domain containing 2*), localizado en el cromosoma 7 y se ha demostrado su sobre-expresión en carcinomas invasivos primarios de mama y colorectales en pacientes que han desarrollado recidivas de la enfermedad [Abba et al., 2007, 2009; Lacunza et al., 2012].

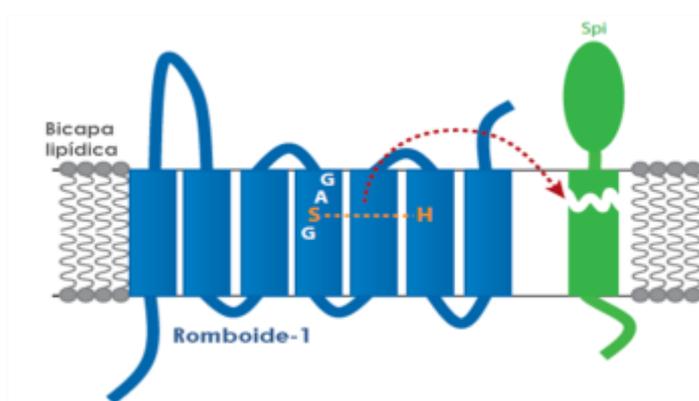


Figura 17. Romboide-1 de *Drosophila*. Romboide-1 (azul) fue el primer miembro de la familia romboide en ser identificado como una serín proteasa intramembrana. Su sitio activo se ubica dentro de la bicapa lipídica y escinde al sustrato Spitz (verde) en el dominio transmembrana. Un residuo de serina y otro de histidina constituyen la díada catalítica (Modificado de Freeman, 2008).

4. Cáncer.

Entre 100 y 350 de cada 100.000 personas en el mundo mueren de cáncer. El cáncer se debe a fallas en los mecanismos que controlan el crecimiento y la diferenciación celular.

4.1. Consideraciones generales del cáncer.

En el contexto de la biología celular, el cáncer comprende a ciertas enfermedades que se caracterizan por presentar alteraciones en los mecanismos que gobiernan la proliferación, la diferenciación, el anclaje y la migración celular. Los procesos que intervienen en la formación de los tumores malignos son los mismos que ocurren durante el desarrollo embrionario.

Las pérdidas de regulación celular que dan origen a la mayoría o a todos los casos de cáncer se deben a daños genéticos. Se ha demostrado que deben acumularse múltiples alteraciones genéticas para que se produzca la transformación celular maligna. Entre ellas, la activación de oncogenes, la pérdida o inactivación de segmentos cromosómicos y/o genes supresores de tumor, son de gran importancia ya que aparecen frecuentemente asociadas al proceso de carcinogénesis.

Los procesos de formación de cáncer, denominados oncogénesis o tumorigénesis, son resultado de la interacción entre los genes y el medio ambiente [Potter, 2011]. La mayoría de los tumores aparecen luego de que los genes son alterados por carcinógenos o por errores en el copiado y reparación de genes. Generalmente, una serie de mutaciones en múltiples genes crea un tipo celular que prolifera de manera descontrolada con mayor índice mitótico. Por último, el clon de células crece y forma un tumor. Los tumores pueden ser benignos o malignos. La mayoría de los tumores benignos permanecen localizados en los tejidos donde se originaron y cubiertos por una cápsula fibrosa delimitante. Las células tumorales benignas se asemejan a las normales y pueden funcionar como ellas. En cambio, las células que forman un tumor maligno, crecen y se dividen más rápidamente que las normales, no mueren en el tiempo previsto, e invaden tejidos cercanos. Algunos tumores malignos como los mamarios,

permanecen localizados durante un tiempo. Cuando progresan estos tumores, las células invaden los tejidos circundantes, ingresan en el sistema circulatorio y establecen áreas secundarias de proliferación, un proceso denominado metástasis. La mayoría de las células malignas adquieren la capacidad de metastatizar. En consecuencia, las principales características que diferencian los tumores malignos de los benignos son la invasividad y la diseminación [Lodish, 2005].

Los tumores malignos se clasifican como carcinomas si derivan de epitelios de cualquiera de las tres capas germinales, y sarcomas si derivan del mesénquima. Mientras que los tumores benignos se designan generalmente, añadiendo el sufijo -oma a la célula de origen [Robbins, 2008]. Por ejemplo, un tumor epitelial benigno que se origina en una glándula se denomina adenoma, mientras que la contrapartida maligna es el adenocarcinoma.

Los cambios genéticos que subyacen a la oncogénesis alteran varias propiedades fundamentales de las células, les permiten evadir los controles de crecimiento normal y les confieren el fenotipo de cáncer completo (Figura 18).

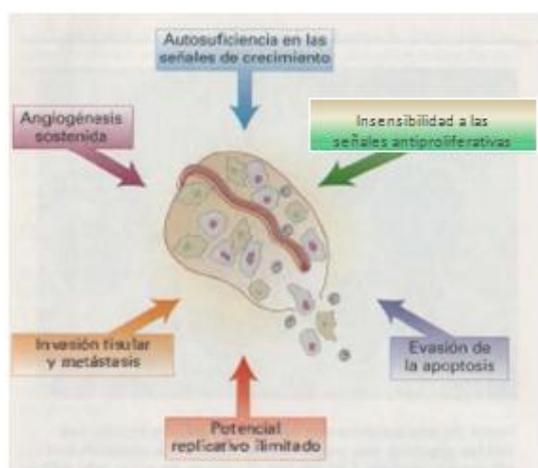


Figura 18. Propiedades fundamentales que distinguen a las células tumorales. Adquieren un impulso para proliferar que no requiere una señal inductora externa, no perciben las señales que restringen la división celular, exhiben una inmortalidad inapropiada (evasión de la apoptosis). Para alcanzar cierto tamaño, deben obtener irrigación sanguínea y suelen lograrla mediante la señalización que induce la angiogénesis. A medida que avanza el cáncer, el tumor se convierte en un “órgano” anormal, cada vez mejor adaptado para el crecimiento y la invasión de los tejidos circundantes (Modificado de Hanahan y Weinberg, 2000).

4.2. Mecanismos moleculares en el desarrollo del cáncer.

Las mutaciones que desempeñan un papel clave en la carcinogénesis ocurren en dos tipos de genes: los protooncogenes y los genes supresores de tumores. Los protooncogenes son activados para volverse oncogenes mediante mutaciones que los hacen excesivamente activos en la promoción del crecimiento y la proliferación. No obstante, los protooncogenes pueden presentar actividad constitutiva en condiciones normales. Los genes supresores de tumores normalmente restringen el crecimiento, por lo que si se alteran se produce un crecimiento inapropiado.

En algunos casos, se producen mutaciones en genes que codifican receptores para determinados factores de crecimiento que lo conducen a un estado constitutivamente activo, incluso en ausencia del ligando. De esta forma, promueven la proliferación sin necesitar de factores de crecimiento externos. Tal es el caso de las mutaciones que alteran a los genes que codifican para los receptores RTK (que tienen una actividad intrínseca de tirosín quinasa en sus dominios citosólicos), y que se unen a muchos factores de crecimiento tales como, EGF y FGF. La fijación del ligando (FGF, EGF) a los dominios externos de estos receptores (también denominados según el ligando específico, FGFR, EGFR), provoca un cambio conformacional en el receptor que estimula la actividad quinasa latente e inicia una vía intracelular de señalización que en última instancia promueve la proliferación (Figura 19).

Otros oncogenes codifican proteínas transductoras de señales. Por ejemplo, una mutación en el gen Ras, puede convertir a la proteína Ras normal en una oncoproteína activa constitutivamente. Como puede observarse en la Figura 19, Ras puede presentar un papel clave en la transducción de señales desde los receptores RTK [Schlessinger J, 2000; Simon, 2000]. Muchos tipos de tumores humanos, incluidos los carcinomas de

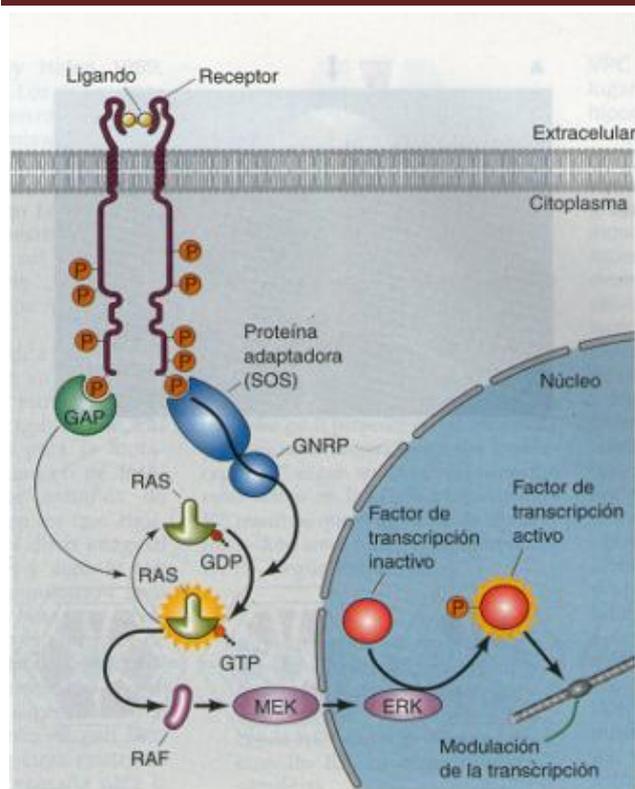


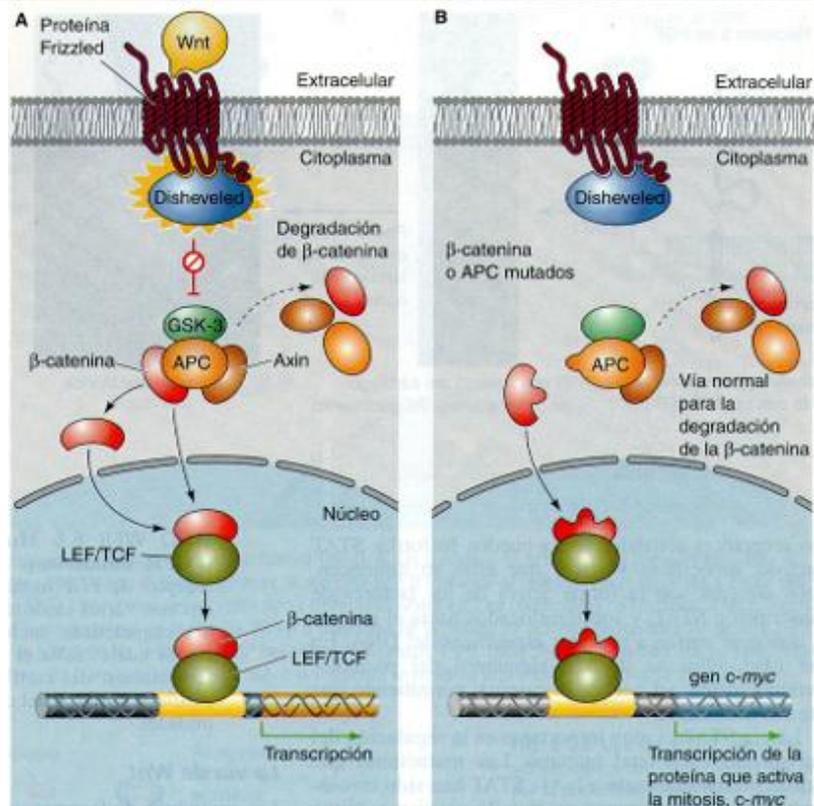
Figura 19. Vía de transducción de señal del RTK ampliamente usada. El receptor RTK (EGFR, FGFR) es dimerizado por el ligando (EGF, FGF) que provoca la autofosforilación del receptor. La proteína adaptadora reconoce las tirosinas fosforiladas sobre el receptor y activa una proteína intermediaria (GNRP), que a su vez activa a la proteína Ras al permitir la fosforilación del GDP unido a Ras. En tanto, una proteína GAP estimula la hidrólisis del fosfato unido, retornando a Ras a su estado inactivo. La Ras activa puede activar la proteína quinasa Raf, que a su vez fosforila a una serie de quinasas. Finalmente, la quinasa ERK activada altera la expresión del gen en el núcleo de la célula que responde mediante la fosforilación de ciertos factores de transcripción (Gilbert, 2005).

colon, mama, pulmón y piel, producen oncoproteínas Ras activas constitutivamente. Por otra parte, las mutaciones que afectan a los genes para factores inhibidores de la proliferación celular también son importantes en la desregulación del ciclo celular que puede desencadenar el cáncer. Por ejemplo, el factor TGF- β inhibe la proliferación de muchos tipos celulares, incluida la mayoría de las células epiteliales y del sistema inmune [Hua et al., 1998]. De manera tal que las mutaciones que alteran a los receptores de TGF- β , promueven la proliferación celular y probablemente contribuyan a la invasión y metástasis de células tumorales al facilitar la migración celular.

Con frecuencia, las vías de señalización que han sido asociadas con la inducción del cáncer, son las mismas que se utilizan para dirigir el destino de las células en el desarrollo embrionario normal. En efecto, numerosas mutaciones que afectan a los componentes de la mayoría de las vías de señalización que controlan el desarrollo embrionario han sido ampliamente asociadas con la inducción del cáncer. Por ejemplo,

Introducción

Figura 20. La vía de señalización Wnt. A- La proteína Wnt se une a su receptor, un miembro de la familia de las proteínas Frizzled. En la mayoría de los casos, el receptor activa a la proteína Disheveled, permitiéndole a éste convertirse en un inhibidor de la quinasa glucógeno-3 sintetasa (GSK-3). Si GSK-3 fuera activa, impediría la disociación de la β -catenina de la proteína APC. De este modo, la señal de Wnt libera a la β -catenina para que pueda asociarse con la proteína LEF o TCF transformándose en un factor de transcripción activo. B- En las células del adulto, si el gen para APC o para la β -catenina está mutado se le permite a la β -catenina ingresar constitutivamente al núcleo



lo cual genera la activación de ciertos genes de la división celular y el comienzo de la formación de tumores (Pennisi, 1998; Gilbert, 2005).

la vía de señalización Wnt- β -catenina (Figura 20), utilizada repetidamente durante el desarrollo para controlar los destinos celulares, es un buen ejemplo de una vía de señalización implicada en la inducción del cáncer de colon [Ochoa-Hernández et al., 2012].

Existen también varios estudios que han relacionado esta vía con enfermedades neurodegenerativas, con la regulación de la densidad ósea y con la proliferación y supervivencia de las células madre [Logan et al., 2004; Johnson et al., 2006].

4.3. Rol de las mucinas en los mecanismos biológicos del cáncer y del desarrollo embrionario.

Lo anteriormente presentado es simplemente un ejemplo de la íntima relación que existe entre la biología del desarrollo y la biología del cáncer, con numerosas vías de

señalización compartidas, perfiles de expresión génicos y modificaciones del ADN involucradas en ambas [Potter, 2011].

Diversos estudios han demostrado la sobreexpresión y la pérdida de la expresión polarizada de la MUC1 en el desarrollo de los carcinomas. Mientras que, estudios más recientes han determinado cambios en la expresión de la MUC1/Muc1 durante el desarrollo embrionario humano y de ratones, en coincidencia con la formación de los epitelios y la diferenciación glandular [Braga et al., 1992; Hudson et al., 2001; Sun et al., 2003]. Tales observaciones sugieren que probablemente la mucina 1 tenga una participación especial en la inducción de cambios en la arquitectura de los tejidos tanto en el desarrollo embrionario normal como en el cáncer.

Durante mucho tiempo, se ha asociado la expresión de MUC1 con la progresión metastásica de los tumores y una baja supervivencia de los pacientes con cáncer. Las múltiples interacciones en las que participan los dominios de MUC1, permiten distintos mecanismos por los cuales la MUC1 puede promover la metástasis. Entre ellas se incluyen, interacciones con proteínas en la matriz extracelular, en la membrana celular, en el citoplasma y en el núcleo, donde MUC1 funciona como un cofactor de la transcripción génica (Figura 21) [Lau et al., 2012; Horm y Schroeder, 2013]. El dominio extracelular de MUC1 interactúa con múltiples receptores de membrana y componentes de la matriz extracelular, tales como ICAM-1, un receptor de adhesión de la superficie endotelial (Regimbald et al., 1996; Ciborowski y Finn, 2002). Esta interacción MUC1-ICAM-1 promueve la migración de las células tumorales, facilitando la interacción entre las células epiteliales y endoteliales, lo que permite la adhesión de las células cancerosas circulantes al revestimiento interno de los vasos sanguíneos y permitiendo el escape desde los mismos (Orr et al., 2000). Por otra parte, la MUC1CT interactúa con Src, una

Introducción

tirosín quinasa citoplasmática, y tal interacción promueve los reordenamientos citoesqueléticos que permiten la formación de las prolongaciones citoplasmáticas, lamelipodios y filopodios, que intervienen en la migración celular (Figura 21) [Rahn et al., 2005; Shen et al., 2008].

La principal intervención de la MUC1 en la metástasis está asociada al dominio MUC1CT, el cual se escinde para formar una MUC1CT soluble, capaz de interactuar con una variedad de proteínas citoplasmáticas, ingresar en el núcleo e iniciar la transcripción de un grupo de genes que modulan la metástasis tumoral, entre ellos los que codifican EGFR. Estudios recientes han demostrado que la activación de la vía EGFR induce la escisión de la MUC1CT [Lau et al., 2012], permitiendo su translocación al núcleo, lo que resulta suficiente para desencadenar el inicio de la metástasis tumoral [Singh et al., 2006]. La localización nuclear de MUC1 está correlacionada con un mal pronóstico y una baja supervivencia [Baldus et al., 2004].

Como se mencionó previamente, la vía de señalización EGFR también resulta ser importante en varios eventos del desarrollo. Se ha demostrado la interacción de la MUC1 con miembros de la familia de receptores ErbB⁹ durante el desarrollo de la glándula mamaria [Schroeder et al., 2001]. La MUC1CT también puede interactuar directamente con diferentes componentes de la vía de señalización Wnt, incluyendo a la β -catenina, la proteína APC y la quinasa 3- glucógeno sintetasa (GSK-3). Como se señaló previamente, las glicoproteínas Wnt cumplen un destacado rol en el desarrollo embrionario de diversos organismos. Estas proteínas son críticas en el establecimiento de la polaridad de los miembros de insectos y de vertebrados, y son utilizadas en varias etapas del desarrollo del sistema urogenital [Gilbert, 2005].

⁹ La familia de receptores ErbB constituye un grupo de receptores tirosín-quinasa relacionados estructuralmente, entre los cuales se encuentra el EGFR.

Por otro lado, estudios realizados en ratones transgénicos han sugerido un posible rol de la mucina Muc2 en la supresión de tumores [Velcich et al., 2002], aunque la función precisa de la Muc2 en tal proceso, aún no ha sido esclarecida [Hollingsworth y Swanson, 2004].

Diversos trabajos han demostrado la expresión de varias mucinas durante el desarrollo fetal humano, como MUC1, MUC2 y MUC4 en los sistemas digestivo y respiratorio [Buisine et al., 1999, 2000, 2000], MUC1 y MUC2 en el sistema urogenital [Chambers et al., 1994], MUC5AC en la tráquea, y MUC5AC y MUC6 en varios órganos del tracto gastrointestinal y en el riñón [Reid et al., 1998, 1999; Porchet et al., 2004]. Además, se detectó Muc1 en embriones de ratón y MUC4/Muc4 en embriones de humanos y de rata [Braga et al., 1992; Zhang et al., 2006]. Algunos autores como Buisine et al. (1999; 2000), han propuesto un posible rol de algunas mucinas en la diferenciación epitelial, y en los mecanismos de elongación y ramificación de los epitelios durante el desarrollo fetal.

4.4. Rol de los carbohidratos asociados a mucinas en los mecanismos biológicos del cáncer y del desarrollo embrionario.

Como se dijo anteriormente, las mucinas son glicoproteínas muy glicosiladas. La glicosilación aberrante y la sobre-expresión de determinados oligosacáridos constituyen características habituales en distintos tipos de cáncer [Brooks et al., 2009].

La presencia del antígeno Tn ha sido asociada con varios tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de mama [Freire et al., 2005], esófago, estómago, colon, hígado y páncreas [Ohshio et al., 1995] y en melanoma metastásico [Kanitakis et al., 1998]. Sin embargo, Tn no es un antígeno específico de tumor y se ha hallado expresado también en tejidos adultos normales y embrionarios [Sorensen et al., 2006].

Introducción

El antígeno disacárido TF se sobre-expresa en la superficie de células de cáncer mamario, pulmonar, de colon, de vejiga y de próstata [Springer et al., 1984; Irazoqui et al., 2003]. Aparentemente, permanece encriptado en las células normales, cubierto por extensos oligosacáridos que evitan su exposición al sistema inmunológico [Rittenhouse-Diakun et al., 1998], y resulta expuesto en la superficie de las células cancerosas. Se ha sugerido que contribuye en los procesos de adhesión de las células cancerosas y en la metástasis [Heimburg et al., 2006; Yu, 2007]. La sobreexpresión de los antígenos Le x y su contraparte sialilada, sLe x, también ha sido ampliamente detectada en carcinomas [Croce et al., 1997; 2007; Wang et al., 2011, 2012].

Se ha establecido que los O-glicanos asociados a mucinas jugarían un rol importante durante el desarrollo, debido a que se expresarían de un modo espacial y temporal específicos [Haltiwanger y Lowe, 2004]. Los antígenos Tn y TF han sido identificado como “antígenos carbohidratos oncofetales” relacionado con la ontogenia [Stanley et al., 2009]. Se ha identificado al oligosacárido Le x en los blastómeros del embrión temprano de ratón en estadio de 8 células, lo cual se correlaciona con el inicio del proceso de compactación de la mórula [Rastan et al., 1985; Bird y Kimber, 1984; Fenderson et al., 1984], mientras que sLe x sería importante en el reconocimiento y adhesión celular en el momento de la implantación del embrión [Liu et al., 2011]. En cuanto a Le x, se ha sugerido que sería un mediador dependiente de calcio de la adhesión homotrópica de células embrionarias de ratón y que podría tener un rol importante en el control del reconocimiento celular durante la agregación de las células en el desarrollo embrionario [Muramatsu et al., 2004]. El reciente interés puesto en ellos resultó de la observación de que los mismos sufrirían modificaciones específicas en su expresión durante el desarrollo [Fan et al., 1999; Haltiwanger y Lowe, 2004].

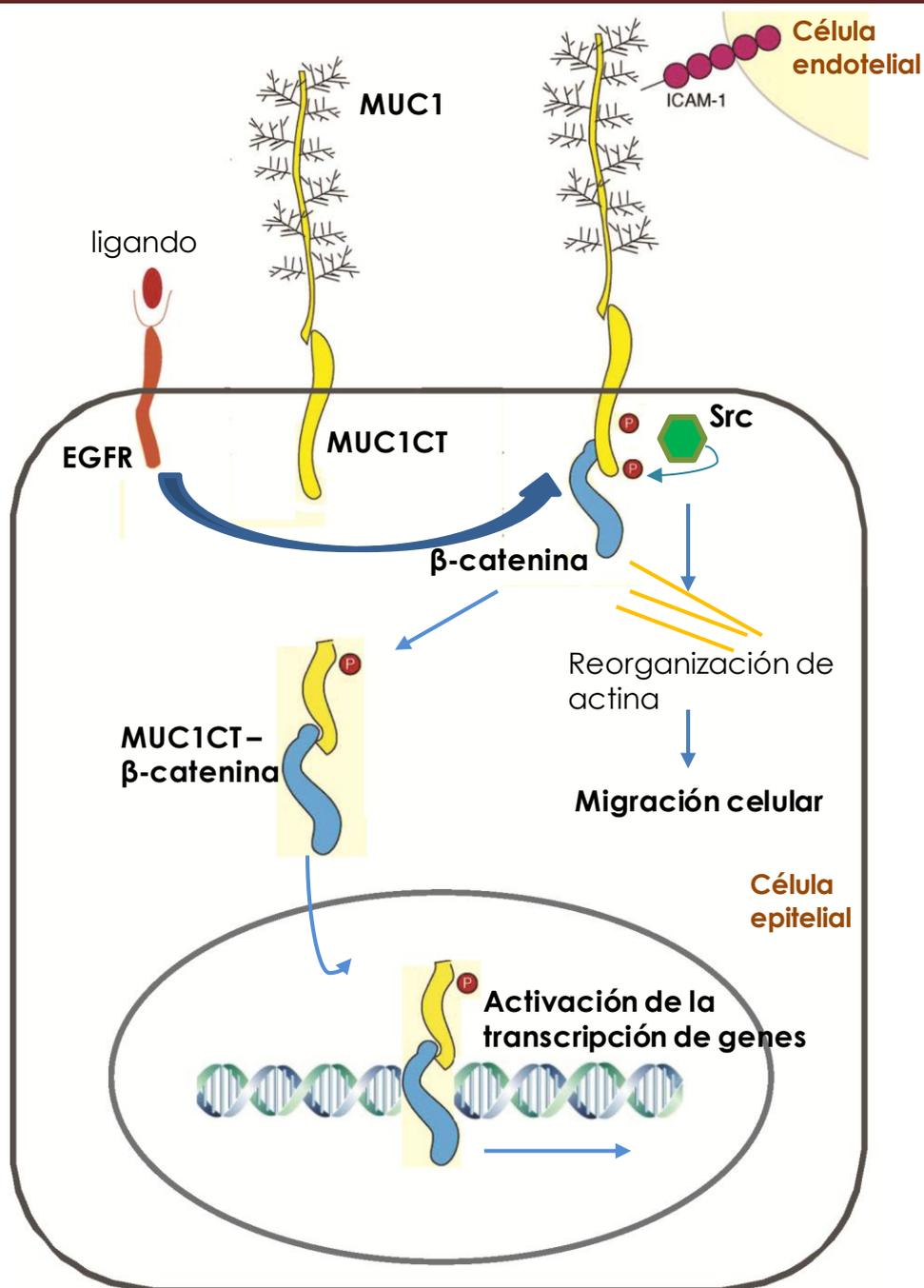


Figura 21. Señalización mediada por MUC1. El dominio extracelular de la MUC1 interactúa con el receptor ICAM-1 ubicado en la superficie de la célula endotelial, facilitando la interacción entre la célula epitelial y la endotelial, lo que permite la adhesión de la célula epitelial circulante al revestimiento interno de los vasos sanguíneos. El dominio citoplasmático de MUC1 es fosforilado por Src y por receptores de factores de crecimiento tales como EGFR, entre otras proteínas. La fosforilación por Src induce una serie de interacciones que generan reordenamientos en el citoesqueleto que conducen a un aumento en la motilidad celular y por lo tanto, favorecen la migración celular. La fosforilación mediante EGFR también promueve la motilidad celular y se ha demostrado que induce el clivaje de la MUC1CT. La MUC1CT clivada puede interactuar con proteínas tales como β -catenina, p120catenina, Src y EGFR, y de esa forma, se produce la translocación nuclear. Una vez en el núcleo, puede actuar como un cofactor transcripcional, alterando directamente la transcripción de determinados genes. Entre tales genes se encuentran numerosos genes directamente vinculados con los procesos de transformación y metástasis, como p53 y EGFR, genes que promueven la angiogénesis y genes relacionados con la transición epitelio - mesenquimática, como vimentina y E-cadherina, importantes tanto en la progresión metastásica como en procesos del desarrollo embrionario. (Basado en Singh, 2006 y en Horm y Schroeder, 2013).

Introducción

De acuerdo a lo expuesto, se considera que las mucinas, los carbohidratos asociados y la proteína Rhbdd2 podrían tener una participación especial en la formación y diferenciación de los tejidos epiteliales durante el desarrollo de los órganos en los que se hallan expresadas, dada su intervención en los mecanismos de adhesión, migración, diferenciación y proliferación celular. Por lo tanto, el análisis de la expresión específica de las mucinas de membrana y de secreción, como así también de los carbohidratos asociados a ellas, y de Rhbdd2, podría proporcionar información básica para comprender el rol biológico de estas proteínas en la formación y diferenciación de los epitelios.

En el presente estudio, se seleccionaron las mucinas Muc1, Muc2 y Muc5ac porque son mucinas estudiadas en el ser humano que se expresan en epitelios de la glándula mamaria, del colon, y del estómago y aparato respiratorio, respectivamente y resulta muy interesante su estudio en el desarrollo.

Por otra parte, las neoplasias malignas originadas en esas localizaciones son muy frecuentes en los seres humanos. Estas mucinas, en los epitelios neoplásicos, sufren alteraciones que se manifiestan en su expresión, ya sea disminuyendo o aumentando la misma, o bien cambiando su patrón de expresión. Se ha encontrado que estos cambios estarían involucrados en el crecimiento y diseminación tumoral, que, en última instancia, es la causa de muerte del paciente portador de un tumor maligno.

OBJETIVOS

1. Objetivo general.

Analizar el patrón de expresión y la localización específica de las mucinas y de Rhb2, como así también de los antígenos carbohidratos asociados, en los epitelios normales de distintos estadios de desarrollo prenatal de la rata, y comparar con los patrones de expresión hallados en ratas adultas. Por otra parte, se procura estudiar la expresión y localización específica de las mucinas en diferentes estadios de desarrollo postnatal de la glándula mamaria y comparar con los patrones de expresión hallados en neoplasias mamarias de rata. El cáncer de mama constituye la primera causa de muerte por tumores en mujeres en el mundo. En Argentina, se producen 5400 muertes por año a causa de esta enfermedad y se estima que se producirán 18000 casos nuevos por año. Las mucinas son glicoproteínas que se expresan en los epitelios normales y sufren alteraciones en los neoplásicos que favorecen su crecimiento y diferenciación. La MUC1 es la mucina característica de la glándula mamaria normal y neoplásica y hasta se la ha propuesto como posible blanco para inmunoterapia. Es por ello que se escogió a la glándula mamaria como modelo de desarrollo en el cual comparar los patrones de expresión de las mucinas entre células tumorales y células normales en crecimiento. Esta información podría proporcionar una mayor comprensión acerca del rol biológico de estas proteínas y carbohidratos asociados, en la formación y diferenciación normal de los epitelios, como así también establecer modelos de desarrollo, con fines comparativos de los procesos patológicos que afectan a los epitelios.

2. Objetivos específicos.

Los objetivos del presente estudio pueden resumirse en los siguientes puntos:

Objetivos

- ✓ Estudiar la expresión celular y tisular de las mucinas Muc1 (mucina asociada a membrana), Muc2 y Muc5ac (mucinas secretadas), y de Rhbdd2, con el empleo de anticuerpos específicos, en esófago, estómago, intestino delgado y grueso, páncreas, hígado, tráquea, pulmón, riñón y piel normales adultos y en los distintos estadios del desarrollo de la rata.
- ✓ Comparar el patrón de expresión embrionario con el hallado en neonatos y adultos.
- ✓ Analizar la expresión de los genes que codifican para las mucinas mencionadas a nivel de la proteína y del ARN mensajero.
- ✓ Estudiar la localización celular y tisular de los antígenos carbohidratos asociados a mucinas: Tn, TF, Lewis x (Le x) y sialil Lewis x (sLe x), en diversos tejidos epiteliales normales adultos y en los distintos estadios del desarrollo de la rata.
- ✓ Comparar el patrón de expresión embrionario con el hallado en neonatos y adultos.
- ✓ Estudiar la localización celular y tisular de las mucinas Muc1, Muc2 y Muc5ac, con el empleo de anticuerpos específicos, durante el desarrollo postnatal de la glándula mamaria de la rata.
- ✓ Comparar dicha expresión con la hallada en tumores mamarios de rata.
- ✓ Analizar la expresión de los genes que codifican para las mucinas mencionadas, en los distintos estadios de desarrollo de la glándula mamaria y en los tumores asociados a la misma, a nivel del ARN mensajero.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Grupo de estudio y muestras.

1.1. Animales.

Se emplearon embriones y fetos de ratas (*Rattus norvegicus*, variedad Wistar) de 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20 días de gestación (13G, 14G, 15G, 16G, 17G, 18G, 19G y 20G), neonatos de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 y 25 días de nacimiento (1DP, 2DP, 3DP, 4DP, 5DP, 6DP, 7DP, 8DP, 9DP, 10DP, 15DP Y 25DP) y adultos de 2-3 meses, de 12 meses y de 24 meses de vida. Se estudiaron 8 individuos de cada uno de los momentos de desarrollo analizados.

Las ratas empleadas pertenecían a la cepa WKAH/Hok y fueron criadas y producidas en sistema cerrado bajo barreras en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata.

El momento de la cópula, determinado por la presencia de un tapón vaginal en la hembra, fue considerado como el día cero de la gestación [Theiler K, 1989].

Los órganos estudiados fueron: esófago, estómago, intestino delgado, intestino grueso, páncreas, hígado, glándulas salivales, tráquea, pulmón, riñón, piel y glándula mamaria.

Este trabajo de investigación fue realizado conforme a la *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the National Institute of Health* (NIH, USA, Publication N° 85-23, revised 1996). Los animales fueron sacrificados en cámaras conteniendo CO₂. Inmediatamente fueron disecados y los fetos removidos. Se utilizó material quirúrgico esterilizado y se trabajó sobre hielo.

1.2. Procesamiento de muestras embrionarias y fetales.

Los embriones y fetos fueron obtenidos por laparotomía e histerectomía de las hembras preñadas. Luego de la extirpación del saco embrionario, se procedió a la separación de

Materiales y métodos

los fetos de diferentes momentos de la gestación en grupos, cada uno de los cuales recibió el tratamiento indicado para su uso en el estudio de acuerdo a la metodología empleada:

- Para la técnica de inmunohistoquímica (IHQ), los fetos fueron lavados en buffer fosfato salino (PBS) 0,01 M pH= 7,4, fijados en una solución de PBS/formaldehído 10% durante 3 horas y pasados por 3 series de alcohol etílico 30%, 50% y 70%, de 20 minutos cada una.
- Para el análisis mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS/PAGE) y western blot (WB) se procedió a la disección de fetos de 16, 17, 18, 19 y 20 días de gestación. Se obtuvieron los órganos que luego fueron colocados en buffer de lisis (TRIS 10 mM, ClNa 150 mM y fenil metil sulfonyl fluoruro 1 mM, PMSF) pH= 7,4 en una relación 4 ml/g para su posterior homogeneización.
- Para el análisis de la expresión a nivel del ARN mensajero, fetos de 16, 17, 18, 19 y 20 días de desarrollo fueron disecados y los órganos removidos, colocados en ARN Later® (Invitrogen Corp., CA, EEUU) a - 20° C a fin de conservar la integridad de la muestra, para la posterior purificación del ARN total específica de tejido.

1.3. Procesamiento de muestras de neonatos y adultos.

Para su procesamiento, los animales neonatos y adultos, fueron disecados y de cada uno se extrajeron los siguientes órganos: esófago, estómago, intestino delgado (duodeno), intestino grueso (colon), glándulas salivales, páncreas, hígado, tráquea, pulmón, riñón, piel y glándula mamaria. Considerando las distintas etapas en el desarrollo postnatal de la glándula mamaria comentadas en la introducción, se incluyeron muestras de glándula mamaria de las siguientes etapas: juvenil (7DP), prepuberal (15DP), puberal

(25DP), adulta virgen (60DP), preñez (12G - 20G), lactancia, involución post-lactancia (10 días post-destete) e involución senil (24 meses de vida). También se analizaron muestras de carcinomas y lesiones tisulares benignas asociadas a la glándula mamaria, obtenidas de ratas adultas de 22 meses de vida.

Luego de la disección, de cada órgano se extrajeron 8 porciones de tejido de aproximadamente 2 cm² que fueron colocadas sobre cápsulas de Petri y lavadas con PBS frío. Tres de ellas fueron fijadas en PBS/formaldehído 10%, otras tres fueron incluidas en buffer de lisis, para su posterior homogeneización, y las otras dos porciones de tejido, fueron colocadas en ARN Later® a - 20° C a fin de conservar la integridad de la muestra, para el posterior análisis de expresión a nivel del ARNm.

2. Anticuerpos utilizados.

Se emplearon anticuerpos monoclonales (AMo) y policlonales (APo) dirigidos contra las mucinas y carbohidratos asociados a ellas. En la Tabla 2 se detallan los anticuerpos utilizados.

Tabla 2. Descripción de anticuerpos.

Antígeno	Epitope	Anticuerpo	Isotipo y Fuente	Referencia
MUC1CT	SSLSYNTPAVAATSANL (últimos 17 aa)	CT33	IgG conejo, APo	Croce et al., 2006
MUC1	Secuencia peptídica N-terminal	EP1024Y	IgG conejo, AMo	ABCAM
MUC2	Secuencia peptídica C-terminal	H-300	IgG conejo, APo	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
MUC5AC	ND	45M1	IgG1 ratón, AMo	Bara et al., 1991
RHBDD2	Secuencia peptídica 18 aa	TA306891	IgG conejo, APo	ORIGENE

Materiales y métodos

Lewis x	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal-R	KM380	IgM ratón, AMo	Hanai et al., 1986
Sialil Lewis x	NeuAc2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal-R	KM93	IgM ratón, AMo	Hanai et al., 1986
Tn	GalNAc α -R	HB-Tn1	IgM ratón, AMo	DAKO
TF	Gal β 1-3GalNAc α 1-R	HB-T1	IgM ratón, AMo	DAKO

TF= antígeno Thomsen- Friedenreich. AMo: anticuerpo monoclonal; APo: anticuerpo policlonal.

3. Inmunohistoquímica (IHQ).

Luego de la fijación y deshidratación en etanol, las muestras fueron lavadas en xilol e incluidas en parafina. Se realizaron cortes histológicos de 3 μ m de espesor con la utilización de un micrótopo. De cada muestra se coloreó un corte con hematoxilina-eosina para el análisis morfológico.

La técnica de IHQ fue desarrollada de acuerdo al procedimiento habitual [Croce et al., 2003]. Para la recuperación antigénica se incubaron las muestras en buffer citrato de sodio 10mM a 100° C, 5 minutos. Luego de 3 lavados con PBS, se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente, durante toda la noche a 4° C; se hicieron 3 lavados con PBS y se adicionó el segundo anticuerpo unido a peroxidasa, durante 60 minutos a temperatura ambiente. Para la visualización de la inmunotinción se utilizó diaminobencidina como sustrato (DAB) (SIGMA). Finalmente, los cortes histológicos fueron teñidos con hematoxilina (BIOPUR, Argentina), como coloración de contraste. Los controles negativos fueron incubados con PBS en reemplazo del anticuerpo primario. Las muestras fueron examinadas y analizadas con un microscopio óptico. Se registró el patrón de inmunotinción semicuantitativamente, como ausente (-), leve (+), moderado (++) o fuerte (+++) [Feickert et al., 1990]. Para la evaluación se diferenció la inmunotinción del citoplasma, membrana plasmática y núcleo. Las células fueron consideradas positivas cuando al menos uno de estos componentes lo era y la marcación

se clasificó como: citoplásmica, lineal (membranosa), nuclear, o mixta [Renkonen et al., 1997; Croce et al., 1997; Luna Moré et al., 2001].

4. Obtención de homogenados y fracciones subcelulares.

La técnica se llevó a cabo según el procedimiento habitual en nuestro laboratorio [Lacunza et al., 2009]. Las muestras colocadas en buffer de lisis fueron homogeneizadas con la utilización de un equipo politrón PT1200 y el homogenado resultante fue pasado luego por un kit de disociación celular (SIGMA) y colocado en un tubo de centrifuga. De una primera centrifugación (1500 rpm, durante 15 minutos) se obtuvo un precipitado correspondiente a la fracción nuclear. El sobrenadante (homogenado) se centrifugó a 40000 rpm durante 30 minutos a 4° C, obteniéndose así un precipitado correspondiente a la fracción membrana y un sobrenadante denominado fracción citoplasmática. Estas fracciones, fueron dializadas en tubos de diálisis sumergidos en PBS durante 48 horas y en agua destilada otras 48 horas a temperatura ambiente. Finalmente, fueron concentradas con azúcar y almacenadas a -20° C hasta su posterior utilización.

5. Medición de la concentración proteica mediante el método de Bradford.

Se midió la concentración proteica de las fracciones subcelulares obtenidas mediante el método de Bradford [Kruger, 1994]. El ensayo se realizó en microplacas de PVC, de 96 pocillos y fondo plano, flexibles (Greiner 96 flat). Se utilizó un lector de placas para medir los niveles de absorbancia de las muestras. De acuerdo al valor de absorbancia obtenido, se calculó el valor de la concentración gráfica y analíticamente. Finalmente, se ajustó el valor de las concentraciones a 1 - 10 µg/ml.

El método se basa en la unión del colorante Coomassie blue G250 (SIGMA) a la proteína. El mismo se halla en diversas formas iónicas, siendo la forma más aniónica, la que tiene

la capacidad de enlazarse a la proteína. Esta forma presenta una coloración azul y una absorbancia máxima de 590 nm. Por lo que es posible estimar la cantidad de proteína en una muestra determinando la cantidad de colorante en la forma iónica azul. Esto se logra mediante la medición de la absorbancia en la solución a 590 nm.

6. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS/PAGE).

Las fracciones subcelulares fueron analizadas mediante electroforesis en geles discontinuos de poliacrilamida [Lacunza et al., 2009]. Se utilizaron distintas concentraciones de poliacrilamida en las fases de *resolving/stacking* según el ensayo: 12,5%/4%, 10%/4% y 8%/4%. Las muestras fueron previamente tratadas con glicerol, SDS 25% (SIGMA, Chemical Co., St. Louis, USA) y 2-Mercaptoetanol (SIGMA) en una relación 2:1 (en condiciones reductoras) o sin 2-mercaptoetanol (en condiciones no reductoras). Luego fueron calentadas a 90° C durante 5 minutos. Se sembró de 40– 50 µg de muestra por calle y se efectuó la corrida electroforética en un equipo vertical (GIBCO BRL 250, EEUU) a voltaje constante (120 V) durante 2 horas a temperatura ambiente. Una vez resueltas las proteínas, los geles fueron fijados en una solución de metanol 40% y ácido acético 7% durante toda la noche y coloreados con Coomasie blue, o transferidos a membranas de nitrocelulosa.

7. Western blot (WB).

Las proteínas resueltas en el gel fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Protran; Schleicher & Schuell; Bioscience, Germany) [Towbin et al., 1979]. La electrotransferencia se realizó a voltaje constante 150 V en un equipo vertical (GIBCO BRL 250, EEUU) durante 1 hora 30 minutos. Los sitios inespecíficos se bloquearon

incubando las membranas en leche descremada en polvo diluida al 3% en PBS/Tween-20 0,05% (PBST), en agitación durante 3 horas a temperatura ambiente. A continuación se hicieron 4 lavados de 10 minutos cada uno con PBST. Las membranas se incubaron luego con el anticuerpo primario correspondiente durante toda la noche en agitación a 4°C. Se lavó 4 veces con PBST y se incubó con el segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa, durante 1 a 3 horas a temperatura ambiente en agitación. Se hicieron 4 lavados con PBST y se procedió al revelado de la reacción.

La detección de la señal se realizó en un sistema de quimioluminiscencia y la siguiente exposición en una placa radiográfica. El reactivo quimioluminiscente que se empleó consiste en la mezcla de volúmenes iguales de dos soluciones: la solución I [buffer Tris 100 mM pH 8,5 luminol 2,5 mM, ácido cumárico 0,5 mM] y la solución II [H₂O₂ al 1% en buffer Tris 100 mM pH 8,5].

8. Dot blot.

Con el objetivo de determinar las condiciones óptimas para la detección del antígeno mediante los distintos anticuerpos empleados en la técnica de WB, se llevó a cabo el método de Dot blot [Zeder-Lutz et al., 2006]. Una gota (7-12 µl) de homogenado de los distintos tejidos analizados fue tratada con SDS y 2-mercaptoetanol (en condiciones reductoras) o sin 2-mercaptoetanol (en condiciones no reductoras), calentada a 90° C durante 5 minutos y colocada sobre membranas de nitrocelulosa. Se dejó secar al aire y se bloqueó con leche en polvo diluida al 3% en PBST durante 1 hora. A continuación se hicieron 3 lavados con PBST y se incubó con el anticuerpo primario. Los controles negativos fueron incubados con PBST en lugar del anticuerpo. Se hicieron 3 lavados con PBST y se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con la peroxidasa. Se reveló

empleando un sistema de quimioluminiscencia y la siguiente exposición en una placa radiográfica.

9. Análisis de la expresión de los transcritos de Muc1, Muc2 y Muc5ac mediante retrotranscripción (RT).

9.1. Obtención de ARN a partir de muestras de tejido fresco.

Se extrajo ARN de las muestras de riñón, pulmón, estómago, intestino delgado y piel obtenidas en la disección de los fetos de 16, 17, 18, 19 y 20 días de gestación y de los neonatos de 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 días.

Con el fin de evitar la degradación del ARN, el material biológico fue colocado hasta su utilización en tubos eppendorf® con 1 ml de RNAlater® (AMBION, Austin, TX, EEUU) a -20° C. Se descartó el RNAlater y se adicionó 1 ml de buffer TRI Reagent® (MRC Company) [Chomczynski et al., 1987] (Figura 22); se homogeneizó con un equipo Polytron® PT1200 (Kinematica AG, Suiza). Luego, se suplementó el homogenado con 0,2 ml de cloroformo, se agitó vigorosamente y se centrifugó a 13.000 rpm en microcentrífuga durante 10 minutos. Se obtuvo una mezcla en 3 fases: una zona inferior roja (fase fenol-cloroformo), una interfase y una fase acuosa. Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo, se adicionó 0,5 ml de isopropanol para la precipitación del ARN. Se centrifugó a 13.000 rpm por 8 minutos, se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 1 ml de alcohol etílico 75%. Se removió el alcohol de lavado y se dejó secar brevemente el precipitado al aire. Finalmente, se disolvió el ARN con 25-50 µl de agua previamente tratada con dietilpircarbonato (DEPC; Genbiotech).

9.2. Obtención de ARN a partir de muestras de tejido parafinado.

Se extrajo ARN de las muestras parafinadas de piel de neonatos de 6 días de nacimiento y de adultos de más de 10 semanas de vida [Liu et al., 2011]. Por otro lado, se llevó a cabo la extracción de ARN a partir de muestras parafinadas de glándula mamaria de neonatos de 7, 15 y 25 días (etapa juvenil, prepuberal y puberal) y de adultos en etapas de preñez (temprana y avanzada, 14 y 20 días de gestación, respectivamente), lactancia e involución, post-lactancia y senil (24 meses de vida).

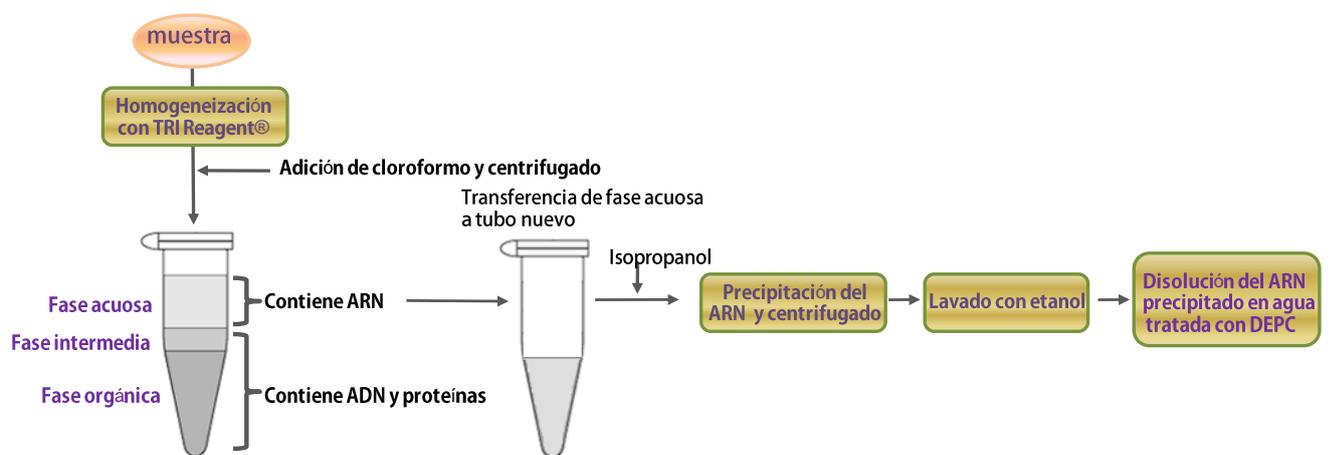


Figura 22. Esquema representativo de la técnica de extracción de ARN empleada.

Se realizaron 6 cortes histológicos de 10 µm de espesor con la utilización de un micrótopo y se colocaron en tubos libres de ARNasa. Se adicionaron rápidamente 800 µl de buffer TRI Reagent® (Genbiotech, Argentina) y 100 µl de proteinasa K (20mg/ml). Se mezcló en vortex y se incubó a 55 °C durante 1 h. Luego se llevó a 70°C durante 10 min para desactivar a la proteinasa K. Se suplementó el homogenado con 0,2 ml de cloroformo y se procedió de igual forma en que se mencionó previamente para la obtención de ARN a partir de muestras de tejido fresco.

9.3. Electroforesis desnaturalizante y control de calidad del ARN.

Uno de los parámetros que gobierna la migración de los ácidos nucleicos en un campo eléctrico es la conformación molecular: la estructura secundaria o “ARN en horquilla” impide la separación electroforética basada solamente en el peso molecular. Algunas moléculas de ARN, de las cuales el ARNt es el mejor ejemplo, manifiestan una complementariedad de bases tan alta que la misma molécula adquiere una estructura terciaria estable. Por lo tanto, moléculas de ARN idénticas que exhiben grados de variación en el apareamiento intramolecular de pares de bases, migrarán hacia el ánodo a diferentes velocidades, resultando en una mancha difusa en el gel correspondiente a los distintos transcriptos de ARN. Para evitar este problema, la electroforesis de ARN se llevó a cabo en condiciones desnaturalizantes [Chomczynski et al., 1993]. Asimismo, como resultado de ésta y debido a que el ARNr es el producto predominante de la transcripción (80 - 85% del ARN celular), una alícuota del ARN total debería resolverse electroforéticamente en dos bandas claramente distinguibles, correspondientes a los ARNr 28S y 18S. La aparición de estas dos bandas es evidencia suficiente de la integridad de la muestra, es decir que el ARN no se halle degradado.

La electroforesis desnaturalizante se llevó a cabo en un gel de agarosa 1,2% tratado con 10 ml de buffer MOPS 10x (Promega) y 5 ml de formaldehído 37%. Para la preparación de las muestras se mezclaron 4,7 µl de ARN, 2 µl de buffer MOPS 5x, 3,3 µl de formaldehído y 10 µl de formamida; se desnaturalizaron a 65° C durante 10 minutos y se adicionaron luego 4 µl de azul de bromofenol. La corrida electroforética se efectuó a 5 voltios por centímetro de longitud del gel. Se utilizaron pipetas, puntas y tubos tipo eppendorf® esterilizados y libres de RNAsa. El área de trabajo fue previamente tratada con RNase *away* (AMBION, Austin, TX, EEUU).

9.4. Síntesis de ADNc mediante RT-PCR.

Previo a la reacción de RT-PCR las muestras de ARN fueron tratadas con Desoxirribonucleasa I (DNasaI) (Fermentas Life Sciences, Harrington Crt, Burlington, Ontario, Canadá); en un tubo eppendorf® se mezclaron 7,5 µl de las muestras de ARN, 1 µl de buffer de reacción 10x (Fermentas Life Sciences) y 1,5 µl de DNasaI (1 U/µl). Se incubó a 37° C durante 30 minutos y se adicionó luego 1 µl de EDTA 25 mM, incubándose durante 10 minutos a 65° C [Lacunza et al., 2009].

A continuación se mezclaron en un tubo eppendorf® 10 µl del ARN total, tratado con DNasaI, con 1 µl de DNTPs 10 mM (Genbiotech) y 1 µl de oligonucleótidos (dT) 18 10µM (Genbiotech, Argentina) que se unen complementariamente a la cola de poli-A del ARN mensajero. Se desnaturalizó la mezcla a 65° C, 5 minutos, se enfrió con hielo y se agregaron los siguientes componentes: 4 µl de buffer (Genbiotech), 2 µl de DTT 100 mM (Genbiotech), 0,25 µl de transcriptasa reversa Super Script IIRT (Life Technologies) y 1,75 µl de agua tratada con DEPC (Genbiotech). Se mezcló la solución, se centrifugó brevemente y se incubó en termociclador a 42° C durante 2 horas y a 70° C durante 15 minutos. El ADNc obtenido (volumen final 20 µl) se almacenó en freezer hasta su utilización.

9.5. Medición de la concentración de ADNc.

Se midió la concentración de ADNc de las muestras estudiadas mediante un espectrofotómetro NanoDrop 2000® y se emplearon concentraciones de 400 a 500 ng en las reacciones PCR según el cebador analizado.

Material es y métodos

9.6. Cebadores (Primers).

En la Tabla 3 se describen las secuencias de oligonucleótidos que se emplearon en el análisis de la expresión de las mucinas Muc1, Muc2 y Muc5ac mediante RT-PCR. También se incluyen las secuencias de los cebadores empleados para el análisis de la expresión del ARN 18S, el cual se utilizó como transcrito de referencia (normalizador).

Tabla 3: Descripción de la secuencia de oligonucleótidos que se emplearon en el análisis de RT-PCR

Transcripto	Cebadores	Referencia
Muc1	Forward: 5'-ACACCCATGGGCGCTATGT-3' Reverse: 5'-AAGTTGGCAGAAGTGGCTG-3'	Lacunza et al., 2009
Muc2	Forward: 5'-CAGAGTGCATCAGTGGCTGT-3' Reverse: 5'-CCCGTCGAAGGTGATGTAGT-3'	Amit-Romach et al., 2006
Muc5ac	Forward: 5'-AACTCTGCCCACCACAAGC-3' Reverse: 5'-TGCCATCTATCCAATCAGTCCAAT-3'	Li et al., 2007
ARN 18S	Forward: 5'-GTAACCCGTTGAACCCATT-3' Reverse: 5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3'	Schmittgen et al., 2000

Con el objeto de analizar a priori la eficiencia de los cebadores seleccionados y el tamaño de los fragmentos de amplificación se empleó el programa **Primer-BLAST** (Basic Local Alignment Search Tools). Este programa permite comparar las secuencias de los cebadores con secuencias previamente depositadas en bases de datos, buscando similitudes entre las mismas.

Primer pair 1

	Sequence (5'>3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity
Forward primer	ACACCCATGGGCGCTATGT	19	55.76	57.89	8.00
Reverse primer	AAGTTGGCAGAAGTGGCTG	19	52.51	52.63	3.00

Products on target templates

>NM_012602.1 Rattus norvegicus mucin 1, cell surface associated (Muc1), mRNA

```
product length = 127
Forward primer 1 ACACCCATGGGCGCTATGT 19
Template 1893 ....T..C..A..... 1911

Reverse primer 1 AAGTTGGCAGAAGTGGCTG 19
Template 2019 .....C.....T.. 2001
```

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity
Forward primer	CAGAGTGCATCAGTGGCTGT	20	54.52	55.00	4.00
Reverse primer	CCCGTCGAAGGTGATGTAGT	20	53.41	55.00	6.00

Products on target templates

>XM_002725730.2 PREDICTED: Rattus norvegicus mucin 2, oligomeric mucus/gel-forming (Muc2), mRNA

product length = 242
 Forward primer 1 CAGAGTGCATCAGTGGCTGT 20
 Template 2255 2274
 Reverse primer 1 CCCGTCGAAGGTGATGTAGT 20
 Template 2496 2477

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity
Forward primer	AACTCTGCCACCACAAGC	19	54.71	57.89	2.00
Reverse primer	TGCCATCTATCCAATCAGTCCAAT	24	53.83	41.67	3.00

Products on target templates

>XM_001063331.3 PREDICTED: Rattus norvegicus mucin 5AC, oligomeric mucus/gel-forming (Muc5ac), mRNA

product length = 149
 Forward primer 1 AACTCTGCCACCACAAGC 19
 Template 4692 4710
 Reverse primer 1 TGCCATCTATCCAATCAGTCCAAT 24
 Template 4840 4817

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity
Forward primer	GTAACCCGTTGAACCCCAT	20	58.09	50.00	5.00
Reverse primer	CCATCCAATCGGTAGTAGCG	20	57.93	55.00	5.00

Products on target templates

>NR_046237.1 Rattus norvegicus 18S ribosomal RNA (Rn18s), ribosomal RNA

product length = 151
 Forward primer 1 GTAACCCGTTGAACCCCAT 20
 Template 1582 1601
 Reverse primer 1 CCATCCAATCGGTAGTAGCG 20
 Template 1732 1713

Según el programa **Primer-BLAST**, con el empleo de los cebadores seleccionados para el análisis de la expresión de las mucinas Muc1, Muc2 y Muc5ac de la rata *Rattus norvegicus* se obtendrán fragmentos de amplificación de 127 pb, 242 pb y 149 pb, respectivamente. Mientras que con el empleo de los cebadores utilizados para el estudio de la expresión del ARN 18S se obtendrán fragmentos de 151 pb.

9.7. Detección de los productos de amplificación de Muc1, Muc2, Muc5ac y ARN 18S mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Obtenido el ADNc de los distintos tejidos analizados, para las reacciones de amplificación se utilizó 2,5 µl de Buffer PCR (Promega, Madison, Wisconsin, EEUU), 1 µl de MgCl₂ 2 mM (Promega), 2,5 µl de DNTP's 2 mM, 0,5 µl de cada uno de los cebadores (F y R1) en una concentración de 12,5 picomoles/ µl, 0,2 µl de Taq Polimerasa (Promega), 2-8 µl de muestra (400 a 500 ng) y 10- 16 µl de agua [Abba et al., 2009]. Las condiciones de ciclado para cada uno de los genes en estudio incluyeron:

- **Muc1:** una desnaturalización inicial de 2 min a 94° C; 40 ciclos de 1 min a 94° C, 40 seg a 57° C y 1 min a 72° C; y una extensión final de 5 min a 72° C.
- **Muc2:** una desnaturalización inicial de 5 min a 94°C, 40 ciclos de 30 seg a 94°C, 1 min a 60°C y 30 seg a 68°C; y una extensión final de 7 min a 68°C.
- **Muc5ac:** una desnaturalización inicial de 3 min a 95°C, 45 ciclos de 20 seg a 94°C, 20 seg a 65°C y 20 seg a 72°C; y una extensión final de 2 min a 72°C.
- **ARN 18S:** una desnaturalización inicial de 2 min a 94°C; 35 ciclos de 40 seg a 94°C, 50 seg a 50°C y 30 seg a 72°C; y una extensión final de 5 min a 72°C.

Se sembraron 6 µl del amplificado en un gel de poliacrilamida 8% y se tiñó con plata.

10. Análisis estadístico.

Los resultados obtenidos mediante la técnica IHQ fueron analizados con el empleo de la Prueba de Chi cuadrado de Pearson (χ^2), la evaluación de los coeficientes de asociación Gamma y Tau-b de Kendall, la confección de mapas de calor y agrupamientos jerárquicos, y por último, el análisis factorial.

10.1. Prueba de Chi Cuadrado de Pearson (χ^2).

Para la estimación del grado de asociación entre dos variables de tipo cualitativo se empleó la prueba de Chi Cuadrado (χ^2) con la corrección de Yates [Greenberg et al., 2001]. Algunos autores sugieren que, con muestras pequeñas, esta corrección permite que el estadístico χ^2 se ajuste mejor a las probabilidades de la distribución χ^2 (Pérez, 2001). La misma consiste en restar 0,5 puntos al valor absoluto de la diferencias (O - E) del estadístico χ^2 , antes de elevarlo al cuadrado.

$$\chi^2 = \frac{\sum [(O - E) - 0.5]^2}{E}$$

Donde O es la frecuencia absoluta observada y E es la frecuencia absoluta esperada o teórica.

Se consideraron diferencias estadísticamente significativas a los valores de $p < 0,05$.

10.2. Coeficiente Gamma (γ) de Goodman y Kruskal y coeficiente de correlación de Kendall.

Las medidas de asociación Gamma y Tau-b de Kendall se basan en el número de concordancias y discordancias que aparecen al comparar las puntuaciones asignadas a los mismos casos según dos criterios diferentes.

Las medidas Gamma y Tau-b de Kendall estiman el grado y tipo de asociación entre dos variables cualitativas, con distinto número de categorías cualitativas en escala ordinal.

El coeficiente Gamma (γ) toma valores entre [-1, 1].

$$\gamma = C - D / C + D$$

C = total de concordancias.

D= total de discordancias

Materiales y métodos

Este análisis excluye los valores idénticos entre ambas variables (E, empates).

El coeficiente Tau incluye las situaciones de empate en su análisis, y toma también valores entre [-1, 1] [Greenberg et al., 2001].

El coeficiente Tau-b de Kendall incluye los empates considerando por separado los que aparecen en la variable X1 (E_{x1}) y los que aparecen en la variable X2 (E_{x2}).

$$\tau_b = C - D / \sqrt{(C+D+E_{x1})(C+D+E_{x2})}$$

Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante el empleo del programa de análisis estadístico *SPSS Statistics 17.0*[®].

10.3. Análisis mediante mapas de calor y agrupamientos jerárquicos.

Se realizó una matriz de expresión en la que las filas corresponden a las muestras y las columnas a los antígenos. En la intersección de cada antígeno con cada muestra se colocó el valor de expresión codificado según la intensidad de reacción: 1- leve; 2- moderada; 3- fuerte y 0 cuando no hubo reacción. Obtenida la matriz, se empleó el programa *Multiexperiment Viewer*[®] [Saeed et al., 2006] para representar gráficamente la matriz como un mapa de calor y para aplicar el método estadístico no supervisado de agrupamientos jerárquicos, el cual permite agrupar las muestras y antígenos en grupos con perfiles similares [Hastie et al., 2009].

10.4. Análisis Factorial.

El análisis factorial es una técnica de reducción de datos que sirve para encontrar grupos homogéneos de variables a partir de un conjunto numeroso de variables. Esos grupos homogéneos se forman con las variables que correlacionan mucho entre sí y

procurando, inicialmente, que unos grupos sean independientes de otros. El análisis factorial consta de cuatro fases características: el cálculo de una matriz capaz de expresar la variabilidad conjunta de todas las variables, la extracción del número óptimo de factores, la rotación de la solución para facilitar su interpretación y la estimación de las puntuaciones de los sujetos en las nuevas dimensiones [Pérez, 2001]. La matriz analizada por defecto es la matriz de correlaciones entre las variables incluidas en el estudio, es decir, los coeficientes de correlación de Pearson (r) entre cada par de variables.

El coeficiente de correlación de Pearson (r) toma valores entre $[-1, 1]$. Un valor de r cercano a 1, sugiere una correlación positiva entre las variables, es decir que si una de ellas aumenta, la otra también lo hace. Si r se aproxima a -1 se habla de correlación negativa, esto implica que si una variable aumenta, la otra disminuye. Mientras que $r = 0$ indica que no hay relación lineal entre las variables [Wesstein, 2002].

El análisis factorial se realizó mediante el empleo del programa de análisis estadístico *SPSS Statistics 17.0*®.

RESULTADOS

1. *Análisis de la expresión de las mucinas Muc1, Muc2 y Muc5ac, de los antígenos carbohidratos Tn, TF, Le x y sLe x y de Rhbddd2 en tejidos adultos.*

1.1. Muc1, Muc2 y Muc5ac.

Se analizó la expresión de las mucinas Muc1, Muc2 y Muc5ac con los Acs CT33, H-300 y 45M1, respectivamente, en diferentes órganos de rata adulta no preñada.

La mucina 1 se expresó en un 100% (8/8) en las muestras de páncreas, en un 75% (6/8) de las de estómago, en un 62,5% (5/8) de las de intestino delgado, glándulas salivales, hígado, pulmón y riñón, en un 37,5% (3/8) de las de intestino grueso, esófago y tráquea. En glándula mamaria y en piel no se observó reacción (Figura 23). El patrón de expresión en todos los casos fue predominantemente apical, si bien algunas muestras mostraron un patrón mixto (Lámina I, Figura 25).

Muc2 se expresó en un 100% (8/8) de las muestras de intestino delgado e intestino grueso y en un 62,5% (5/8) de las de estómago. En los demás tejidos analizados no se halló expresión de la mucina (Figura 23).

En intestino delgado y grueso, la reacción se visualizó predominantemente a nivel de las células caliciformes y en el contenido luminal (Lámina I, Figura 26, A y B). Mientras que el estómago mostró reacción en las células mucosas superficiales y glandulares (Lámina I, Figura 26, C).

Muc5ac se expresó en un 75% (6/8) de las muestras de estómago, en un 62,5% (5/8) de las de tráquea y pulmón, y en un 25% (2/8) de las de piel (Figura 23). En estómago la reacción se restringió a la superficie epitelial de revestimiento y glandular (Lámina II, Figura 27, A) mientras que en tráquea y pulmón fueron reactivas las células caliciformes. En piel se observó reacción a nivel de las glándulas sebáceas (Lámina II, Figura 27, B).

Resultados

Estos resultados demuestran la especificidad de los Acs en el reconocimiento de los antígenos Muc1, Muc2 y Muc5ac.

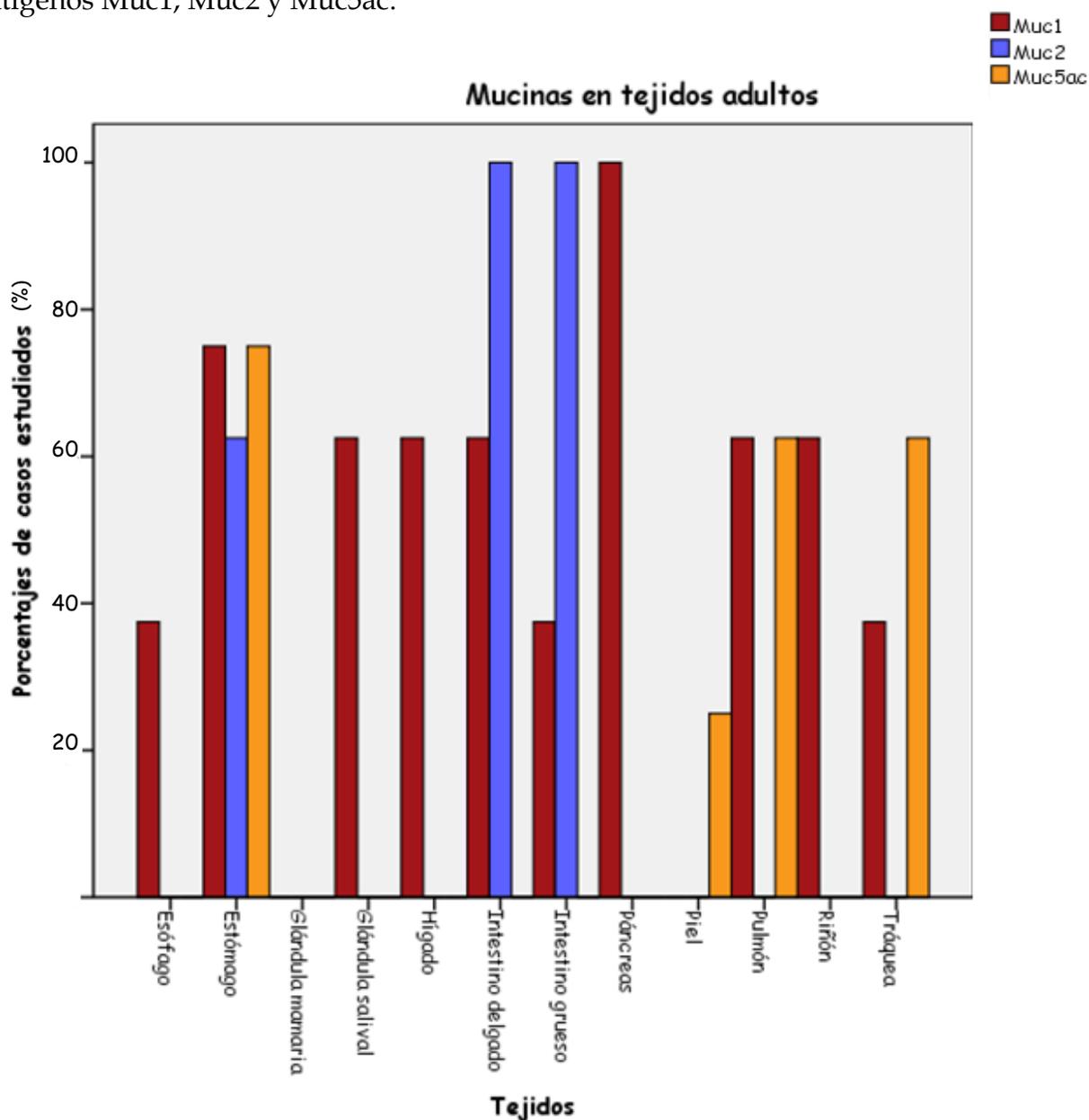


Figura 23. Resultados hallados mediante IHQ de la expresión de Muc1, Muc2 y Muc5ac en tejidos de rata

1.2. Antígenos carbohidratos Tn, TF, Le x y sLe x.

En el análisis de los antígenos carbohidratos se encontró reacción del antígeno Tn en el 100% (8/8) de las muestras de estómago, el 62,5% (5/8) de las de intestino delgado e intestino grueso, el 37,5% (3/8) de glándulas salivales y riñón (Figura 24). En todos los casos el patrón de expresión fue mixto apical (Lámina II, Figura 28 A). TF mostró

reacción en un 75% (6/8) de riñón, 62,5% (5/8) de estómago, 37,5% (3/8) de intestino delgado y grueso, glándula salival y piel (Figura 24). El patrón de expresión fue predominantemente lineal (Lámina II, Figura 28 B).

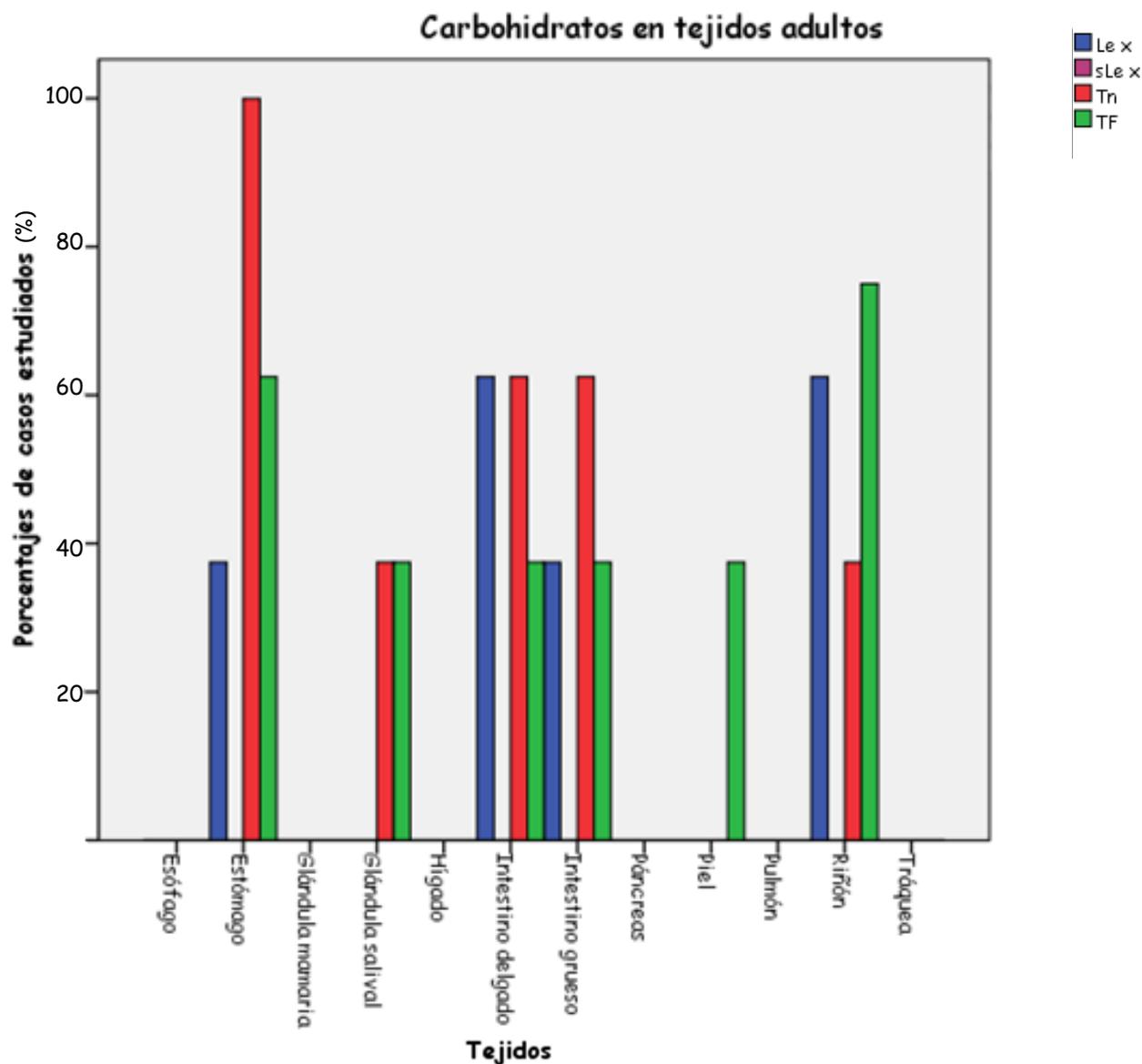


Figura 24. Resultados hallados mediante IHQ de la expresión de los antígenos carbohidratos Tn, TF, Le x y sLe x en tejidos de rata adulta.

Le x reaccionó positivamente en un 62,5% (5/8) de las muestras de intestino delgado y riñón (Figura 24) y en un 37,5% (3/8) de las de estómago e intestino grueso, mostrando un patrón de expresión mixto apical (Lámina II, Figura 28 C). Con KM93, no se observó reacción en ninguna de las muestras analizadas.

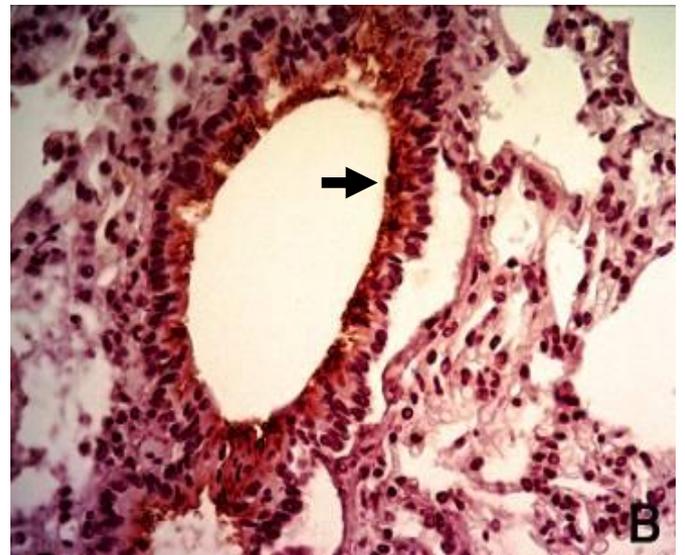
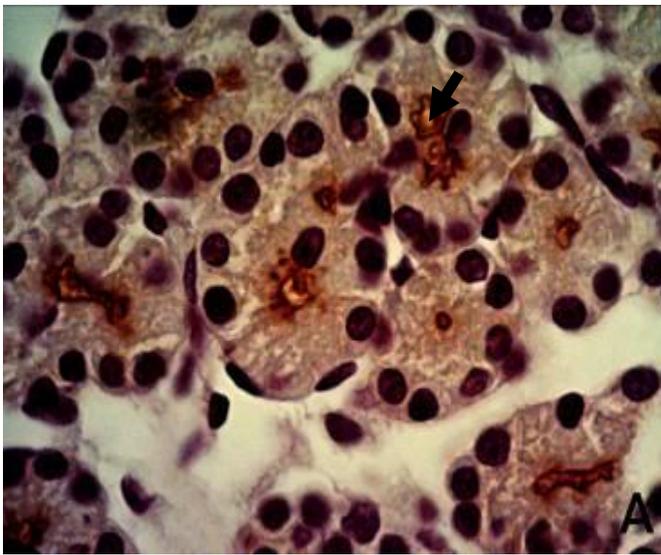


Figura 25. IHQ realizada con el empleo del Ac anti-MUC1 de (A, 1000x) páncreas, donde se visualiza el patrón predominantemente apical y (B, 400x) pulmón, en el que puede observarse una reacción mixta a nivel del bronquiolo. Las flechas señalan la reacción positiva.

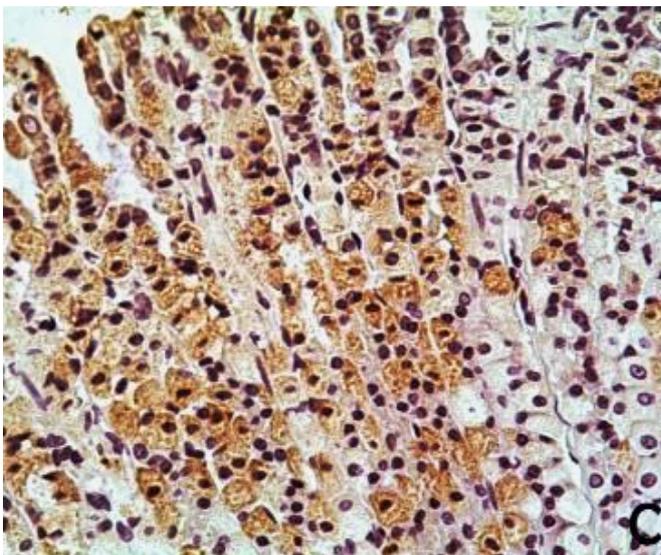
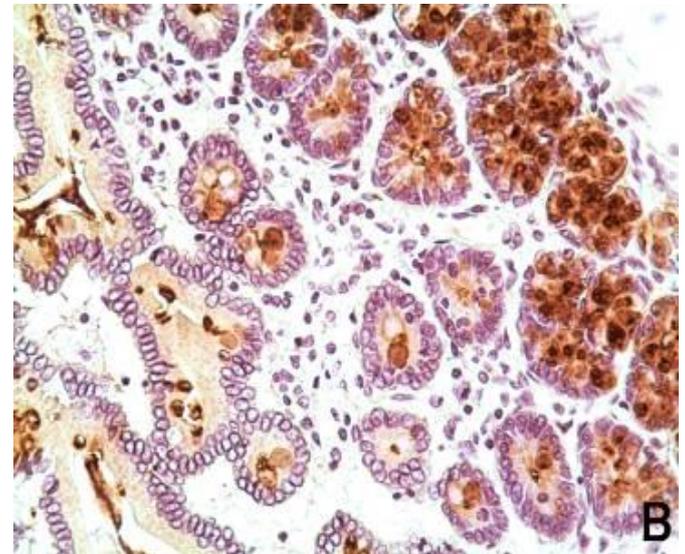
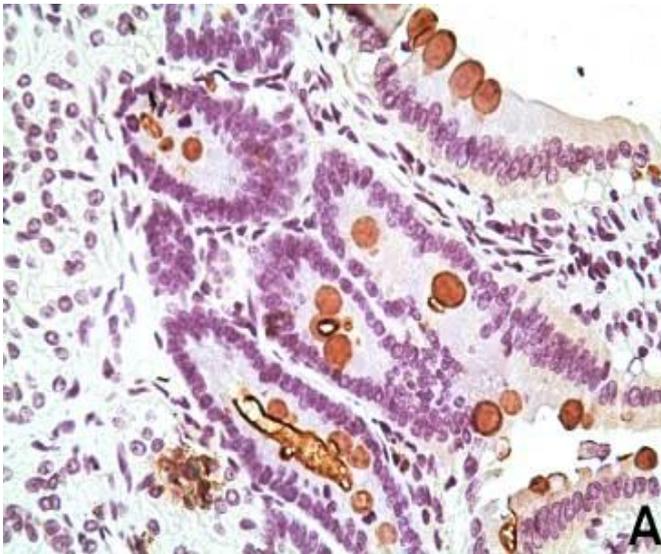


Figura 26. IHQ realizada con el empleo del Ac anti-MUC2 (400x) de tejidos adultos. A y B- intestino delgado (A) e intestino grueso (B), en ambos casos la reacción se restringe a las células caliciformes y la secreción. C- estómago, se observa la región glandular con reacción en las células mucosas.

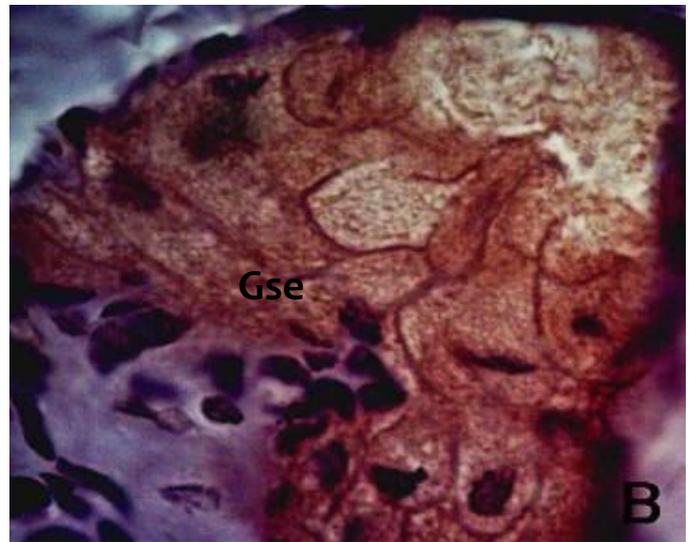
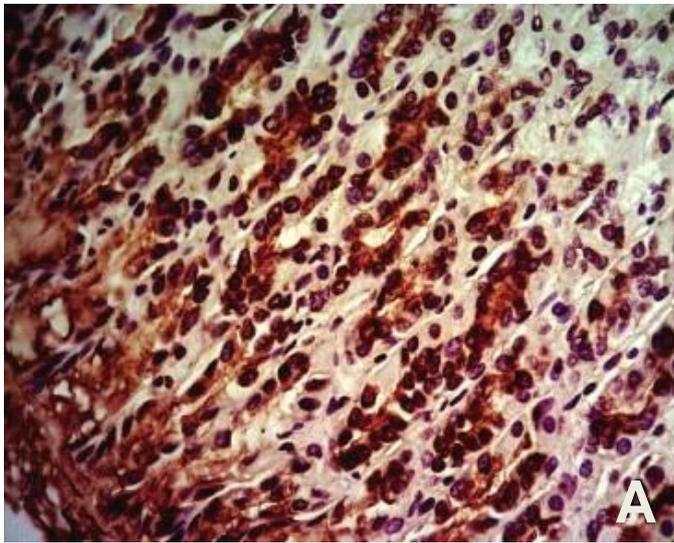


Figura 27. IHQ realizadas con el empleo del AMo anti-MUC5AC de (A, 400x) estómago, donde se observa una reacción citoplásmica apical en glándulas y superficie de revestimiento, (B, 1000x) piel de rata adulta, donde la reacción se restringió a las células de las glándulas sebáceas con un patrón citoplásmico de expresión. Gse=

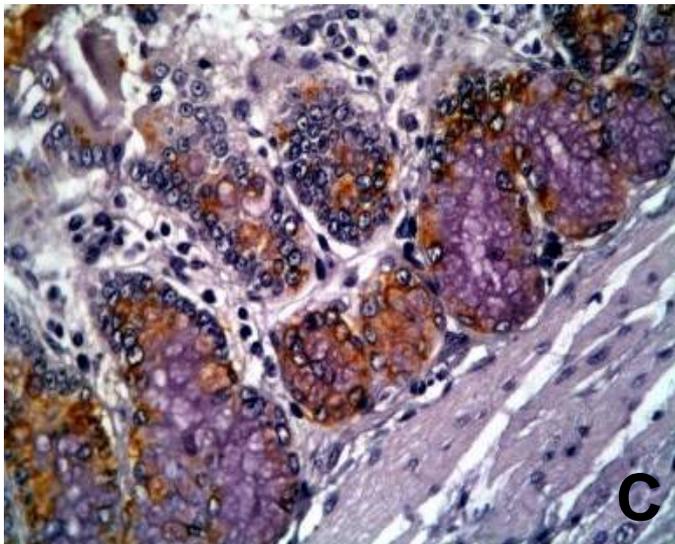
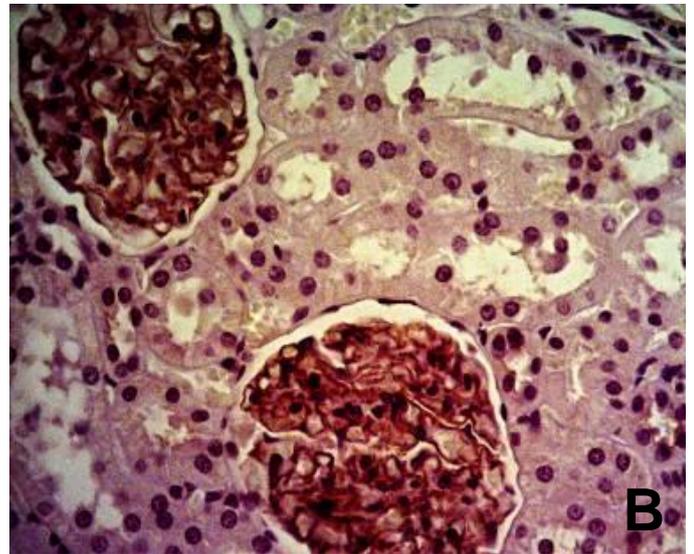
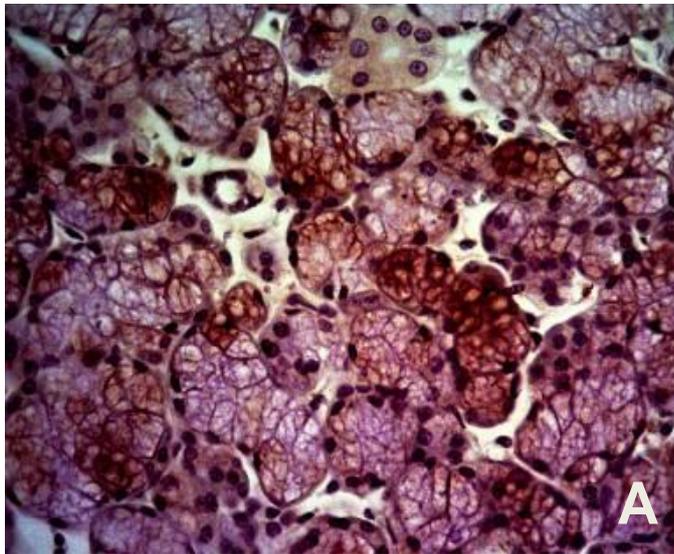


Figura 28. IHQ realizadas con el empleo de AMo dirigidos contra antígenos carbohidratos:

- A) Corte histológico de glándula salival incubado con el AMo HB-Tn1 (anti Tn) (400x). Se visualiza reacción mixta apical a nivel de los acinos mucosos de la glándula;
- B) Corte histológico de riñón incubado con el AMo HB-T1 (anti TF) (400x). Se observa reacción predominantemente lineal a nivel de los corpúsculos renales;
- C) Corte histológico de intestino grueso incubado con el AMo KM380 (anti Le x) (400x). Se muestra la región glandular con un patrón de reacción mixto apical.

Resultados

1.3. Romboide (Rhbdd2).

El anticuerpo policlonal TA306891 fue empleado para identificar y localizar la expresión del gen Rhbdd2 en distintos tejidos de la rata adulta.

Rhbdd2 se expresó en el 100% (8/8) de las muestras de estómago, intestino delgado, hígado y riñón, en el 75% (6/8) de las de pulmón y piel, en el 62,5% (5/8) de las muestras de páncreas, mientras que en glándula mamaria, glándulas salivales e intestino grueso se observó un 37,5% (3/8) de expresión, siendo en la mayor parte de los casos el patrón predominantemente mixto (Figura 29).

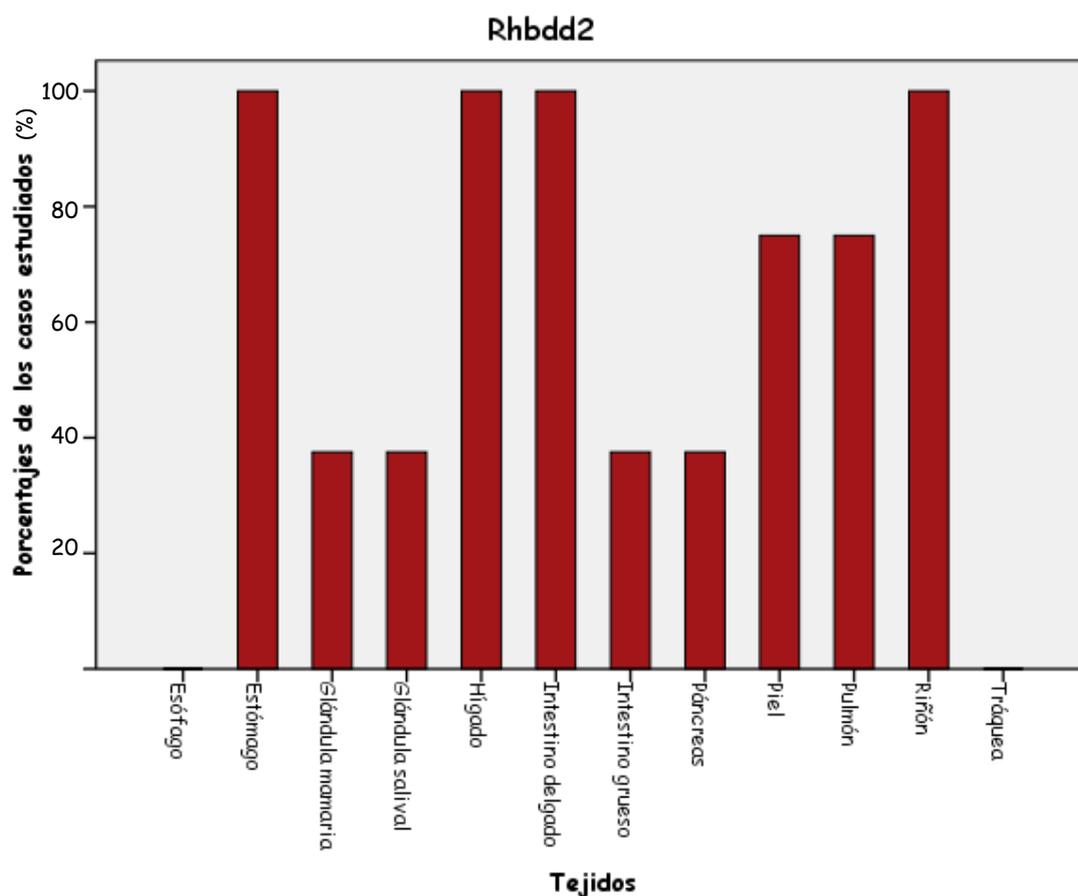


Figura 29. Resultados hallados mediante IHQ de la expresión de Rhbdd2 en tejidos de rata adulta.

En estómago la reacción se restringió a la porción glandular (Lámina III, Figura 30 A), mientras que en intestino delgado e intestino grueso se observó reacción a nivel de las

glándulas de Lieberkühn, epitelio de revestimiento y secreción (Lámina III, Figura 30 B). En estos órganos se visualizó predominantemente un patrón de reacción mixto y nuclear. Los hepatocitos mostraron un patrón de expresión citoplásmico y nuclear (Lámina III, Figura 30 C), mientras que en los túbulos renales, en bronquios y bronquíolos se observó un patrón de reacción mixto.

Las células secretoras de la glándula mamaria, los acinos serosos y mucosos de las glándulas salivales, los acinos pancreáticos y los islotes de Langerhans mostraron una reacción citoplásmica moderada. Se observó una moderada expresión de Rbddd2 en las células secretoras de las glándulas sebáceas de la piel, pero la epidermis fue negativa.

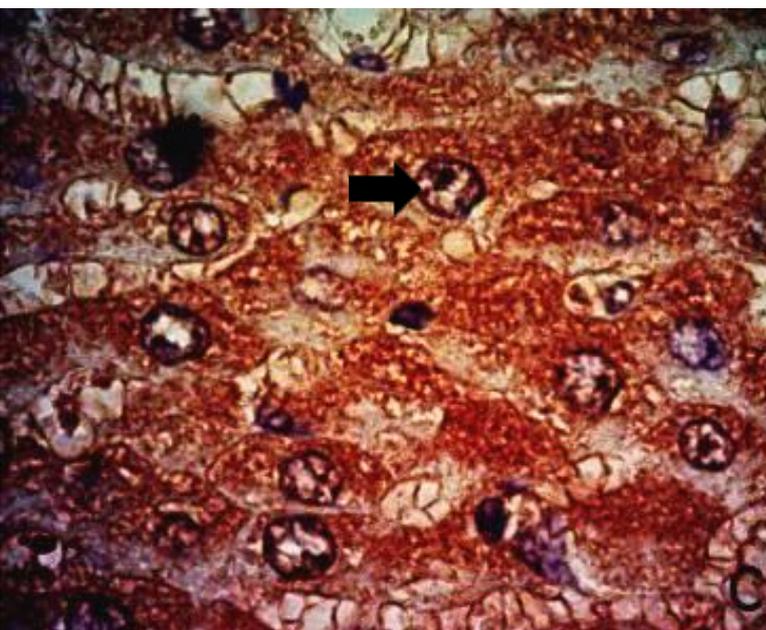
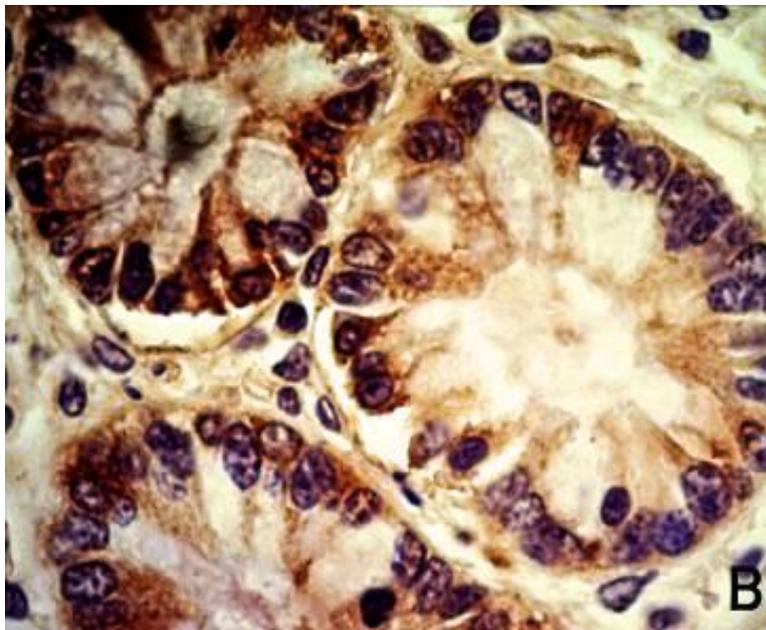
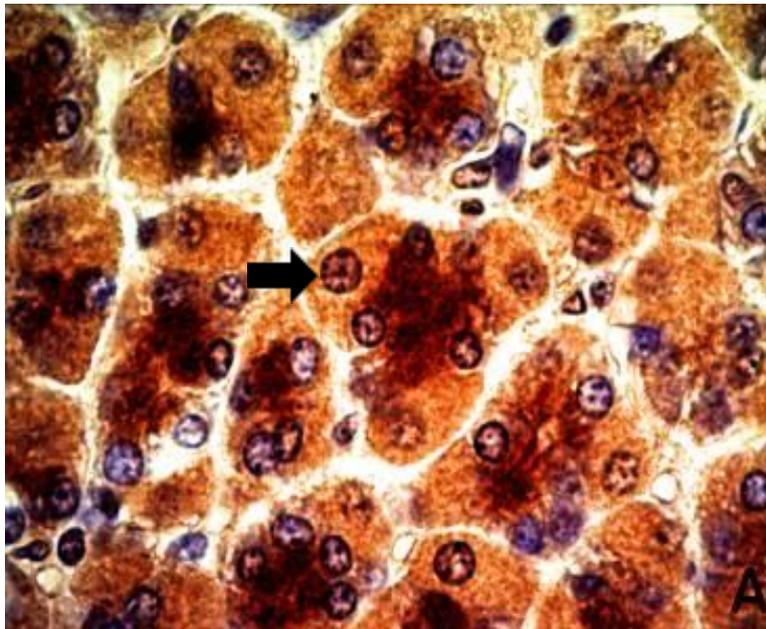


Figura 30. IHQ realizadas con el empleo del anticuerpo policlonal dirigido contra RHBDD2 (1000x) de cortes histológicos de estómago (A), intestino delgado (B) e hígado (C) de rata adulta.

En A) se visualiza la región glandular de la mucosa gástrica con un patrón de expresión mixto y nuclear. En B) se observa reacción positiva a nivel de las glándulas de Lieberkühn, el epitelio de revestimiento y el contenido luminal del intestino delgado, con un patrón de expresión mixto y nuclear. En C) se visualiza reacción positiva en los hepatocitos, con un patrón citoplásmico y nuclear.

La flecha señala la reacción nuclear.

2. Análisis de la expresión de las mucinas *Muc1*, *Muc2* y *Muc5ac* en tejidos embrionarios, fetales y neonatos.

2.1. *Muc1*.

Se analizó la expresión de la mucina *Muc1* mediante la técnica IHQ en tejidos de embriones y fetos provenientes de distintos estadios gestacionales y de neonatos de rata. En la tabla 4 y en las láminas IV y V se resumen los resultados obtenidos, se observó reacción positiva en la mayor parte de los órganos analizados. El patrón de reacción fue predominantemente lineal, en la porción apical de las células epiteliales. Se observó una leve reacción en las muestras de estómago, pulmón y riñón en los embriones de 13 días de gestación (13G). En estómago la reacción se restringió a la superficie epitelial (Lámina IV, Figura 31 A). En los túbulos epiteliales originados a partir de los brotes pulmonares primordiales y en los túbulos néfricos del riñón en desarrollo se observó un patrón predominantemente lineal de reacción (Lámina IV, Figura 31 B).

Hacia los 14G se detectó una reacción moderada y lineal en el páncreas y en el epitelio de revestimiento intestinal. En el páncreas se halló expresión de *Muc1* a nivel de las células epiteliales de los túbulos en desarrollo (Lámina IV, Figura 31 C). En estómago, pulmón y riñón se observó una intensidad de reacción mayor que la registrada en 13G.

A los 15G se detectó un aumento en la intensidad de reacción en las células epiteliales intestinales, al tiempo que las mismas dejaron de ser cúbicas para convertirse en células columnares. También se observó expresión de *Muc1* en las células epiteliales proliferativas que ocluyen transitoriamente el lumen intestinal (Lámina IV, Figura 31 D).

En los cordones hepáticos del hígado embrionario se observó una reacción moderada a partir de los 16G, siendo el único de los órganos analizados que mostró un patrón

citoplásmico de expresión (Lámina IV, Figura 31 E). Por otro lado, el esófago mostró una reacción de leve a moderada con un patrón lineal; el lumen de los túbulos epiteliales pancreáticos se hizo más estrecho manteniéndose una intensa expresión de Muc1 en la superficie de las células que los tapizan.

Hacia los 17G se detectó la presencia de acinos secretores en el páncreas, con un patrón de expresión mixto. En estómago, pulmón y riñón se observó una elevada intensidad de reacción. En el epitelio gástrico comenzaron a visualizarse las glándulas en formación. De forma similar, se detectaron bronquios, bronquiólos y alvéolos en el pulmón en desarrollo, con una reacción restringida a la superficie epitelial de bronquios y bronquiólos (Lámina V, Figura 32 A).

A partir de los 18G se observó expresión de Muc1 en la tráquea y en los ductos de las glándulas salivales (Lámina V, Figura 32 B), con un patrón de reacción moderado predominantemente lineal. El epitelio intestinal (Lámina V, Figura 32 C) y la mucosa gástrica mostraron una elevada intensidad de reacción. La mucosa gástrica comenzó a diferenciarse en mucosa glandular y escamosa, mostrando ambas un patrón heterogéneo de reacción ya que en algunas muestras se detectó una expresión mixta, mientras que en otras muestras se halló un patrón lineal de reacción.

Hacia los 19G se visualizó un aumento en la intensidad de reacción en el epitelio esofágico.

A partir de los 20G se diferenciaron los acinos serosos y mucosos en las glándulas salivales, mostrando ambos expresión de Muc1. En el riñón se detectaron algunos túbulos néfricos con un patrón de reacción mixto y otros túbulos con un patrón predominantemente lineal (Lámina V, Figura 32 D). Las células epiteliales gástricas e

Resultados

intestinales y los acinos pancreáticos mostraron un patrón predominantemente mixto (Lámina V, Figura 32 D).

En las muestras de piel analizadas no se observó expresión de la mucina Muc1.

En neonatos se observó reacción de Muc1 en todos los órganos analizados, con excepción de la piel. El patrón fue principalmente apical (Tabla 4).

Tabla 4. Intensidad de reacción hallada mediante IHQ con el empleo del Ac CT33 en los tejidos de embriones, fetos, neonatos y adultos analizados, registrada como ausente (-), leve (+), moderada (++) intensa (+++). L= patrón de reacción lineal, C= patrón de reacción citoplásmico, M= patrón de reacción mixto.

Órgano	Embriones y Fetos								Neonatos	Adultos
	Días de gestación								2	10 - 12
	13	14	15	16	17	18	19	20	sem	sem
<i>Esófago</i>	-	-	-	+(M)	+(M)	+(M)	++(M)	++(M)	++(M)	++(M)
<i>Estómago</i>	+(L)	++(L)	++(L)	++(L)	+++ (L)	+++ (L/M)	+++ (L/M)	+++ (M)	+++ (M)	+++ (M)
<i>Int. delgado</i>		++(L)	++(L)	++(L/M)	++(L/M)	++(L)	+++ (L)	+++ (M)	+++ (M)	+++ (M)
<i>Int. Grueso</i>		++(L)	++(L)	++(L/M)	++(L/M)	++(L)	+++ (L)	+++ (M)	+++ (M)	+++ (M)
<i>Páncreas</i>	-	++(L)	++(L)	+++ (L)	+++ (L/M)	+++ (L)	+++ (L/M)	+++ (M)	+++ (M)	+++ (M)
<i>Hígado</i>	-	-	-	++(C)	++(C)	++(C)	++(C)	++(C)	++(C)	++(C)
<i>Gl. Salival</i>						++(L)	++(L)	++(L)	++(L)	++(L)
<i>Tráquea</i>	-	-	-	-	-	++(L)	++(L)	++(L)	++(L)	++(L)
<i>Pulmón</i>	+(L)	++(L)	++(L)	++(L)	+++ (L)					
<i>Riñón</i>	+(L)	++(L)	++(L)	++(L)	+++ (L)	+++ (L)	+++ (L/M)	+++ (L/M)	+++ (L/M)	+++ (L/M)
<i>Piel</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

El análisis estadístico realizado arrojó una asociación positiva altamente significativa ($p \leq 0,001$) entre la expresión de la mucina 1 y el grado de avance del desarrollo (Tabla 5).

Tabla 5. Medidas de asociación entre la expresión de Muc1 y la variable estadio de desarrollo. Se observa asociación positiva entre las variables ($P \leq 0,001$).

		Valor	Error típ. asint. ^a	T aproximada ^b	Sig. aproximada
Ordinal por ordinal	Tau-b de Kendall	,305	,029	10,274	,000
	Gamma	,415	,039	10,274	,000
N de casos válidos		550			

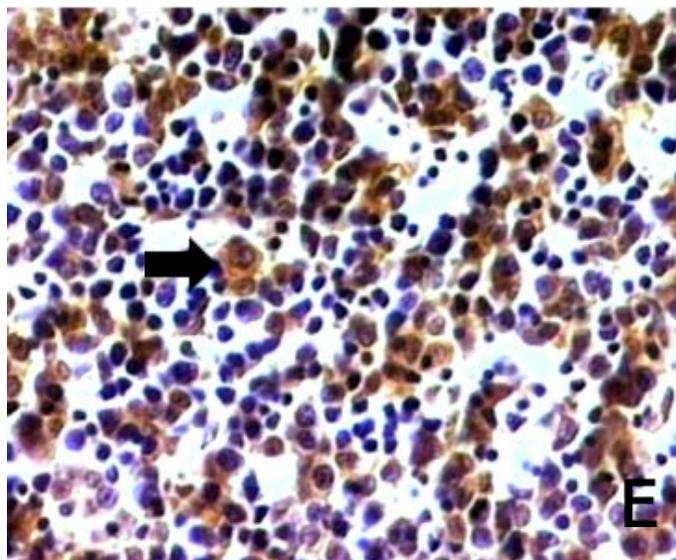
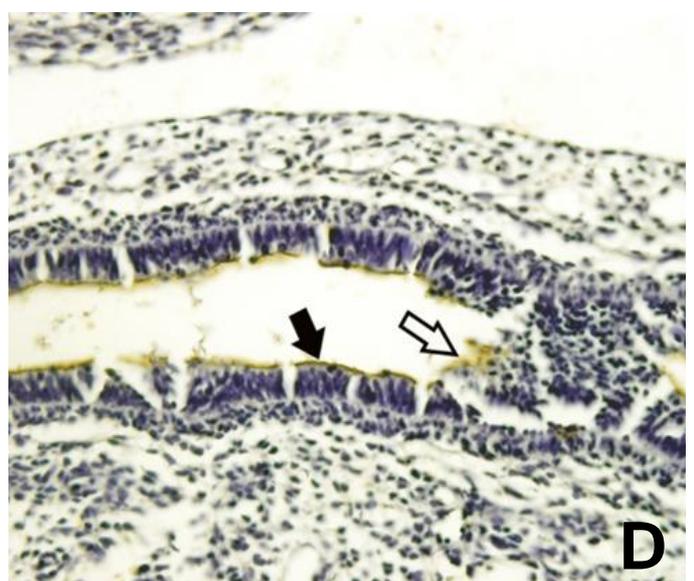
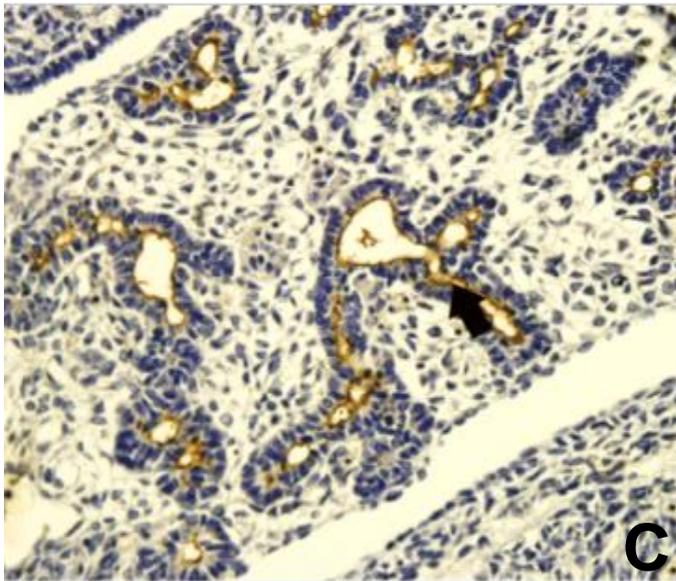
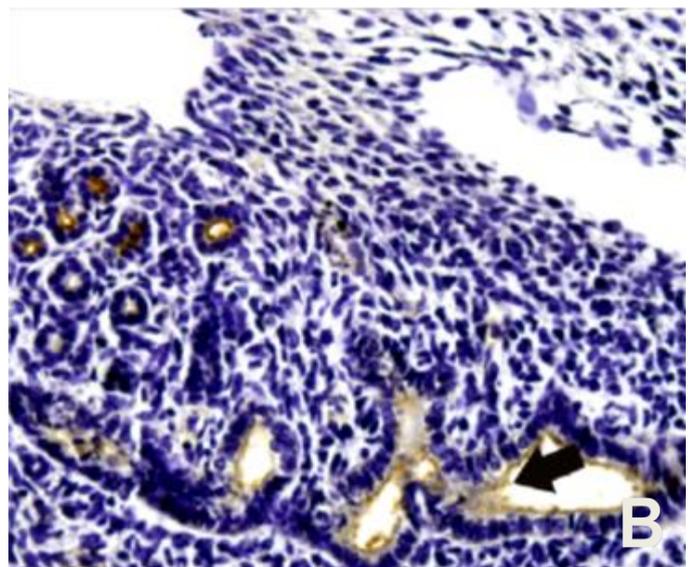
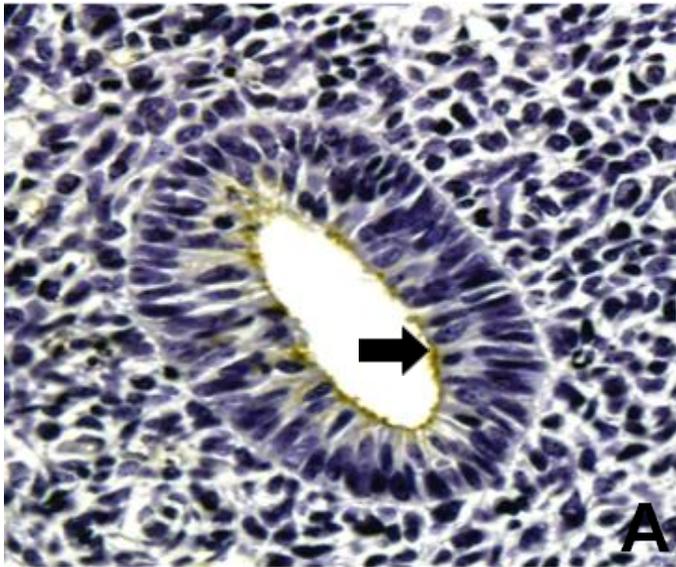


Figura 31. IHQ realizadas con el empleo del Ac dirigido contra MUC1 de tejidos embrionarios de rata (400x). (A) estómago y (B) riñón de 13 días de gestación, (C) páncreas de 14 días, (D) intestino de 15 días e (E) hígado de 16 días de desarrollo.

Las flechas negras señalan la reacción positiva. La flecha blanca señala las células epiteliales proliferativas que ocluyen transitoriamente el lumen intestinal.

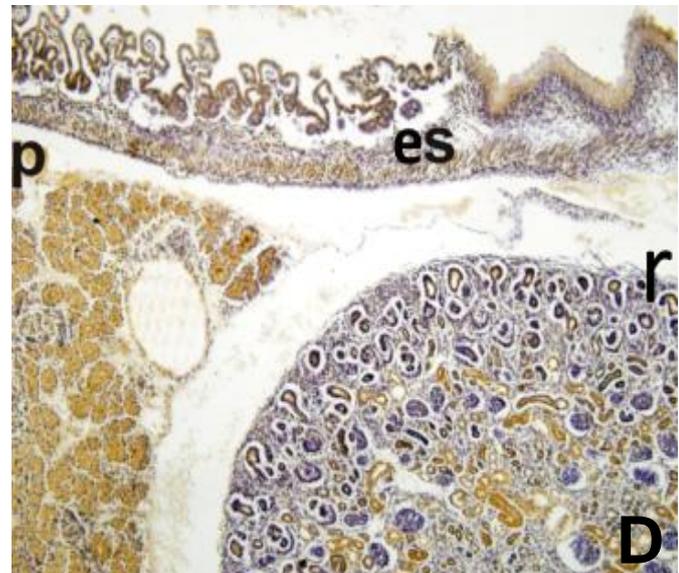
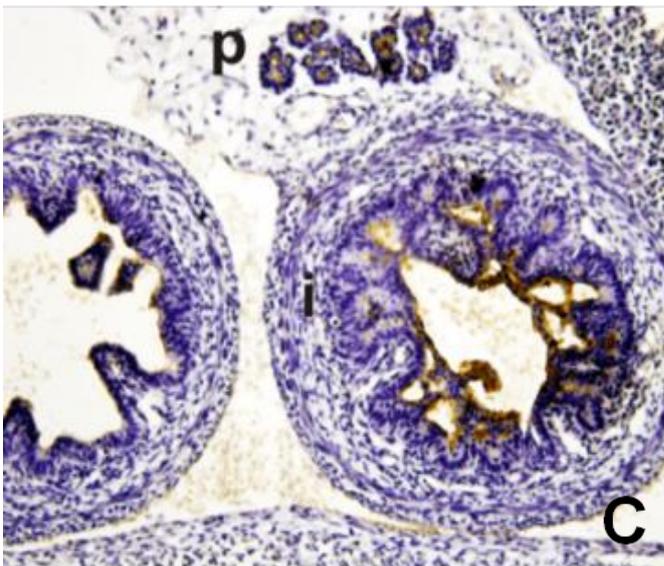
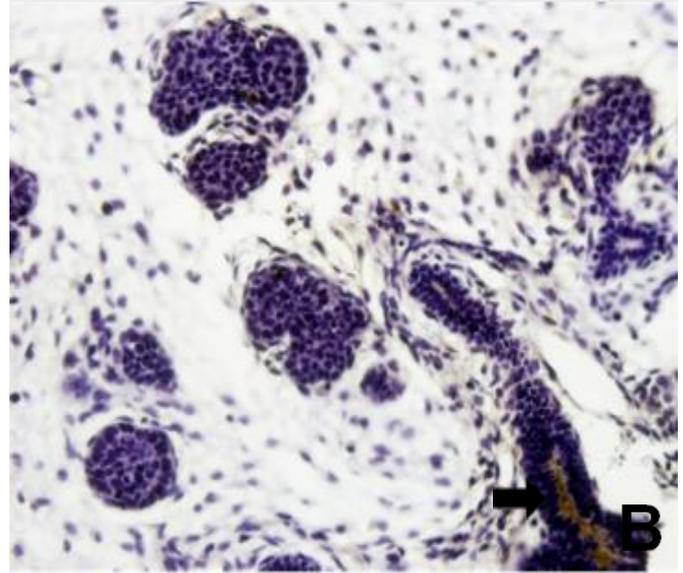
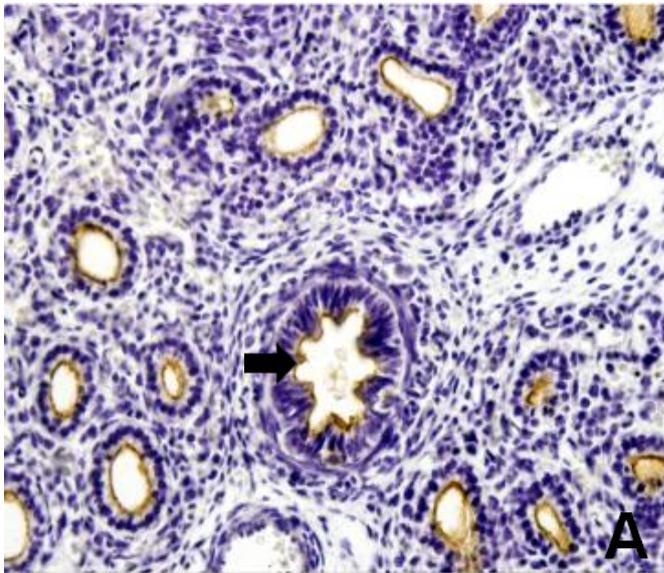


Figura 32. IHQ realizadas con el empleo del Ac anti-MUC1 de tejidos fetales de rata. (A) pulmón de 17 días de gestación, (B) glándula salival, y (C) páncreas e intestino de 18 días de desarrollo, (D) estómago, páncreas y riñón de 20 días de gestación. A, B y C = x400, D= x100.

Las flechas señalan la reacción positiva.

p= páncreas, i= intestino, es= estómago, r= riñón.

A fin de caracterizar a la mucina Muc1 de rata mediante dot blot, SDS PAGE y WB, se analizaron homogenados de estómago, intestino delgado, páncreas, pulmón y riñón en distintos estadios de desarrollo. En este estudio se empleó el AMo EP1024Y, dirigido contra la MUC1/Y humana, con el objeto de comprobar, por un lado, la reactividad del anticuerpo en rata, y por otra parte, detectar posibles isoformas de la Muc1 en la rata.

A fin de determinar la reactividad del AMo EP1024Y sobre los homogenados incluidos en el análisis, se diseñó un ensayo de dot blot. Del mismo modo que en la IHQ, se evidenció una intensa reacción en la mayor parte de las muestras estudiadas (Figura 33).

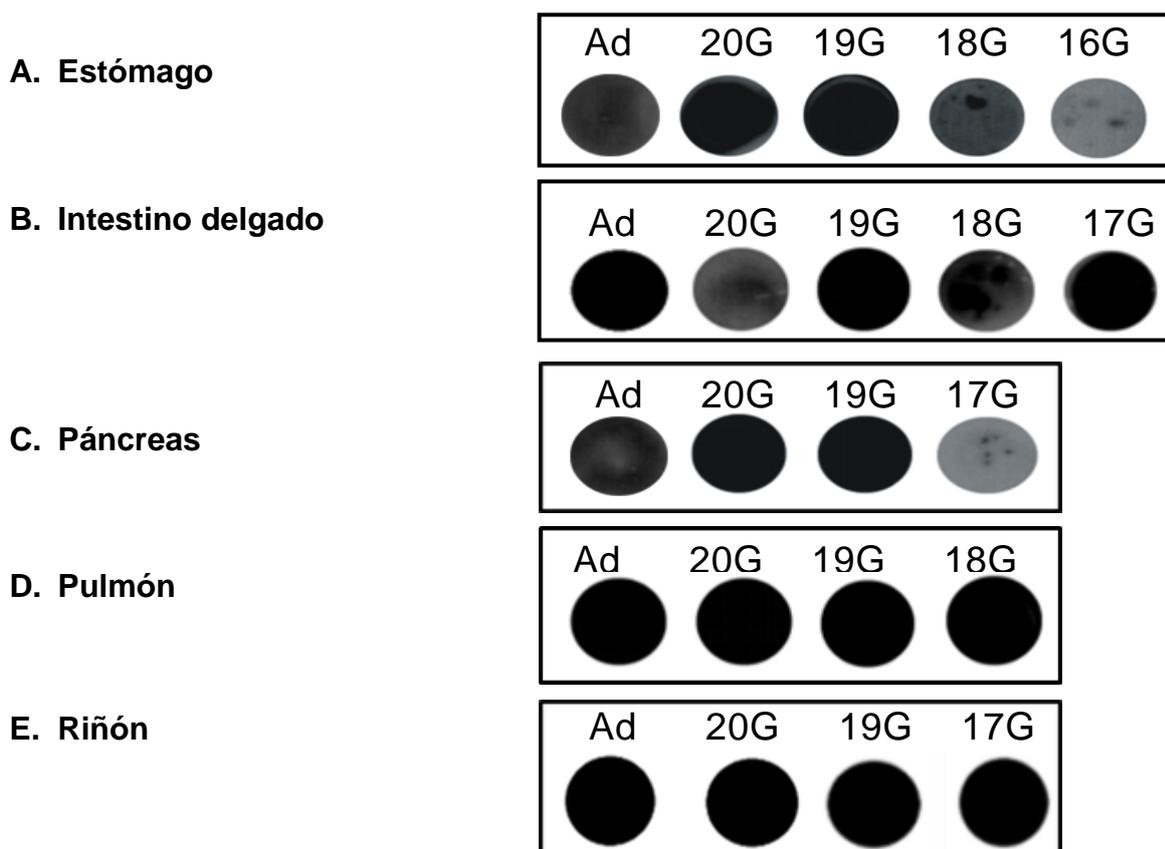


Figura 33. Dot blot. Las membranas fueron sembradas con homogenados de (A) estómago de rata adulta, de 20, 19, 18 y 16 días de gestación, (B) intestino delgado adulto, de 20, 19, 18 y 17 días de desarrollo, (C) páncreas adulto, de 20, 19 y 17 días de gestación, (D) pulmón de rata adulta, de 20, 19 y 18 días de desarrollo, (E) riñón adulto, de 20, 19 y 17 días de gestación. Estos resultados sugieren que el anticuerpo EP1024Y dirigido contra la MUC1/Y humana, reconoce a la mucina 1 de rata expresada por distintos tejidos en distintos estadios de gestación.

Resultados

Una vez determinada la reactividad del anticuerpo, se efectuó un análisis de los homogenados de intestino delgado, páncreas, pulmón y riñón en distintos estadios de desarrollo, mediante SDS PAGE al 12,5% y WB, a fin de comparar posibles diferencias entre los mismos (Figuras 34 y 35). Previamente, se determinó la concentración de proteínas de las muestras mediante la técnica de Bradford, a fin de mantener la misma cantidad proteica en cada siembra (50 µg de proteína por cada calle de siembra).

En los homogenados de intestino delgado se identificó una banda mayor a 100 KDa. Este fragmento corresponde probablemente a la subunidad α de la Muc1 de rata, que contiene al dominio extracelular. En las muestras de páncreas se detectó también una banda mayor a 100 KDa. Sin embargo, en 18G se detectaron dos bandas adicionales: una banda de 25 KDa, que corresponde probablemente a una isoforma de la Muc1 de rata análoga a la MUC1/Y humana, y una banda menor a 100 KDa, que podría corresponder a un producto de distinto peso molecular de diferente alelo de la subunidad α de la Muc1 de rata (Figura 34).

En los homogenados de pulmón y riñón adulto se halló la presencia de una banda de 25 KDa. Mientras que en las muestras de pulmón y riñón fetales, se halló una banda mayor a 100 KDa, con excepción del estadio de 19 días de gestación en el que se hallaron expresadas las dos bandas (Figura 35).

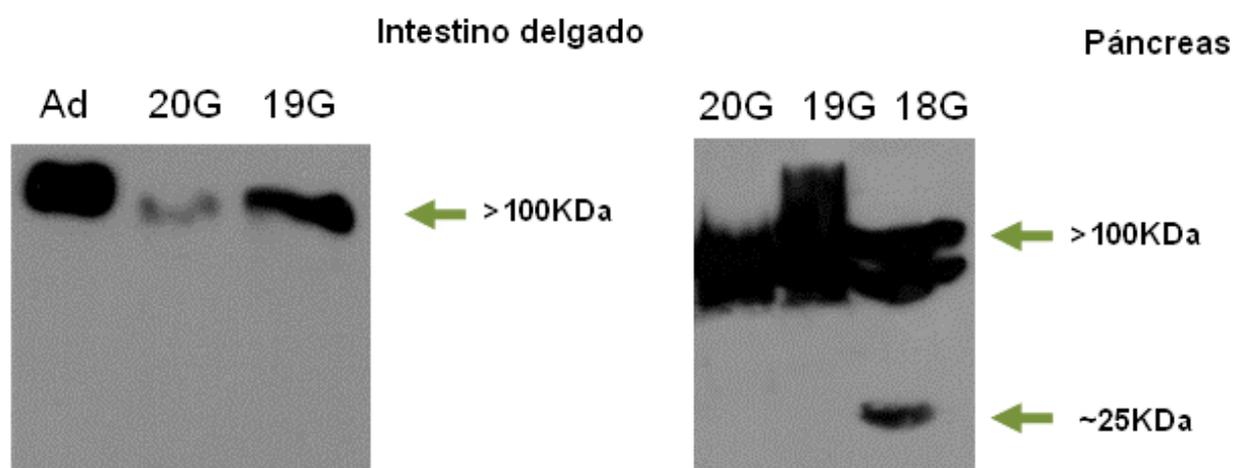


Figura 34. Análisis mediante WB de homogenados de intestino delgado adulto, de 20 y 19 días de gestación y de páncreas de 20, 19 y 18 días de desarrollo. Se observa en todas las muestras la presencia de una banda intensa mayor a 100 KDa, que podría corresponder a la subunidad α de la Muc1 de rata. En el homogenado de páncreas de 18G se evidencian dos bandas adicionales: una banda de 25 KDa, que corresponde probablemente a una isoforma de la Muc1 de rata análoga a la MUC1/Y humana, y una banda menor a 100 KDa, que podría corresponder a un producto de distinto peso molecular de diferente alelo de la subunidad α de la Muc1 de rata.

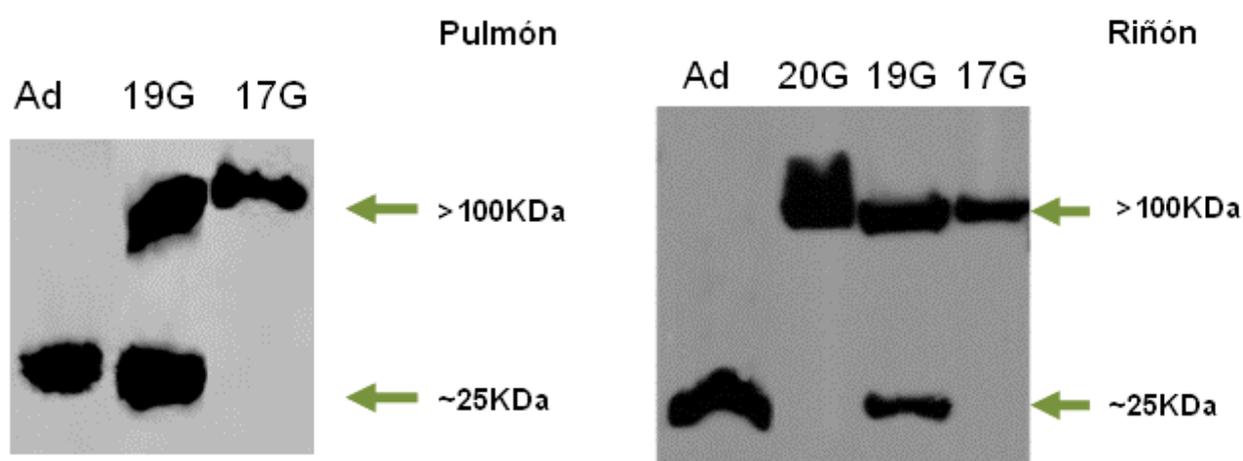


Figura 35. Análisis mediante WB de homogenados de pulmón adulto, de 19 y 17 días de gestación, y de riñón de rata adulta, 20, 19 y 17 días de desarrollo. Se observa en todas las muestras la presencia de una o dos bandas intensas correspondientes a 100 KDa y 25 KDa aproximadamente. Estos fragmentos corresponden probablemente a dos isoformas de la mucina 1 de rata.

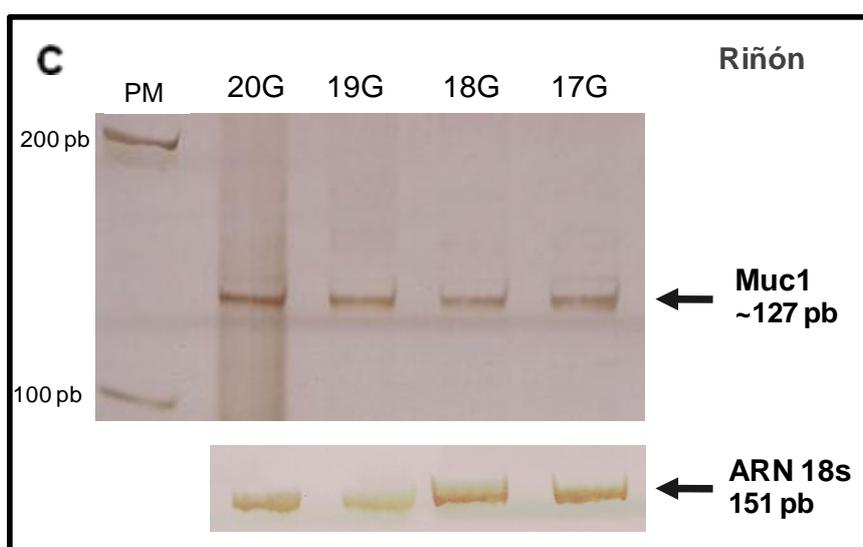
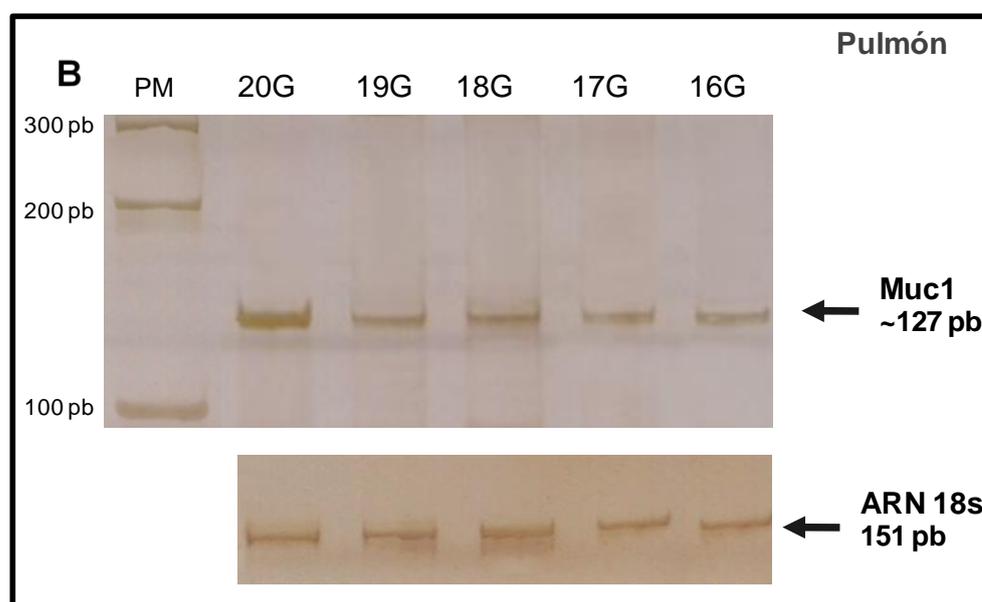
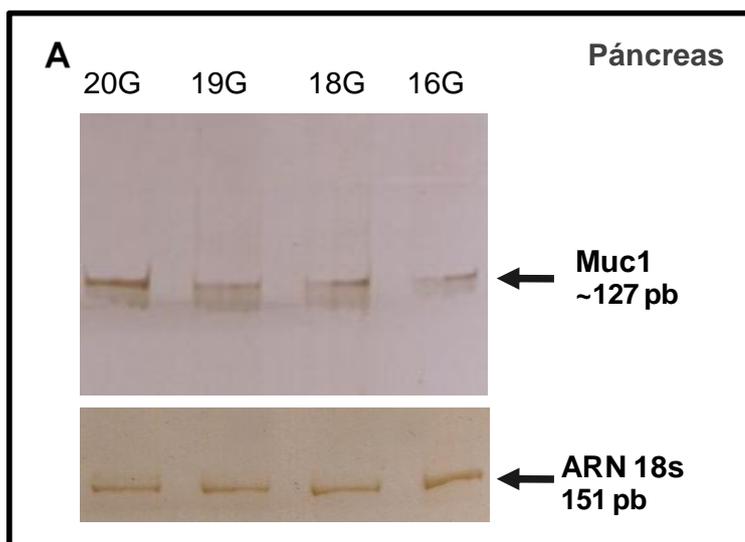
Resultados

A fin de profundizar el estudio de la expresión de la Muc1 en tejidos embrionarios y fetales de rata, y validar los resultados obtenidos mediante IHQ, dot blot y WB, se realizó un análisis de expresión a nivel del ARN mensajero.

Se extrajo ARN de muestras de páncreas, pulmón y riñón en distintos estadios de desarrollo. A fin de comprobar la integridad del material extraído, se sometió a una electroforesis desnaturalizante, en la que se observaron dos bandas correspondientes al ARN ribosómico 28s y 18s. A partir de las muestras de ARN extraído, se obtuvo el ADNc mediante una PCR con retrotranscripción (RT-PCR).

Finalmente, se efectuaron las reacciones de amplificación (PCR) con el ADNc obtenido de las muestras y el empleo de los cebadores descriptos (ver Materiales y métodos). Se analizaron muestras de páncreas de 20, 19, 18 y 16 días de gestación, pulmón de rata adulta, de 20, 19, 18, 17 y 16 días de desarrollo, y riñón de 20, 19, 18 y 17 días de gestación. En todos los casos se halló un amplificado de aproximadamente 127 pb, coincidente con lo esperado según el análisis realizado a priori de los cebadores (ver Materiales y métodos). En la figura 36 se puede apreciar un incremento gradual en la expresión del ADNc en páncreas y pulmón entre los 16 y los 20 días de gestación. Sin embargo, esta tendencia no resulta tan evidente en las muestras obtenidas a partir de riñón en distintos estadios.

Figura 36. Electroforesis en minigeles de poliacrilamida al 6% de los productos de amplificación obtenidos mediante RT-PCR. A- páncreas de 20, 19, 18 y 16 días de gestación, B- pulmón de 20, 19, 18, 17 y 16 días de desarrollo y C- riñón de 20, 19, 18 y 17 días de gestación. En todos los casos se observó una banda de ~127 pb, coincidente con lo esperado según el análisis de los cebadores realizado a priori. PM= Marcador de Peso Molecular.



Resultados

2.2. Muc2.

Mediante el empleo del anticuerpo H-300 dirigido contra la MUC2 humana, se analizó la expresión de la mucina Muc2 en tejidos embrionarios, fetales y neonatales de rata. Los resultados obtenidos mediante IHQ se resumen en la tabla 6 y en la lámina VI. Se halló expresión de Muc2 a partir de los 19 días de desarrollo en intestino delgado y grueso. La reacción se restringió a las células caliciformes ubicadas en el epitelio superficial y glándulas de Lieberkühn en formación, con un patrón predominantemente citoplásmico. Resulta interesante destacar que la detección de la expresión de la mucina coincide con la detección de las células caliciformes en los cortes analizados (Lámina VI, Figura 37, A y B). En la figura 37A de la lámina VI se puede apreciar un corte histológico de intestino de 18G en el cual no se visualizan células caliciformes.

Hacia los 20G se observó un incremento en el porcentaje de reacción, además de las células caliciformes de intestino delgado y grueso, mostraron reacción positiva algunas células columnares de las glándulas de la mucosa en intestino grueso (Lámina VI, Figura 37, C y D).

En neonatos, se observó reacción de Muc2 en las muestras de intestino delgado y grueso analizadas, con el mismo patrón de expresión observado en los fetos de 20G. Adicionalmente, se halló una leve expresión de Muc2 en estómago a partir del día 3 posterior al nacimiento (3DP) a nivel de las células columnares superficiales y glandulares. A partir de los 5DP se observó un incremento en la intensidad de reacción de leve a moderada (Lámina VI, Figura 37E), coincidente con el patrón de expresión hallado en estómago adulto (Tabla 6) ($p \leq 0,001$).

Tabla 6. Intensidad de reacción hallada mediante IHQ con el empleo del Ac H300 en los tejidos de embriones, fetos, neonatos y adultos analizados, registrada como ausente (-), leve (+), moderada (++) intensa (+++). C= patrón de reacción citoplásmico, sec= reacción en secreción

Órgano	Embriones y Fetos									Neonatos					Adultos
	Días de gestación									Días post-nacimiento					Semanas
	13	14	15	16	17	18	19	20	2	3	4	5	10	15	10-12
<i>Esófago</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Estómago</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+(C)	+(C)	++(C)	++(C)	++(C)	++(C)
<i>Int. delgado</i>	-	-	-	-	-	-	+++ (C)	+++ (C/sec)	+++ (C/sec)	+++ (C/sec)	+++ (C/sec)	+++ (C/sec)	+++ (C/sec)	+++ (C/sec)	+++ (C/sec)
<i>Int. Grueso</i>	-	-	-	-	-	-	+++ (C)	+++ (C/sec)	+++ (C/sec)	+++ (C/sec)	+++ (C/sec)	+++ (C/sec)	+++ (C/sec)	+++ (C/sec)	+++ (C/sec)
<i>Páncreas</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Hígado</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Gl. Salival</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Tráquea</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pulmón</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Riñón</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Piel</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

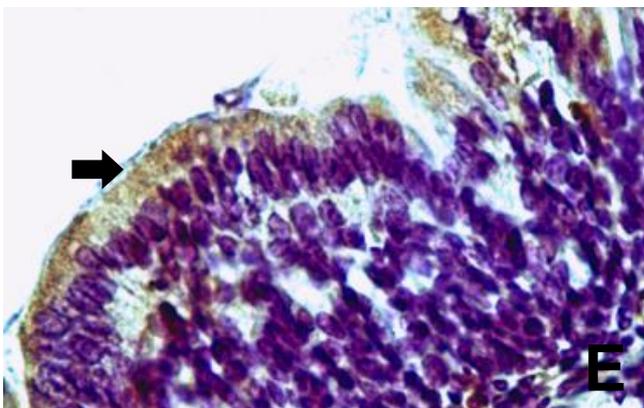
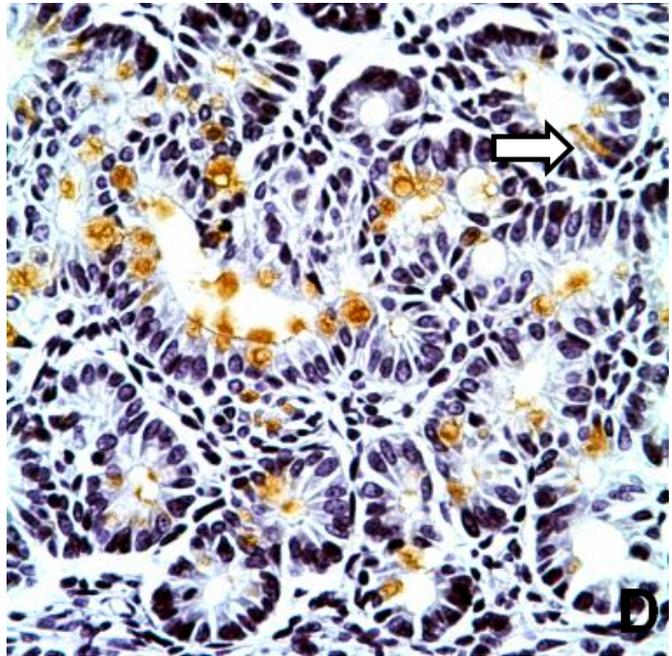
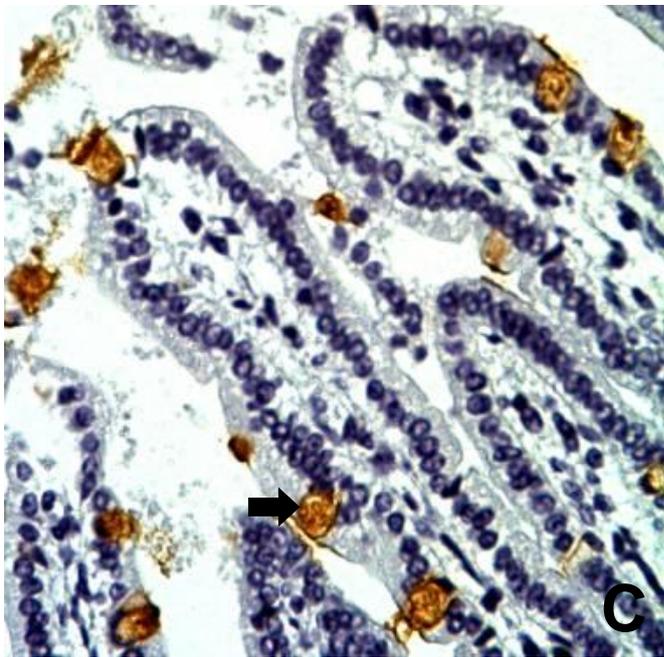
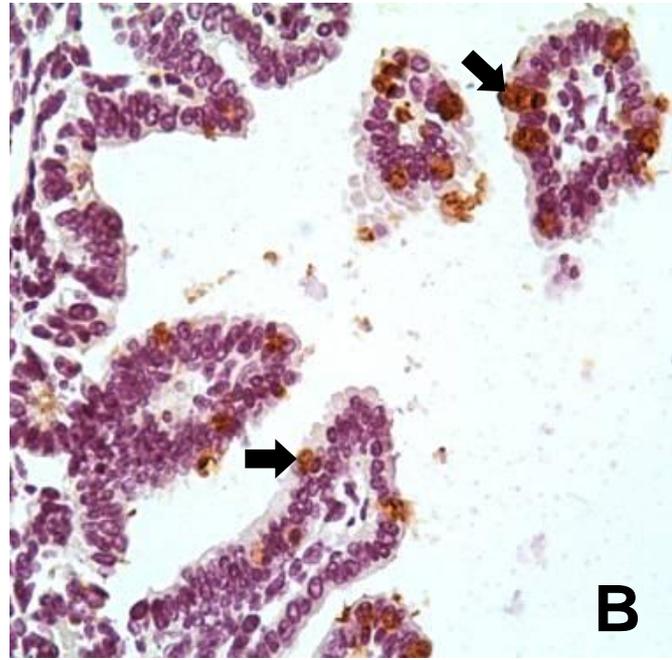
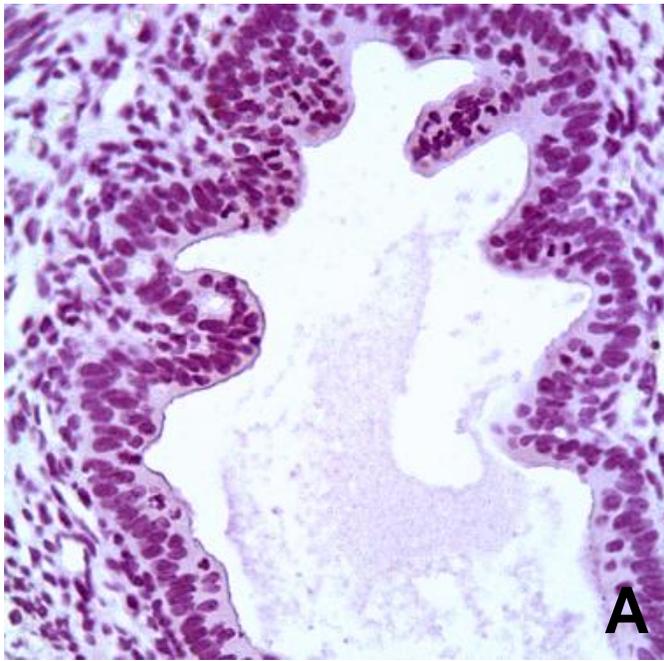


Figura 37. IHQ realizadas con el empleo del anticuerpo dirigido contra MUC2 (x400) de intestino de 18 días de gestación (A), donde se puede apreciar la ausencia de células caliciformes reactivas, intestino delgado de 19 (B) y 20 días de desarrollo (C), intestino grueso de 20 días de gestación (D) y estómago de 5 días post-nacimiento (E).

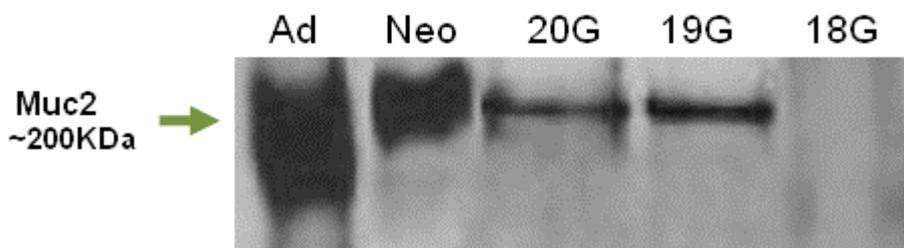
Las flechas negras señalan la reacción positiva. La flecha blanca señala la reacción positiva a nivel de las células columnares.

Resultados

Con el objeto de validar los resultados obtenidos mediante IHQ, se procedió al análisis de homogenados de intestino delgado y grueso en distintos estadios gestacionales mediante SDS PAGE al 10% y WB. Previamente, se determinó la concentración de las muestras mediante la técnica de Bradford, a fin de mantener la misma cantidad proteica en cada siembra (50 μ g de proteína por cada calle de siembra).

En todos los casos en que se halló reacción, se detectó una banda de 200 KDa aproximadamente. En concordancia con lo esperado según los resultados de la IHQ, se halló expresión de Muc2 a partir de los 19G, en los homogenados de intestino delgado así como de intestino grueso (Figura 38). Resulta interesante destacar que en las muestras de intestino delgado, se visualizó un incremento en la expresión de la mucina, especialmente en los estadios posteriores al nacimiento.

Intestino delgado



Intestino grueso

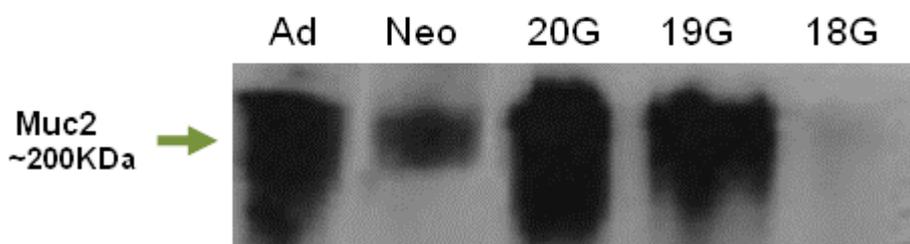


Figura 38. Análisis mediante WB de homogenados de intestino delgado y grueso de rata adulta, de neonato (de una semana de vida), de 20, 19 y 18 días de gestación. Se detectó una banda de 200 KDa aproximadamente en todos los casos a partir de los 19G. En intestino delgado se visualizó un incremento en la expresión de la mucina 2 especialmente luego del nacimiento.

A fin de profundizar el análisis de expresión de la Muc2 en tejidos embrionarios y fetales de rata, se llevó a cabo un análisis de expresión a nivel del ARN mensajero. Se extrajo ARN de muestras de intestino grueso adulto, de 20, 19 y 18 días de gestación, intestino de 17 y 16 días de desarrollo prenatal¹⁰, y estómago adulto, de 20, 19, 18, 17 y 16 días de gestación. De la misma manera que las muestras empleadas para el análisis de la expresión de Muc1, estas fueron sometidas a electroforesis desnaturizante y posterior RT-PCR, con el fin de comprobar la integridad del material extraído y obtener el ADNc correspondiente.

Finalmente, se efectuaron las reacciones de amplificación (PCR) con el ADNc obtenido de las muestras y el empleo de los cebadores descriptos (ver Materiales y métodos). En todos los casos se detectó un amplificado de ~242 pb, en concordancia con lo esperado según el análisis realizado a priori de los cebadores.

En la figura 39A se puede apreciar la expresión de la mucina 2 a partir de los 16 días de gestación en las muestras de intestino analizadas. Estos resultados sugieren que la expresión del ARN mensajero en el desarrollo se produce más tempranamente que la detección de la proteína correspondiente. Por otro lado, se visualiza un incremento gradual de la expresión del amplificado, que hacia los 20G alcanza los niveles observados en el adulto.

En todas las muestras de estómago de distintos estadios de desarrollo se halló expresión de Muc2 (Figura 39B). Estos resultados difieren de los obtenidos mediante IHQ y WB, dado que no fue detectada la mucina mediante dichas técnicas en los estadios gestacionales analizados. Sin embargo, los resultados sugieren una expresión más temprana en el desarrollo del ARNm respecto de la expresión de la proteína

¹⁰ Por cuestiones metodológicas, no se diferenció intestino grueso de intestino delgado en los estadios de 16 y 17 días de gestación.

Resultados

correspondiente. En este sentido, los resultados son concordantes con los obtenidos en el análisis de expresión en las muestras de intestino, como se comentó previamente.

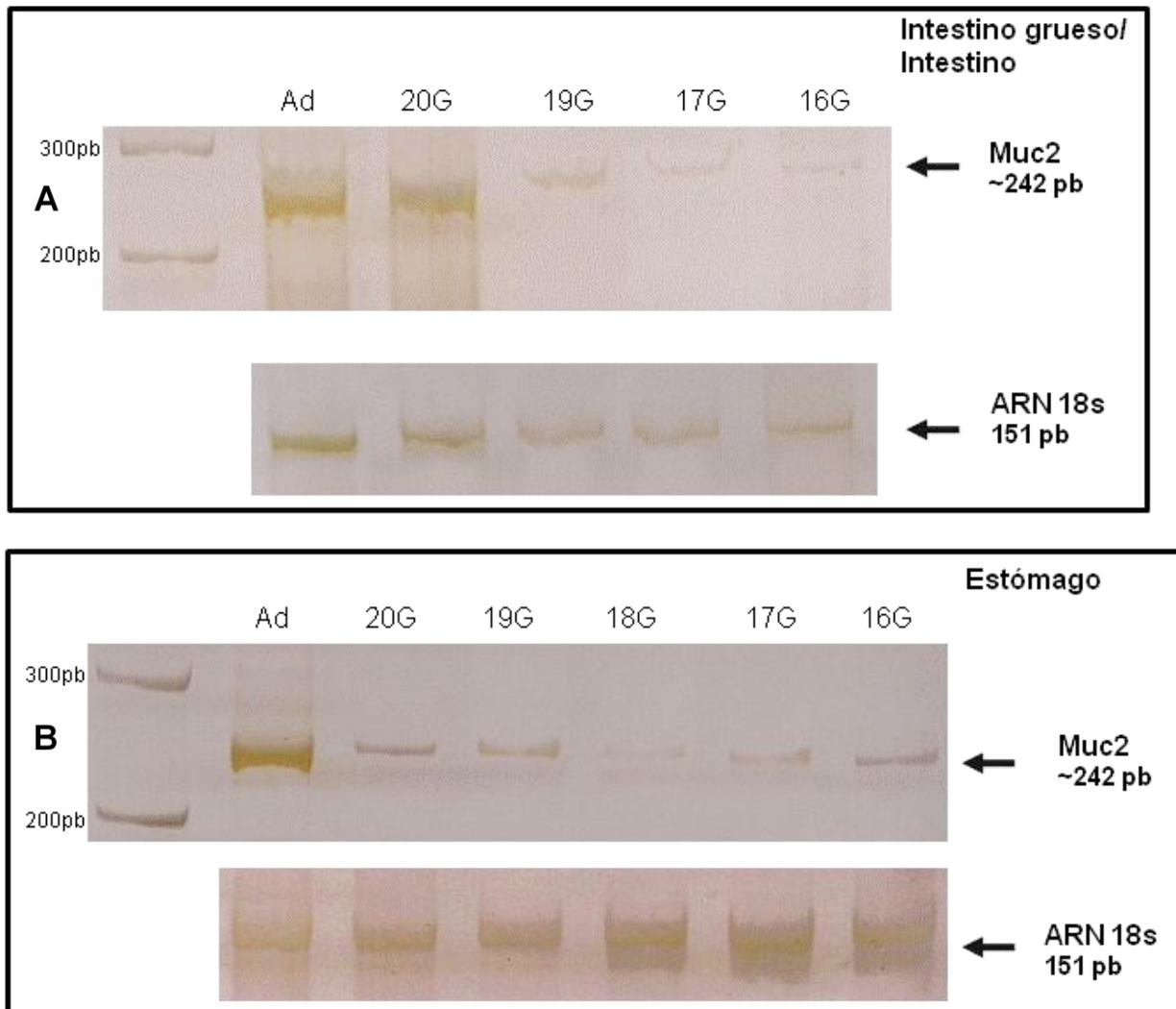


Figura 39. Electroforesis en geles de poliacrilamida 6% de los productos de amplificación obtenidos mediante RT-PCR. A- Intestino grueso de rata adulta, de 20, 19 y 18 días de gestación, intestino de 17 y 16 días desarrollo, y B- estómago adulto, de 20, 19, 18, 17 y 16 días de gestación. En todos los casos se observó una banda de ~242 pb, coincidente con lo esperado según el análisis de los cebadores realizado a priori. PM=Marcador de Peso Molecular.

2.3. *Muc5ac*

Para el estudio de la expresión de la Muc5ac en tejidos embrionarios, fetales y neonatales de la rata, se empleó el AMo 45M1. Los resultados obtenidos mediante IHQ se resumen en la tabla 7 y en las láminas VII y VIII. Se observó reacción positiva en muestras de estómago, pulmón, tráquea y piel. El patrón de reacción fue predominantemente citoplásmico.

Se detectó una leve expresión de Muc5ac en algunas células de la mucosa gástrica a partir de los 17 días de desarrollo (Lámina VII, figura 40 A). Es interesante señalar que a los 17G comenzaron a visualizarse las glándulas en formación de la mucosa gástrica. Hacia los 18G se observó un incremento en el porcentaje y en la intensidad de reacción (Lámina VII, figura 40 B), en todos los casos restringida a la porción glandular del órgano. Las muestras de estómago neonatal mostraron un incremento mayor en el porcentaje y en la intensidad de reacción, en tanto que, en este órgano se registró un patrón de expresión mixto (Lámina VII, figura 40 C).

Por otro lado, los ductos pulmonares que aparecen en los pulmones embrionarios mostraron expresión de la glicoproteína a partir de los 14G (Lámina VII, figura 40 D). La reacción se restringió a unas pocas células con una leve intensidad y un patrón citoplásmico de reacción. Hacia los 16G se visualizó un aumento en la intensidad y en el porcentaje de expresión (Lámina VII, figura 40 E).

Las muestras de tráquea fetales analizadas no mostraron expresión de la mucina. Hacia los 7 días posteriores al nacimiento, se detectó una leve reacción citoplásmica en el epitelio cilíndrico pseudoestratificado y en las glándulas traqueales (Lámina VII, figura 40 F). Hacia los 15 días post-nacimiento se observó un incremento en la intensidad y en el porcentaje de reacción.

Resultados

Asimismo, se registró tempranamente a los 13G, una leve expresión de Muc5ac en la epidermis embrionaria de las muestras de piel analizadas con un patrón predominantemente citoplásmico (Lámina VIII, figura 41 A). Hacia los 19G se visualizó un incremento en la intensidad de reacción (Lámina VIII, figura 41 B).

Finalmente, se analizó la expresión de la mucina Muc5ac en las muestras de piel de ratas neonatales en distintos días de desarrollo entre los 2 y los 15 días post- nacimiento. Entre los 2 y los 6 DP, se registró una elevada intensidad de reacción en los distintos estratos que constituyen la epidermis, además se detectó Muc5ac en las células globosas que forman las glándulas sebáceas asociadas a los folículos pilosos (Lámina VIII, figura 41 C). Hacia los 7 DP se pierde la expresión a nivel de la epidermis superficial, y la reacción queda restringida a las células secretoras de sebo (Lámina VIII, figura 41 D), que presentaron un patrón citoplásmico y una elevada intensidad de expresión. Este patrón de reacción coincide con el que se detectó en las ratas adultas (ver Resultados 1.1).

El análisis estadístico sugiere una asociación positiva altamente significativa ($p \leq 0,001$) entre la intensidad de expresión de la Muc5ac y el grado de avance del desarrollo en las muestras de estómago, pulmón, tráquea y piel (Tabla 8).

Órgano	Embriones y Fetos										Neonatos					Adultos						
	Días de gestación										Días post- nacimiento					Semanas						
	13	14	15	16	17	18	19	20	2	3	4	5	6	7	8	9	10	15	10-12			
Esófago	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
Estómago	-	-	-	-	+	(C)	+	(C)	++	(C)	++	(C/sec)	+++	(C/sec)	+++	(C/sec)	+++	(M/sec)	+++	(M/sec)		
Int. de Igado	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Int. Grueso	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Páncreas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Hígado	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Gl. Salival	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Tráquea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Pulmón	-	+	(C)	++	(C)	++	(C)	++	(C)	++	(C)	++	(C)	++	(C)	++	(C)	++	(C)	++	(C)	
Riñón	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Piel	+	(C)	+	(C)	+	(C)	+	(C)	++	(C)	++	(C)	++	(C)	++	(C)	++	(C)	++	(C)	++	(C)

Tabla 7. Intensidad de reacción hallada mediante IHQ con el empleo del Ac 45M1 en los tejidos de embriones, fetos, neonatos y adultos analizados, registrada como ausente (-), leve (+), moderada (++) intensa (+++). C= patrón de reacción citoplásmico, M= patrón de reacción mixto, sec= reacción en secreción.

Tabla 8. Medidas de asociación entre la intensidad de reacción de Muc5ac y la variable estadio de desarrollo. Se observa asociación positiva altamente significativa entre las variables (p≤0,001).

	Valor	Error tip. asint. ^a	T aproximada ^b	Sig. aproximada	
Ordinal por ordinal	Tau-b de Kendall	,132	,031	4,038	,000
	Gamma	,271	,062	4,038	,000
N de casos válidos		550			

a. Asumiendo la hipótesis alternativa.

b. Empleando el error típico asintótico basado en la hipótesis nula.

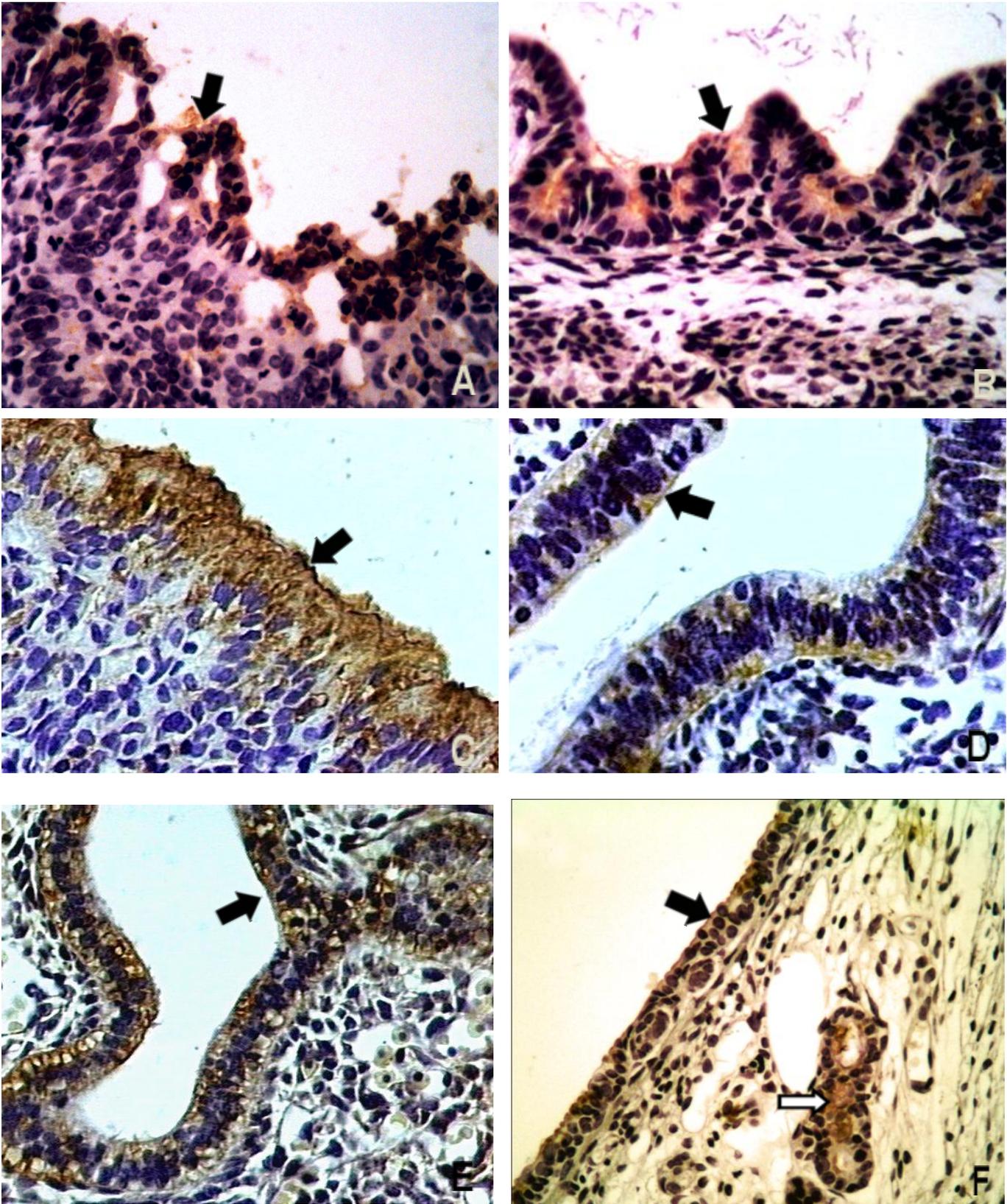


Figura 40. IHQ realizadas con el empleo del AMo anti-MUC5AC (x400) de estómago de (A) 17 y (B) 18 días gestación, (C) estómago de neonato de 7 días post-nacimiento, pulmón de (D) 14 y (E) 16 días de desarrollo, y (F) tráquea de 7 días posteriores al nacimiento. Las flechas negras señalan la reacción citoplásmica. La flecha blanca señala las glándulas traqueales reactiva

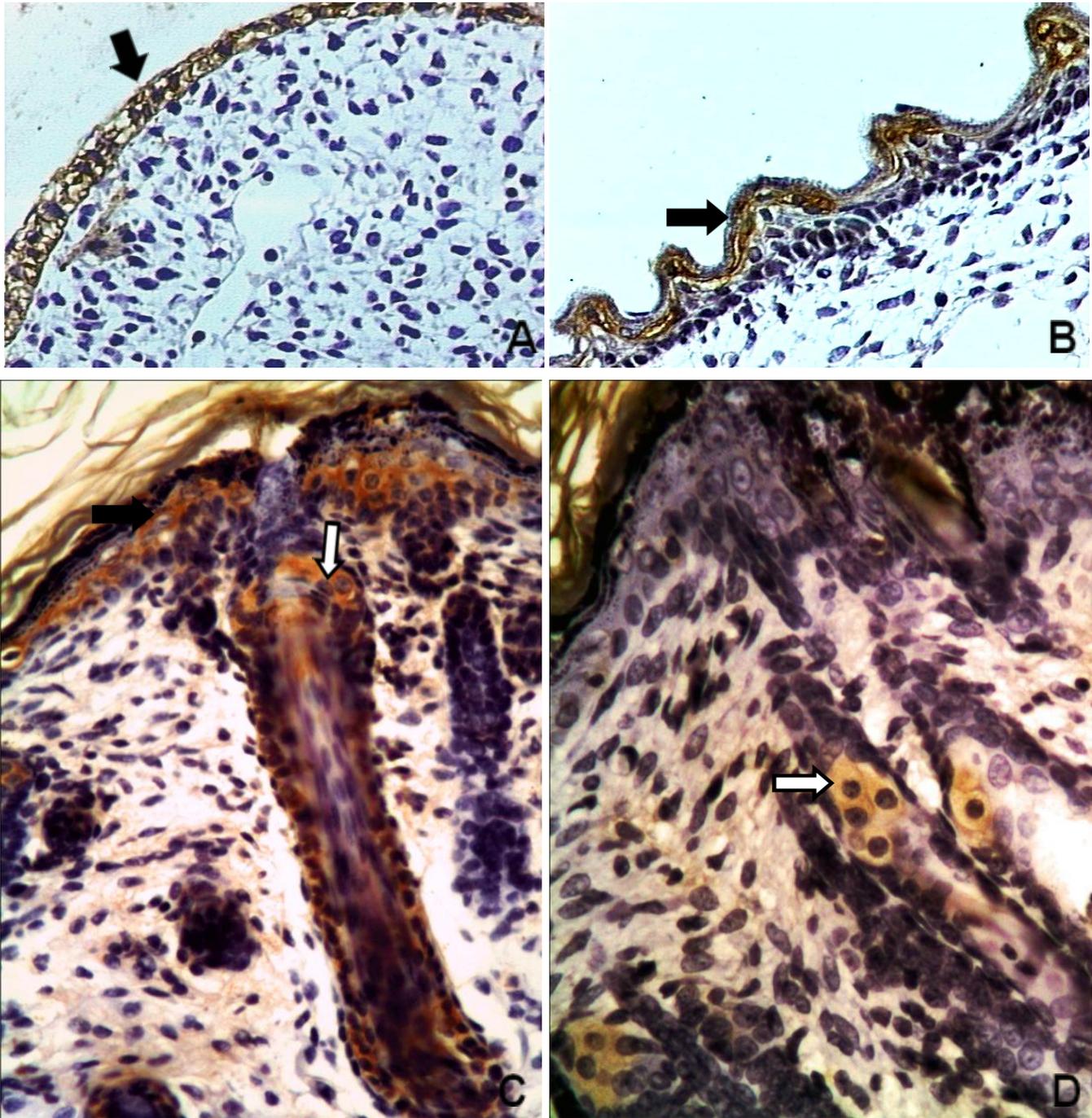


Figura 41. IHQ realizadas con el empleo del AMo anti-MUC5AC (x400) de piel de (A) 13 y (B) 19 días de gestación, y piel de (C) 2 y (D) 7 días post-nacimiento.

Las flechas negras señalan la reacción citoplásmica en los estratos de la epidermis.

Las flechas blancas señalan las glándulas sebáceas reactivas.

Resultados

Con el objeto de validar los resultados obtenidos mediante IHQ, se efectuó un análisis de homogenados de estómago, pulmón y piel en distintos estadios de desarrollo, mediante SDS PAGE al 8% y WB. Del mismo modo que en los estudios de WB comentados previamente, se determinó la concentración de las muestras a fin de mantener la misma cantidad proteica en cada siembra (50 µg).

En todos los casos en los que se halló expresión se detectó una banda de 200 KDa aproximadamente. En las muestras de estómago analizadas se visualizó un incremento en la expresión en correlación con el avance del desarrollo, desde los 17G hasta el adulto, mientras que en 16G no se detectó reacción (Figura 42 A). Por otro lado, se analizaron homogenados de pulmón de 15, 16, 17, 18, 19, 20 días de gestación, de neonatos de 7 días post-nacimiento y de rata adulta. Todos los casos analizados mostraron reacción y del mismo modo que en el análisis de expresión en estómago, se observó un incremento gradual en la intensidad de reacción en correlación con el grado de avance del desarrollo (Figura 42 B). Estos resultados coinciden con el patrón de expresión hallado mediante IHQ.

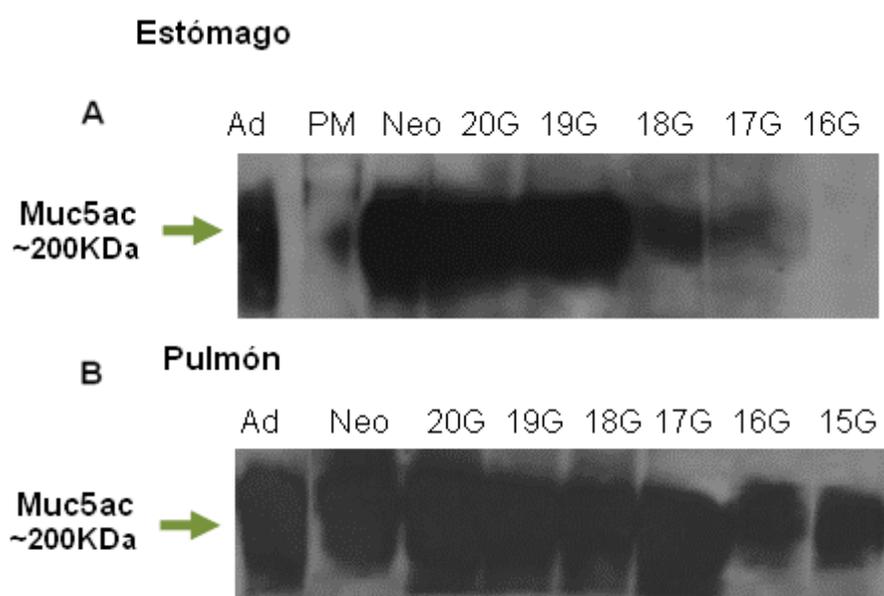


Figura 42. Análisis mediante WB de homogenados de A- estómago de rata adulta, de neonato (de una semana de vida), de 20, 19, 18 y 16 días de gestación, y de B- pulmón adulto, de neonato (de una semana de vida), de 20, 19, 18, 17, 16 y 15 días de desarrollo. En todos los casos en los que hubo reacción se detectó una banda de 200 KDa aproximadamente. Se visualizó un incremento en la expresión de la mucina Muc5ac en correlación con el avance del desarrollo. PM= marcador de peso molecular (ColorBurst™ Electrophoresis Marker, Sigma).

Por otra parte, los homogenados de piel mostraron un descenso gradual en la expresión de Muc5ac en los fetos entre los 17G y los 20G (Figura 43 A). Sin embargo, cuando se analizaron las muestras de piel de neonatos se detectó un nivel de intensidad de reacción elevado hacia los primeros días post-nacimiento y un descenso gradual de su expresión hacia los 10 DP (Figura 43 B). Estos resultados son concordantes con los hallados con la técnica IHQ, donde se observó que a partir de los 7 DP la reacción quedó restringida a las glándulas sebáceas y ya la epidermis no mostró reacción.

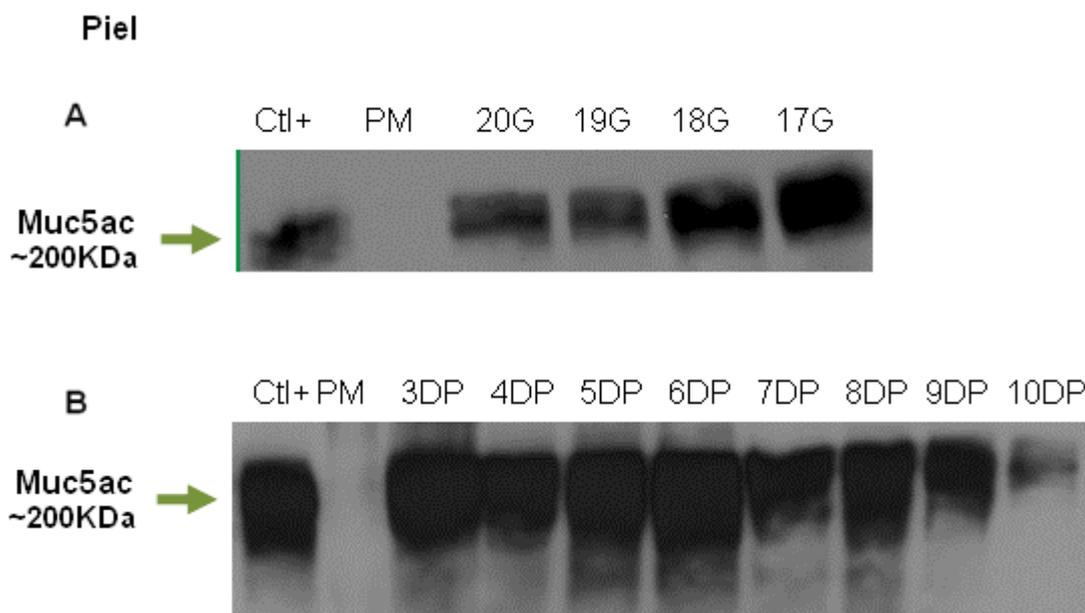


Figura 43. Análisis mediante WB de homogenados de piel de A- fetos de 20, 19, 18 y 17 días de gestación y B- neonatos de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 días posteriores al nacimiento. Se visualizó un descenso gradual de la expresión de Muc5ac entre los 17G y los 20G. Sin embargo, en las muestras de neonatos se detectó un nivel de intensidad de reacción elevado hacia los primeros días posteriores al nacimiento y un descenso gradual de su expresión hacia los 10 DP.

Ctl += Se utilizó una muestra de estómago adulto como control positivo.

PM= marcador de peso molecular (ColorBurst™ Electrophoresis Marker, Sigma).

Tal como se procedió en el estudio de las mucinas Muc1 y Muc2, se buscó validar los resultados obtenidos a partir de la IHQ y WB, realizando un análisis de expresión de la

Resultados

Muc5ac a nivel del ARN mensajero. Se extrajo ARN de muestras de estómago, pulmón y piel, en distintos estadios de desarrollo, se sometió a electroforesis desnaturalizante y posteriormente a RT-PCR.

Finalmente, se efectuaron las reacciones de amplificación (PCR) con el ADNc obtenido de las muestras y el empleo de los cebadores descritos (ver Materiales y métodos). En todos los casos se detectó un amplificado de ~149pb, en coincidencia con lo esperado según el análisis realizado a priori de los cebadores.

Se analizaron muestras de estómago adulto, de 20, 19, 18, 17 y 16 días de gestación. En todos los casos se halló expresión del amplificado sin mostrar diferencias apreciables entre los estadios (Figura 44 A). Por otra parte, se analizaron muestras de ADNc de pulmón adulto, de 19, 17 y 15 días de desarrollo, se detectó expresión de Muc5ac en todos los casos aunque en 15G fue muy leve en comparación con los demás estadios analizados. Estos resultados indican un aumento en la expresión del ARNm hacia los estadios más avanzados de desarrollo (Figura 44 B).

Por otro lado, se analizaron los ADNc obtenidos de muestras de piel de embriones y fetos de 16, 19 y 20 días de desarrollo, de neonatos de 7 días posteriores al nacimiento y de ratas adultas. En todos los casos analizados se detectó expresión del ARN mensajero. En las muestras prenatales se visualizó una reacción más intensa a los 19 y 20G, en comparación con los 16G analizados, mientras que en las muestras postnatales no se detectaron diferencias significativas (Figura 45).

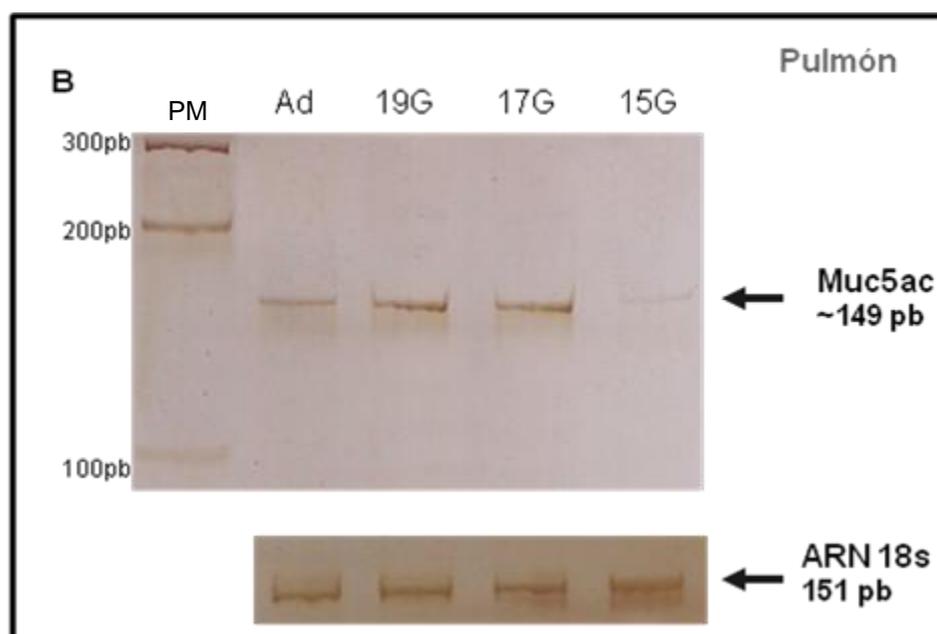
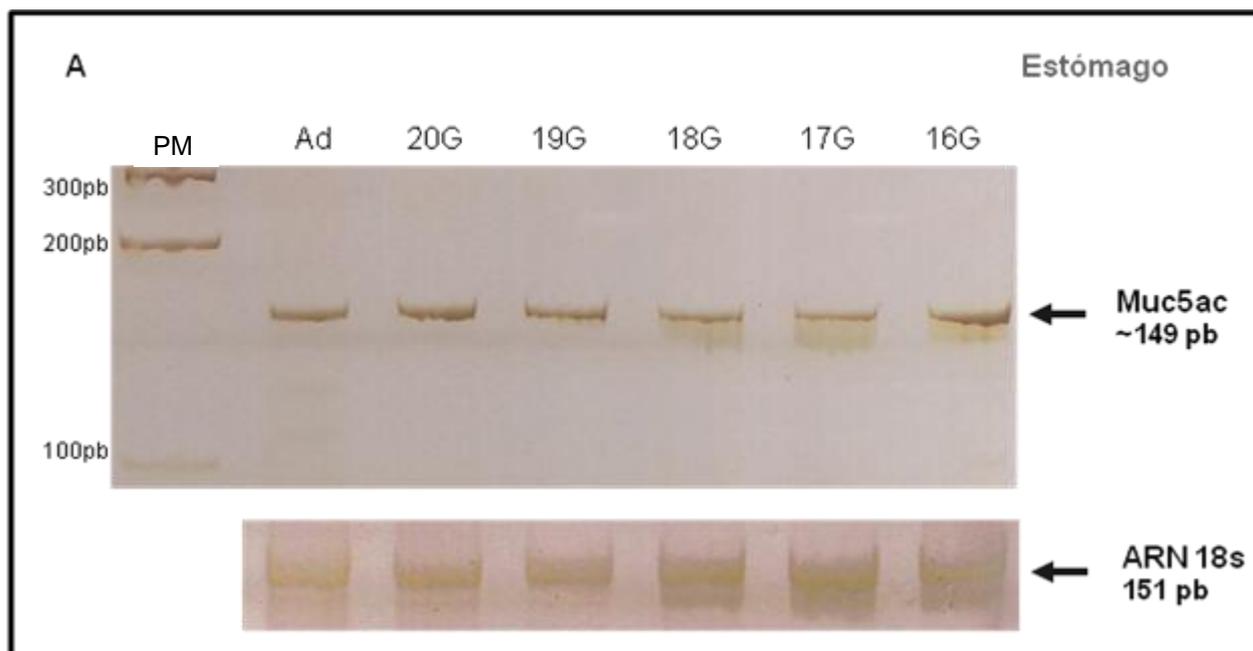


Figura 44. Electroforesis en minigeles de poliacrilamida al 6%. A- amplificados de Muc5ac en estómago adulto, de 20, 19, 18, 17 y 16 días de gestación, B- amplificados de Muc5ac en pulmón adulto, de 19, 17 y 15 días de desarrollo. En todos los casos se visualiza una banda de aproximadamente 149 pb.

PM= Marcador de Peso Molecular.

Por debajo de cada minigel, se muestran los amplificados de ARN 18s de cada una de las muestras analizadas con el fin de comprobar las concentraciones semejantes de las mismas.

Resultados

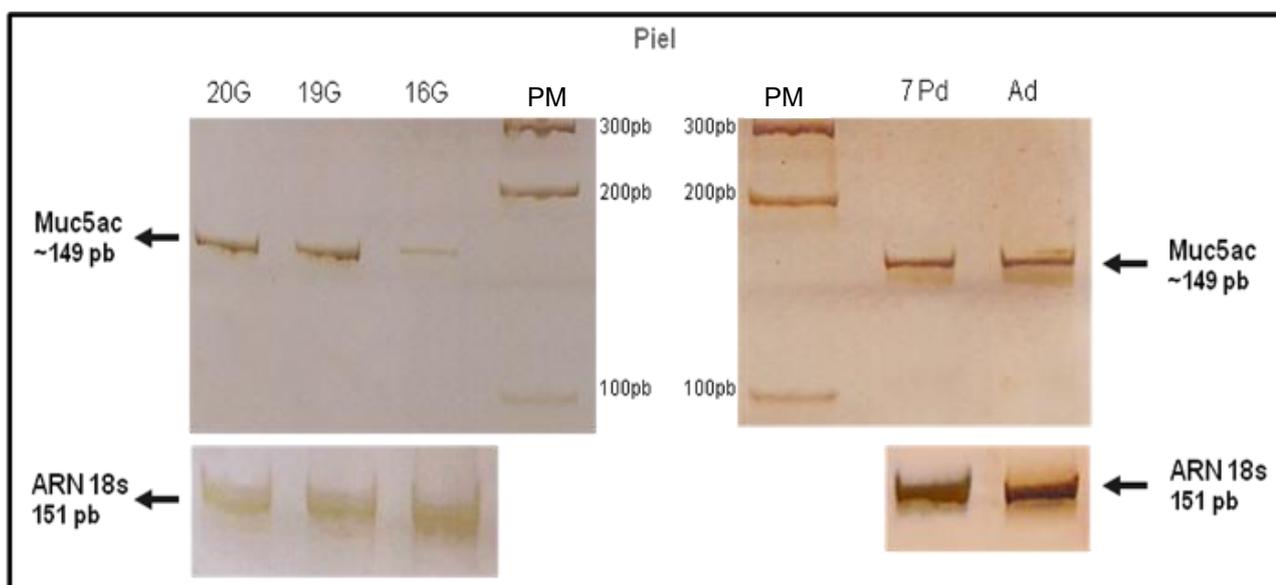


Figura 45. Electroforesis en minigeles de poliacrilamida al 6% de los productos de RT-PCR de muestras de piel de 20, 19 y 16 días de desarrollo, de neonato de 7 días post-nacimiento y de rata adulta. En todos los casos se detectó un amplificado de 149 pb aproximadamente. PM= Marcador de Peso Molecular. Por debajo de cada gel, se muestran los amplificados de ARN 18s de cada una de las muestras analizadas con el fin de comprobar las concentraciones semejantes de las mismas.

3. Análisis de la expresión y localización de antígenos carbohidratos en tejidos embrionarios.

Se analizó la expresión de los antígenos carbohidratos Tn, TF, Lewis x y sialil Lewis x mediante IHQ en tejidos embrionarios, fetales y neonatales de rata.

En la tabla 9 se detalla la intensidad de reacción obtenida mediante IHQ, de la expresión de los antígenos carbohidratos Tn, TF, Le x y sLe x.

3.1. Tn.

El antígeno carbohidrato Tn se expresó a partir de los 17G en epitelio intestinal y en los túbulos renales (Lámina IX, figura 46 A). Hacia los 18G se identificó también en los acinos en formación de las glándulas salivales (Lámina IX, figura 46 B). Más tarde, a partir de los 19G, se detectó al antígeno en glándulas gástricas y epidermis.

Con excepción de la epidermis, que no expresó Tn, los demás tejidos positivos en fetos fueron también reactivos en neonatos.

Es interesante destacar que en los estadios más tempranos, entre los 17 y 18 días de desarrollo, el patrón de reacción observado fue de tipo lineal (Lámina IX, figura 46, A y B). Mientras que hacia estadios más avanzados, 19 y 20 días de gestación (Lámina IX, figura 46 C) y en neonatos, se halló un patrón de reacción de tipo mixto apical, semejante al que se describió en la rata adulta (ver Resultados 1.3).

3.2. TF.

El disacárido TF se expresó a partir de los 16G en los epitelios esofágico y gástrico (Lámina IX, figura 46, D y E). Hacia los 18G se detectó reacción en los conductos excretores y acinos en formación de la glándula salival, en los túbulos distales y corpúsculos renales del riñón y en los estratos más superficiales de la epidermis. A partir de los 20G se halló expresión en el epitelio de revestimiento y glándulas intestinales.

Con excepción del epitelio esofágico, que no expresó TF, los demás tejidos reactivos en embriones y fetos mostraron expresión del disacárido en neonatos.

En todos los casos se observó un patrón de reacción predominantemente lineal.

3.3. Lewis x y sialil Lewis x.

Se detectó Lewis x a partir de los 17G en la mucosa gástrica (Lámina X, figura 47 A), en el epitelio que reviste el intestino grueso, en los túbulos renales y en la epidermis

Resultados

(Lámina X, figura 47 B). Hacia los 19G se observó reacción en intestino delgado (Lámina X, figura 47 C).

Con excepción de la epidermis, que no expresó Le x, los demás tejidos positivos en fetos fueron también reactivos en neonatos.

El patrón de reacción fue predominantemente mixto apical.

Con KM93 (anti- sialil Lewis x), no se observó reacción en ninguno de los tejidos analizados.

Tabla 9. Intensidad de reacción observada mediante IHQ, de los antígenos carbohidratos Tn, TF y Lewis x, en tejidos embrionarios, fetales y neonatos de rata, registrada como ausente (-), leve (+), moderada (++) intensa (+++).

Órgano	Tn					TF					Le x									
	Embriones y Fetos					Neonatos					Embriones y Fetos					Neonatos				
	Días de gestación					Días Postnacim.					Días de gestación					Días Postnacim.				
	16	17	18	19	20	7 - 14	16	17	18	19	20	7 - 14	16	17	18	19	20	7 - 14		
Esófago	-	-	-	-	-	-	++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-		
Estómago	-	-	-	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++		
Int. delgado	-	++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	++	++	-	-	-	++	++	++		
Int. Grueso	-	++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	++	++	-	++	+++	+++	+++	+++		
Páncreas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Hígado	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Gl. Salival	-	-	++	+++	+++	+++	-	-	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-		
Tráquea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Pulmón	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Riñón	-	++	+++	+++	+++	+++	-	-	+++	+++	+++	+++	-	++	+++	+++	+++	+++		
Piel	-	-	-	++	++	-	-	-	++	+++	+++	+++	-	++	+++	+++	+++	-		

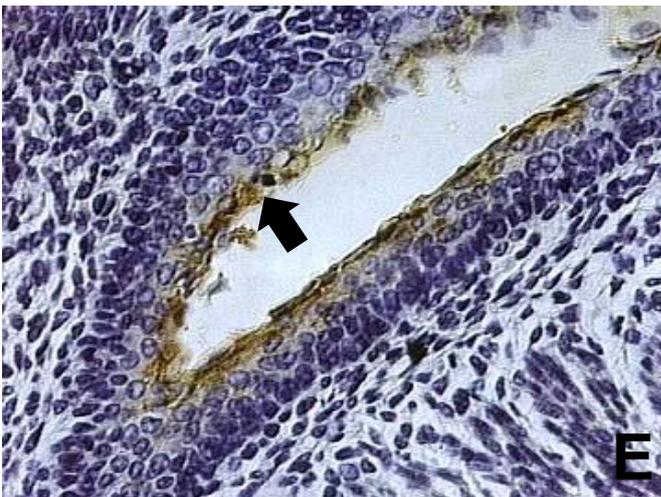
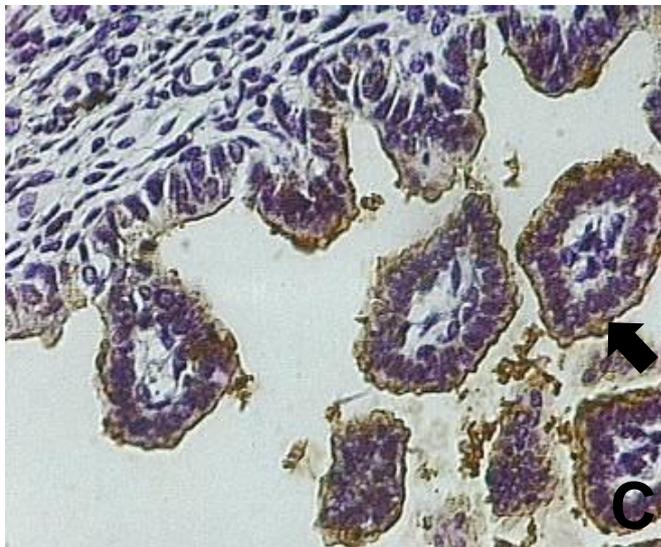
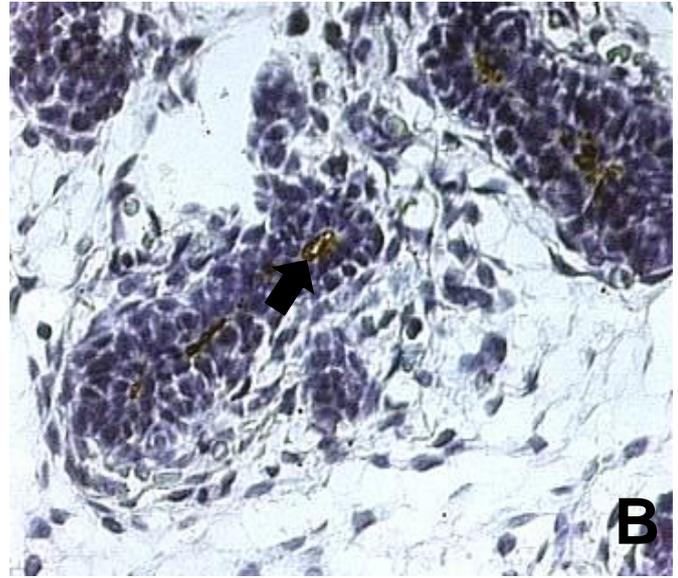
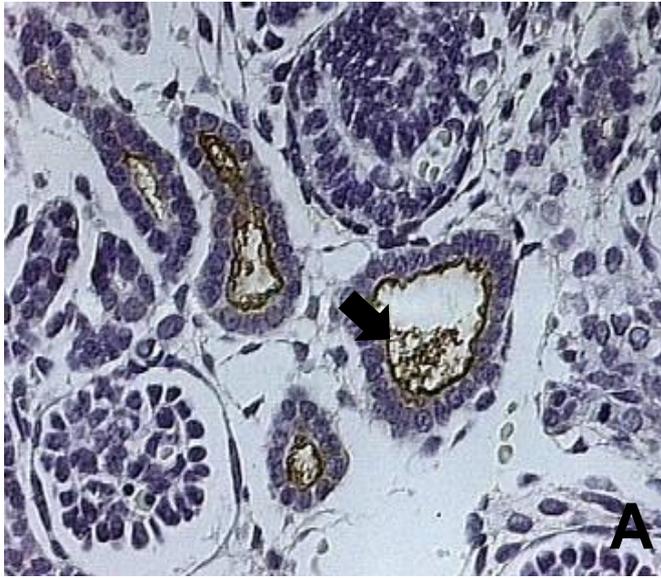


Figura 46. Cortes histológicos incubados con los AMo anti-Tn- A, B y C- y anti-TF - D y E (x400).

A) riñón de 17 días de desarrollo y B) glándula salival de 18 días de gestación, donde se puede apreciar el patrón lineal apical de expresión, C) intestino delgado de 19 días desarrollo, se visualiza un patrón mixto apical;

D) esófago de 16 días de gestación y E) estómago de 17 días de desarrollo. Ambos muestran un patrón predominantemente lineal.

Las flechas señalan la reacción positiva.

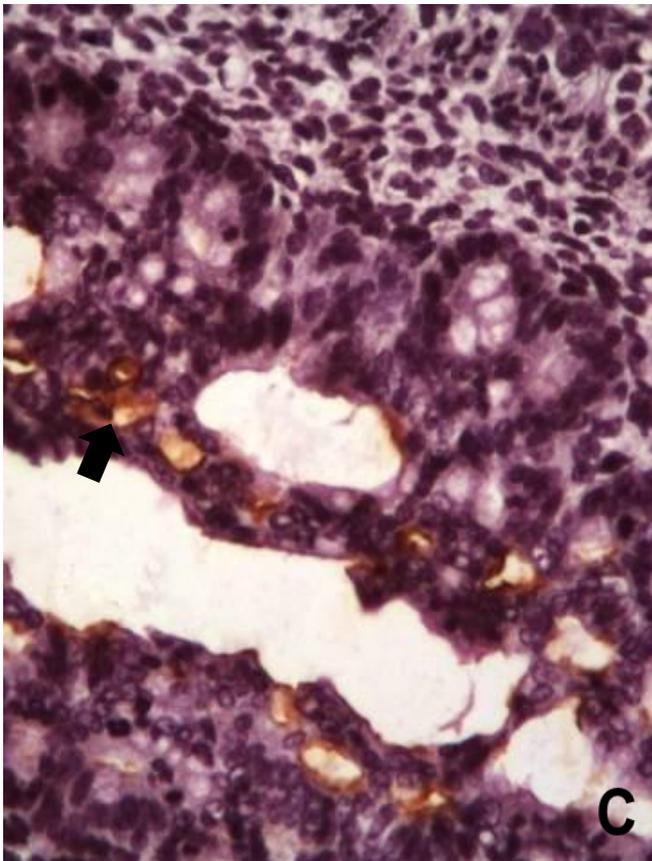
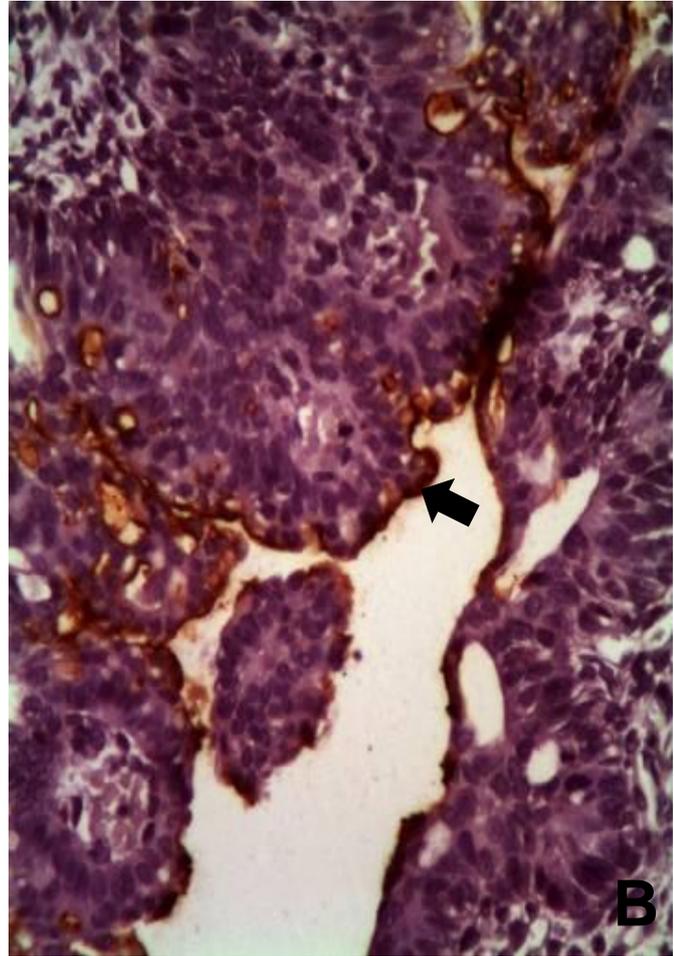
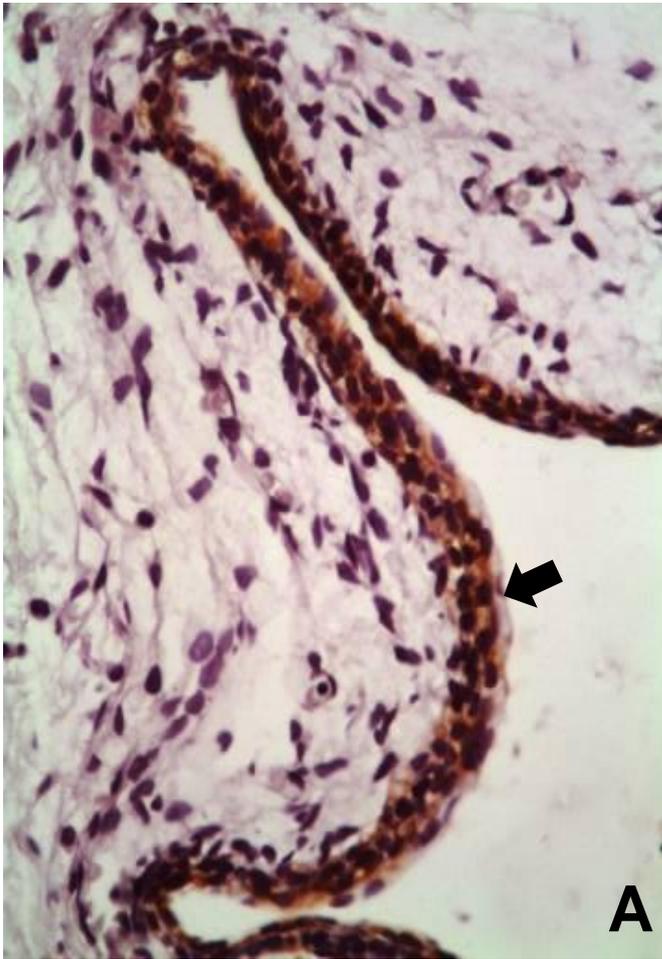


Figura 47. Cortes histológicos incubados con el AMo dirigido contra el antígeno carbohidrato Lewis x (x400).

A- epidermis y B- estómago de 17 días de desarrollo, y C- intestino delgado de 19 días de gestación.

Se visualiza un patrón de reacción predominantemente mixto apical.

Las flechas señalan la reacción positiva.

4. *Análisis de la expresión del gen Rhbdd2 en tejidos embrionarios y fetales.*

Se analizó la expresión del gen Rhbdd2 mediante la técnica IHQ en tejidos de embriones y fetos provenientes de distintos estadíos gestacionales de la rata. En la tabla 10 y en la lámina IX se resumen los resultados obtenidos, la mayor parte de los tejidos analizados mostraron reacción positiva.

Hacia los 16G se detectó expresión de Rhbdd2 en hígado, pulmón, riñón y piel. Los cordones hepáticos en formación mostraron una leve reacción con un patrón citoplásmico y nuclear (Lámina XI, figura 48 A), mientras que en los ductos del pulmón embrionario se visualizó una moderada reacción con un patrón mixto apical (Lámina XI, figura 48 B). Asimismo, en los túbulos néfricos del riñón se observó una leve reacción también con un patrón mixto apical, mientras que la epidermis embrionaria mostró una leve reacción citoplásmica. Hacia los 17G se detectó un aumento en la intensidad de reacción en las muestras de riñón y en los distintos estratos de la epidermis en desarrollo (Lámina XI, figura 48, C y D, respectivamente).

A partir de los 18G se observó expresión de Rhbdd2 en estómago, intestino delgado y grueso. La mucosa gástrica mostró una leve reacción en las glándulas en formación con un patrón predominantemente mixto apical. Resulta interesante destacar el hallazgo de células mucosas con reacción nuclear. En intestino delgado y grueso se detectó un patrón similar de reacción a nivel de las glándulas de Lieberkühn en desarrollo. Los túbulos néfricos del riñón en crecimiento y las células de la epidermis mostraron un aumento en la intensidad de reacción.

Los acinos pancreáticos expresaron Rhbdd2 a partir de los 19G, mostrando una moderada reacción mixta apical (Lámina XI, figura 48 D).

Resultados

Hacia los 20G se detectó un incremento en la intensidad de reacción en los hepatocitos y en las glándulas ubicadas en las mucosas gástrica e intestinal (Lámina XI, figura 48, E y F, respectivamente). La región no glandular del estómago también mostró una elevada reacción citoplásmica.

A diferencia de lo observado en las muestras de rata adulta, las glándulas salivales no presentaron reacción en ninguno de los estadios gestacionales analizados. Estos resultados sugieren una expresión posterior al nacimiento del gen *Rhbdd2*.

Tabla 10. Intensidad de reacción hallada mediante IHQ con el empleo del Ac TA306891, dirigido contra RHBDD2 humano en los tejidos de rata embrionarios, fetales y adultos analizados, registrada como ausente (-), leve (+), moderada (++) intensa (+++). C= patrón de reacción citoplásmico, Map= patrón de reacción mixto apical, N= patrón de reacción nuclear.

Órgano	Embriones y Fetos					Adultos
	Días de gestación					Semanas
	16	17	18	19	20	10 - 12
Esófago	-	-	-	-	-	-
Estómago	-	-	+ (Map/N)	+ (Map/N)	++ (Map/N/C)	++ (Map/N/C)
Int. delgado	-	-	++ (Map/N)	++ (Map/N)	+++ (Map/N)	+++ (Map/N)
Int. Grueso	-	-	++ (Map/N)	++ (Map/N)	+++ (Map/N)	+++ (Map/N)
Páncreas	-	-	-	++ (Map)	++ (Map)	++ (Map)
Hígado	+ (C/N)	+ (C/N)	+ (C/N)	+ (C/N)	++ (C/N)	++ (C/N)
Gl. Salival	-	-	-	-	-	+ (C)
Tráquea	-	-	-	-	-	-
Pulmón	++ (Map)	++ (Map)	++ (Map)	++ (Map)	++ (Map)	++ (Map)
Riñón	+ (Map)	++ (Map)	+++ (Map)	+++ (Map)	+++ (Map)	+++ (Map)
Piel	+ (C)	++ (C)	++ (C)	++ (C)	++ (C)	++ (C)

Según el análisis estadístico realizado, hubo una asociación positiva altamente significativa ($p \leq 0,001$) entre la intensidad de reacción y el grado de avance en el desarrollo (Tabla 11).

Tabla 11. Medidas de asociación entre la intensidad de reacción de *Rhbdd2* y la variable estadio de desarrollo. Se observa asociación positiva altamente significativa entre las variables ($p \leq 0,001$).

		Valor	Error típ. asint. ^a	T aproximada ^b	Sig. aproximada
Ordinal por ordinal	Tau-b de Kendall	,434	,023	16,345	,000
	Gamma	,616	,032	16,345	,000
N de casos válidos		550			

a. Asumiendo la hipótesis alternativa.

b. Empleando el error típico asintótico basado en la hipótesis nula.

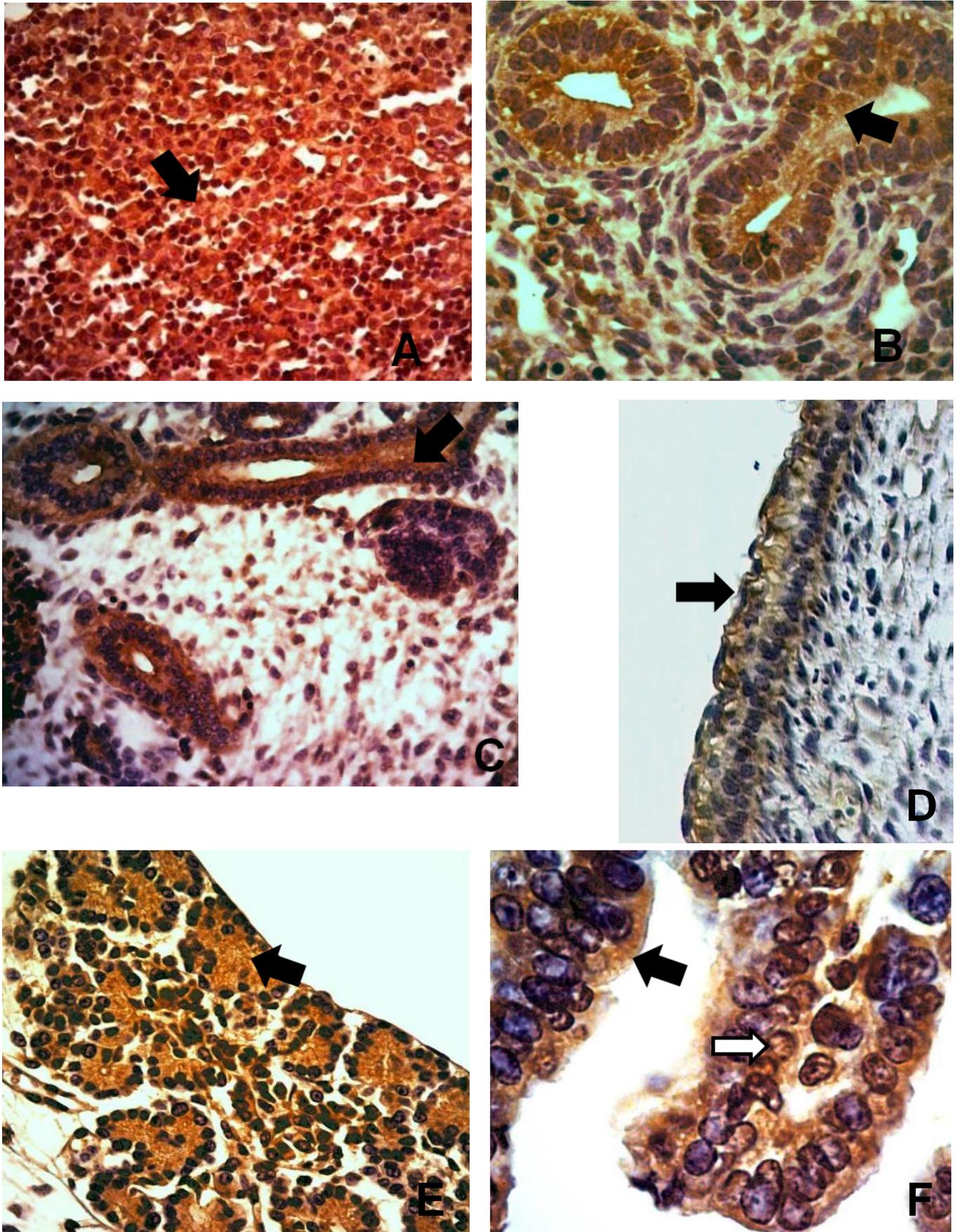


Figura 48. IHQ realizadas con el Ac dirigido contra RHBDD2 humana de hígado (A) y pulmón (B) de 16 días de gestación, riñón (C) y piel (D) de 17 días de desarrollo, páncreas de 19 días de gestación (E) y estómago de 20 días de desarrollo (F). A, B, C, D y E= x400, F=x1000. Las flechas negras señalan la reacción positiva, mientras que la flecha blanca señala la reacción nuclear.

Por otra parte, con el fin de verificar si el anticuerpo TA306891 reconoce a Rhbdd2 de rata y por ende no reacciona con otro epítopo, se seleccionaron dos muestras que fueron reactivas en la IHQ y se procedió al análisis mediante WB. Se analizaron homogenados de estómago e intestino delgado de rata adulta. En ambos casos se obtuvo una banda de menor a 40 KDa (Figura 49). Este resultado fue concordante con lo que se esperaba, considerando que el epítopo que reconoce el anticuerpo (RHBDD2 humano) tiene un tamaño de 35 KDa.

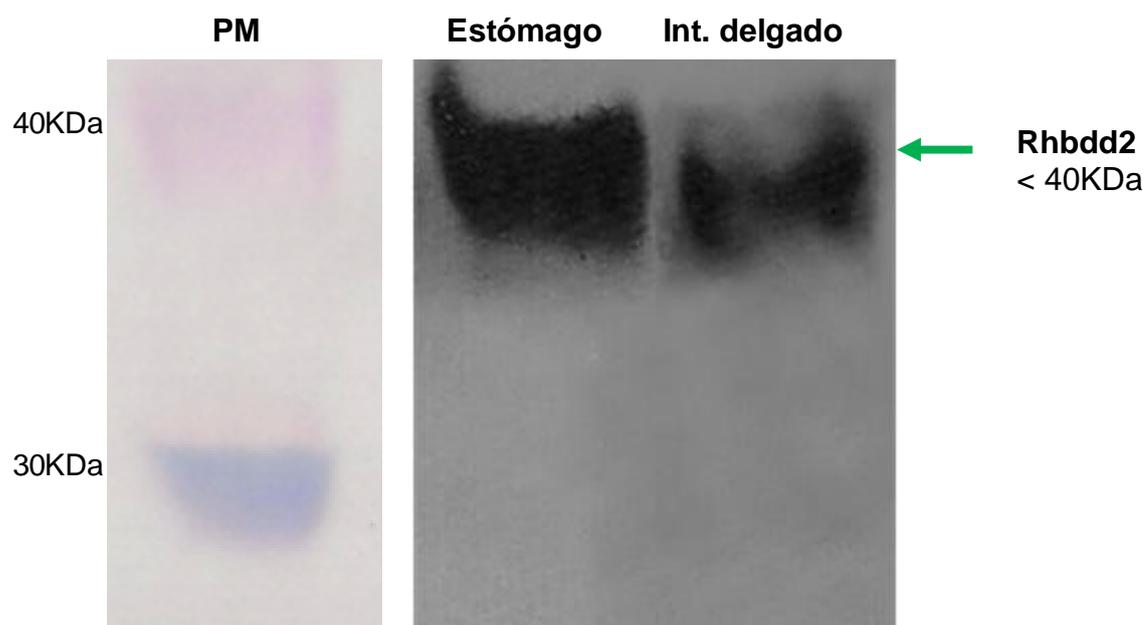


Figura 49. Análisis mediante WB con el empleo del Ac TA306891 de estómago e intestino delgado de rata adulta. En ambos casos se detectó una banda menor a 40 KDa.

Se utilizó el marcador de peso molecular ColorBurst™ Electrophoresis Marker, Sigma (PM).

5. *Análisis de la expresión de las mucinas Muc1, Muc2 y Muc5ac en el desarrollo postnatal normal de la glándula mamaria y de tumores asociados a la misma.*

Considerando las distintas etapas en el desarrollo postnatal normal de la glándula mamaria de rata ya comentadas, se procedió al análisis de la glándula en rata: juvenil (7PD), prepuberal (15PD), puberal (25PD), adulta virgen (60PD), adulta en preñez (gestacional), adulta en lactancia, adulta en involución post-lactancia (10 días post-destete) y adulta en involución senil (24 meses de vida).

Por otro lado, a fin de establecer comparaciones, se analizaron muestras neoplásicas benignas y carcinomas asociados a la glándula mamaria.

5.1. *Muc1, Muc2 y Muc5ac en el desarrollo postnatal normal de la glándula mamaria.*

Se procedió al análisis de la expresión de las mucinas Muc1, Muc2 y Muc5ac mediante IHQ en las distintas etapas del desarrollo postnatal normal de la glándula mamaria. Se emplearon los anticuerpos EP1024Y, H-300 y 45M1, respectivamente.

En la tabla 12, en la figura 50 y en la lámina XII se resumen los resultados obtenidos. Se detectó a la mucina Muc1 en la glándula mamaria en lactancia, en involución post-lactancia y en involución senil (Lámina XII, figura 51, A y B). En todos los casos se registró un patrón de reacción predominantemente mixto apical. La glándula mamaria lactante mostró una intensa reacción con un elevado porcentaje de reacción, en tanto que, en los estadios de involución post-lactancia y senil, se detectó una reacción moderada con un porcentaje de expresión menor.

Mediante IHQ y con el empleo del anticuerpo H-300 no fue posible detectar Muc2 en ninguna de las etapas del desarrollo postnatal estudiadas.

Por otra parte, se halló expresión de Muc5ac en todas las etapas analizadas, con excepción de la etapa lactante (Lámina XII, figura 51, C y D). En todas las muestras positivas se visualizó un patrón de reacción mixto apical, con una intensidad que varió de leve a moderada.

Tabla 12. Intensidad de reacción hallada mediante IHQ con el empleo de los anticuerpos EP1024Y (anti-Muc1) H300 (anti-Muc2 y 45M1 (anti-Muc5ac), en la glándula mamaria en desarrollo postnatal, registrada como ausente (-), leve (+), moderada (++) , intensa (+++). Map= patrón reacción mixto apical, sec= reacción positiva en la secreción.

Etapas del desarrollo de la glándula mamaria	Edad (Días/meses)	Muc1	Muc2	Muc5ac
Juvenil	7 días	-	-	+ Map
Prepuberal	15 días	-	-	+ / ++ Map
Puberal	25 días	-	-	+ / ++ Map
Adulto vírgen	60 días	-	-	+ / ++ Map
Adulto gestacional*	~ 90 días	-	-	+ / ++ Map/sec
Adulto en lactancia	~ 90 días	+++ Map	-	-
Adulto en involución postlactancia**	10 meses	++ Map	-	+ / ++ Map
Adulto en involución senil***	24 meses	++ Map	-	+ / ++ Map

* entre 12 y 20 días de gestación, **10 días posteriores al destete, *** ratas viejas

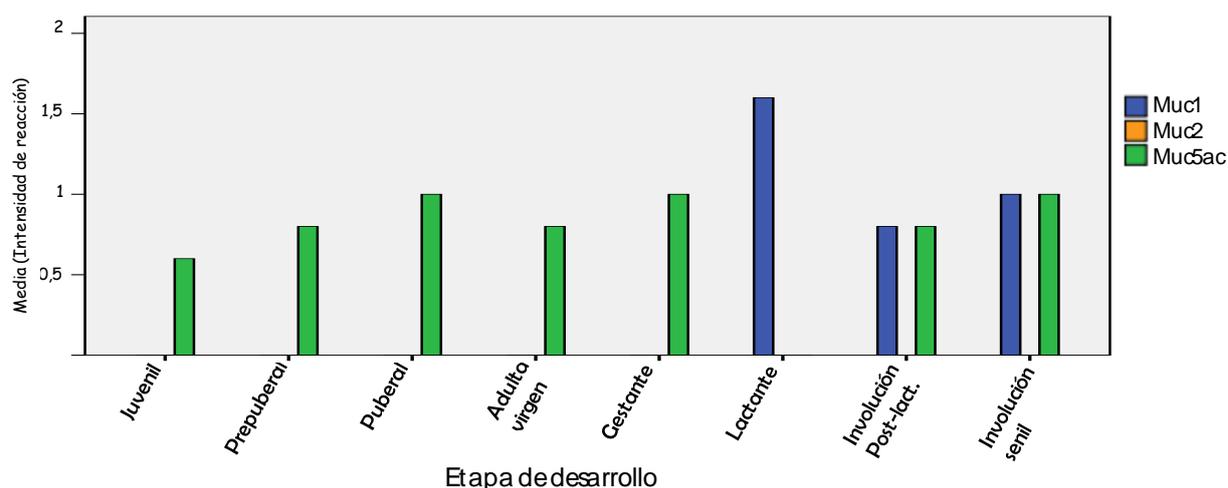


Figura 50. Resultados hallados mediante IHQ de la expresión de las mucinas Muc1, Muc2 y Muc5ac en las distintas etapas de desarrollo postnatal de la glándula mamaria.

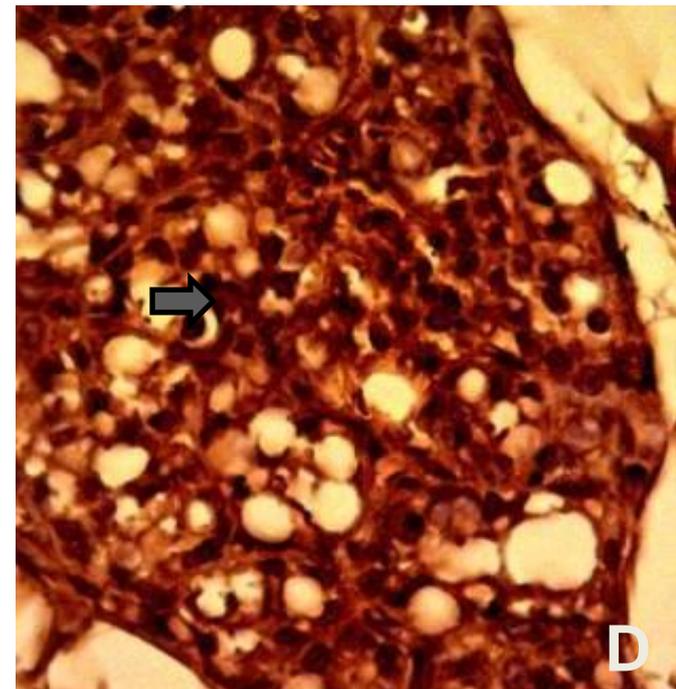
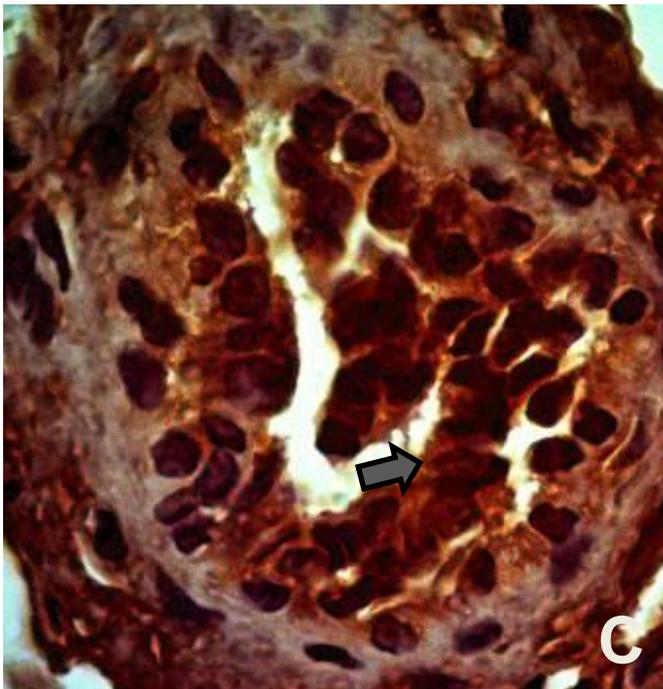
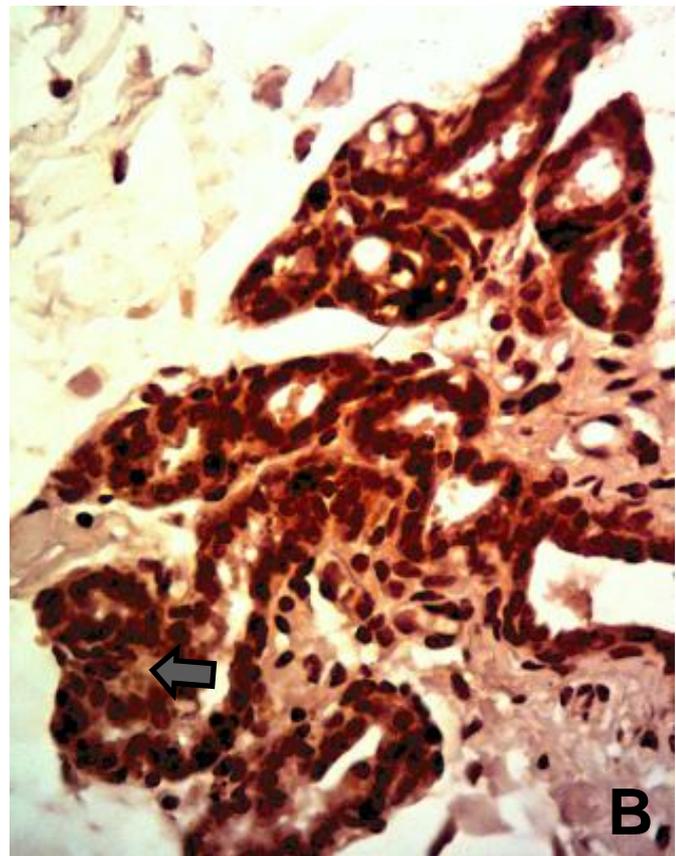
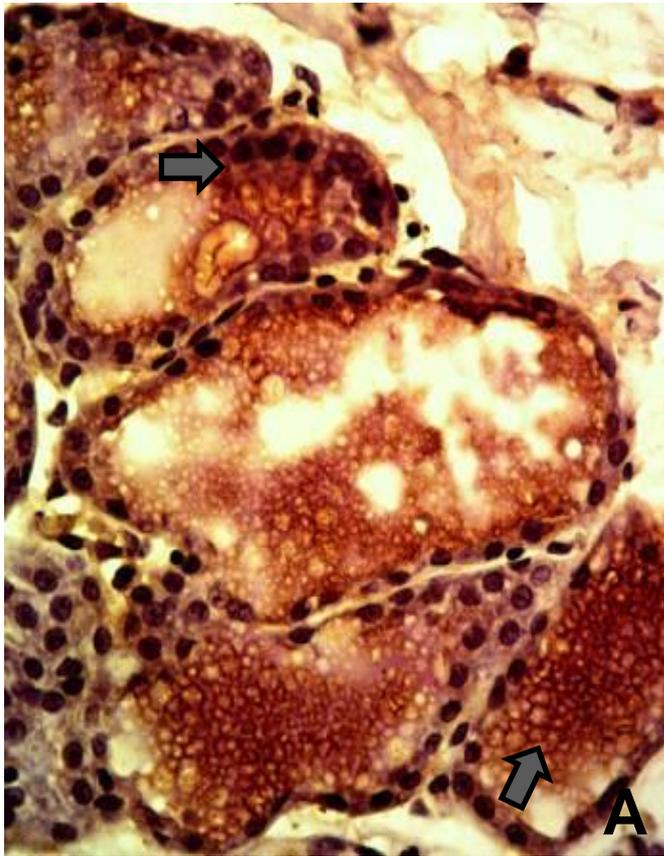


Figura 51. IHQ realizadas en glándula mamaria en distintas etapas de desarrollo con el empleo de los anticuerpos anti-MUC1 -A y B- y anti-MUC5AC - C y D.

A- Lactancia (1000x), B- involución senil (400x), C- juvenil (1000x) y D- involución post-lactancia (400x).

Las flechas señalan la reacción positiva.

Resultados

Con el objeto de profundizar el estudio de la expresión de Muc1, Muc2 y Muc5ac en glándula mamaria en desarrollo postnatal normal, y comparar con los resultados obtenidos mediante IHQ, se realizó un análisis de expresión a nivel del ARN mensajero. Se extrajo ARN de muestras de glándula mamaria en las distintas etapas de desarrollo, se sometió a electroforesis desnaturalizante y posteriormente a RT-PCR. Así se obtuvo el ADNc al cual se le midió la concentración mediante el equipo **Nanodrop®**, lo que permitió obtener muestras con concentraciones semejantes para su posterior análisis comparativo. Finalmente, se efectuaron las reacciones de amplificación (PCR) con el ADNc obtenido de las muestras y el empleo de los cebadores descriptos (ver Materiales y métodos).

Como resultado, se observó amplificado de Muc1 en todas las muestras incluidas, no se detectaron diferencias significativas entre las mismas (Figuras 52 A y 53).

Por otro lado, se halló una muy leve expresión de Muc2 en todas las etapas analizadas, principalmente en las etapas puberal, gestante e involución senil (Figuras 52 B y 53). Estos resultados difieren de los obtenidos mediante IHQ, dado que no fue detectada Muc2 mediante dicha técnica en las muestras analizadas. Este hecho podría ser consecuencia de diferencias en la sensibilidad de las metodologías empleadas. Es probable que la cantidad de proteína en las muestras analizadas no sea suficiente para ser detectada por la técnica utilizada. O bien, podría ser que exista un mecanismo de control de la expresión postranscripcional.

Las muestras de glándula mamaria analizadas mostraron expresión de Muc5ac en todas las etapas analizadas, excepto durante la lactancia. Mientras que en la etapa de involución post-lactante, el nivel de expresión fue bajo en comparación con las restantes etapas (Figuras 52 C y 53). Estos resultados son concordantes con los obtenidos

mediante el empleo de IHQ.

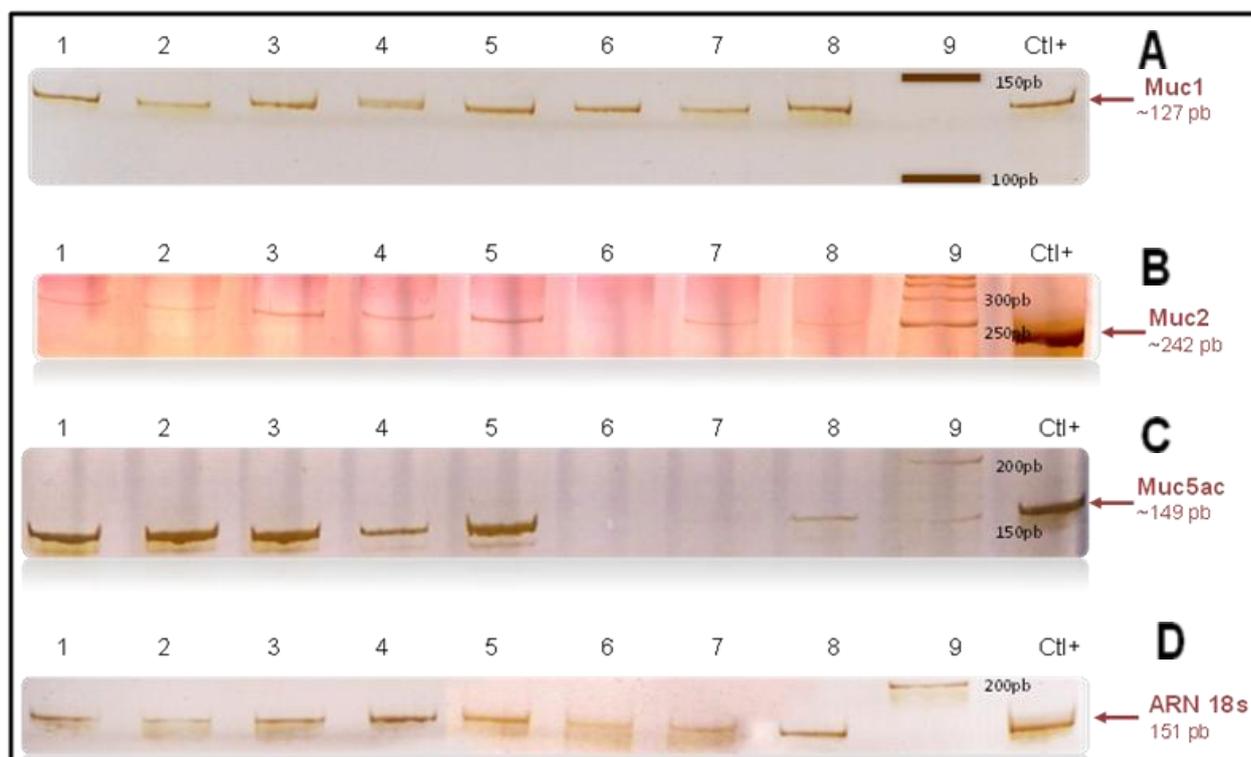


Figura 52. Electroforesis en minigeles de poliacrilamida al 6%. Se observan amplificados de A- Muc1, B- Muc2, C- Muc5ac y D- ARN 18s. A, B y D ctl+= estómago adulto, C ctl+= intestino delgado adulto. Muestras de glándula mamaria 1- juvenil, 2- prepuberal, 3- puberal, 4- gestante (14 días de gestación), 5- gestante (20 días de gestación), 6 y 7- lactante, 8- involución post-lactancia y 9- Marcador de peso molecular.

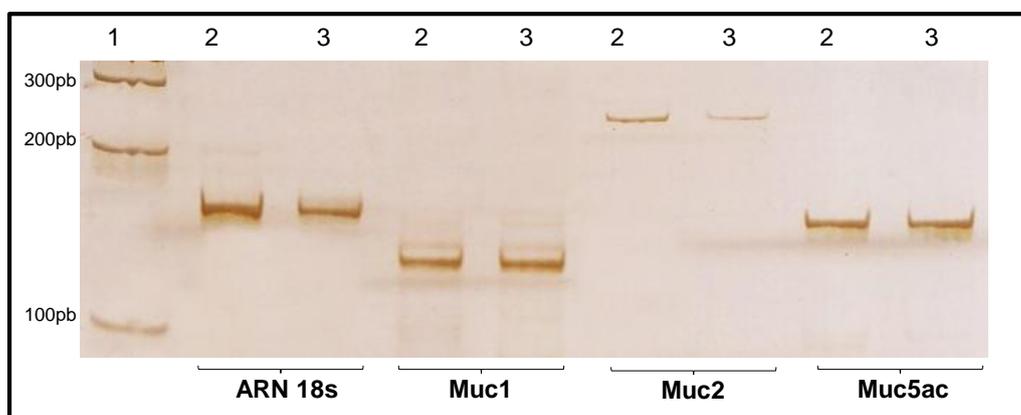


Figura 53. Electroforesis en minigel de poliacrilamida al 6%. Se observan amplificados de ARN 18s, Muc1, Muc2 y Muc5ac. 1- Marcador de peso molecular, 2 y 3- glándula mamaria en involución senil.

5.2. Muc1, Muc2 y Muc5ac en muestras neoplásicas asociadas a la glándula mamaria.

Se analizó la expresión de Muc1, Muc2 y Muc5ac en muestras neoplásicas benignas y carcinomas mamarios (Lámina XIII, Figura 54 A y B) formados espontáneamente, en

Resultados

ratas adultas de 22 meses de vida, a fin de comparar con los patrones de expresión de las mucinas durante el desarrollo de la glándula mamaria.

Mediante la técnica IHQ y el empleo de los anticuerpos EP1024Y, H-300 y 45M1 se analizó la expresión de Muc1, Muc2 y Muc5ac, respectivamente. Se detectó a la mucina Muc1 en las muestras de neoplasias malignas, con una intensa reacción y un elevado porcentaje de expresión (Lámina XIII, Figura 54 C). En tanto que los tumores benignos fueron negativos.

Por otra parte, las muestras neoplásicas analizadas mediante IHQ, mostraron reacción negativa para Muc2 y Muc5ac.

Con el fin de validar los resultados obtenidos mediante IHQ, y profundizar el estudio de la expresión de Muc1, Muc2 y Muc5ac en muestras de lesiones benignas y carcinomas asociados a la glándula mamaria, se realizó un análisis de expresión a nivel del ARN mensajero. Se extrajo ARN de las muestras mencionadas y se sometió a RT-PCR para obtener el ADNc.

Esto permitió obtener muestras con concentraciones semejantes para su posterior análisis comparativo. Finalmente, se efectuaron las reacciones de amplificación (PCR) con el ADNc obtenido de las muestras y el empleo de los cebadores descriptos (ver Materiales y métodos).

Como resultado, se observó amplificado de Muc1, Muc2 y Muc5ac en todas las muestras analizadas (Figura 55). Se detectó una elevada expresión de Muc1 y Muc5ac en lesiones benignas y carcinomas, mientras que la expresión de Muc2 fue relativamente baja.

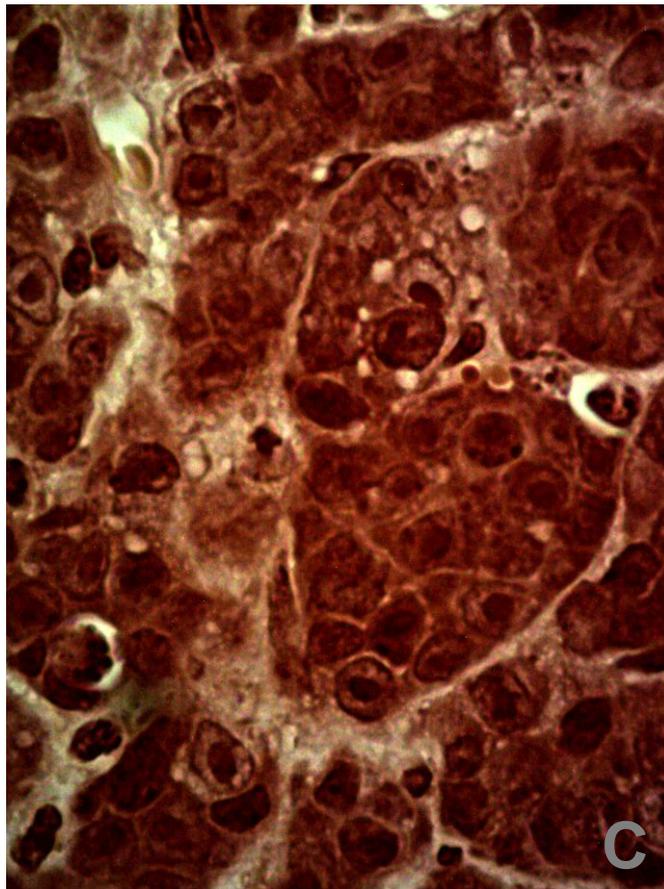
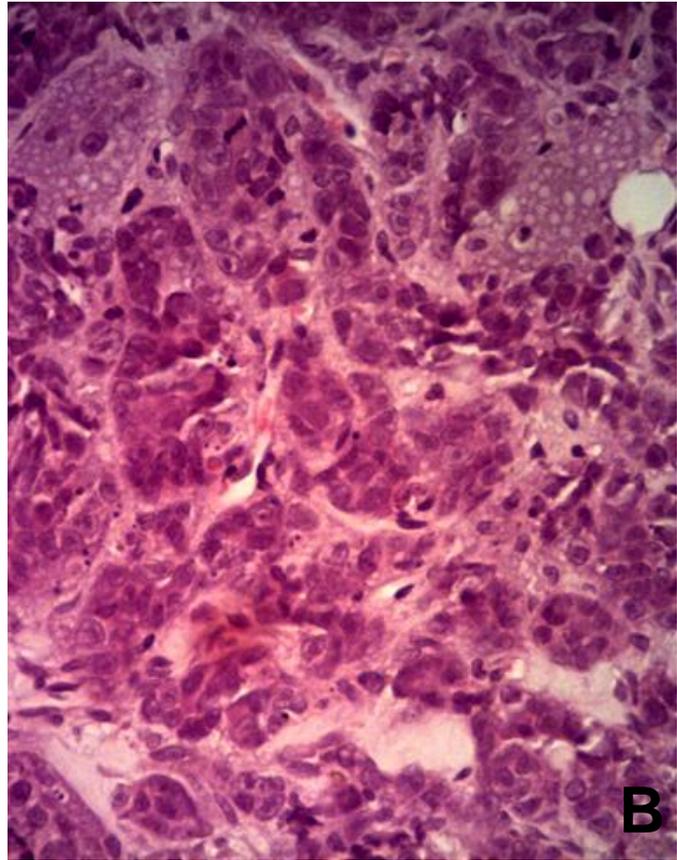


Figura 54. Cortes histológicos de tumores asociados a la glándula mamaria de rata,
A) - Tumor benigno con tinción hematoxilina - eosina (100x),
B) - Carcinoma con tinción hematoxilina - eosina (100x),
C) - IHQ realizada con el anticuerpo anti-Muc1 en carcinoma mamario (400x).

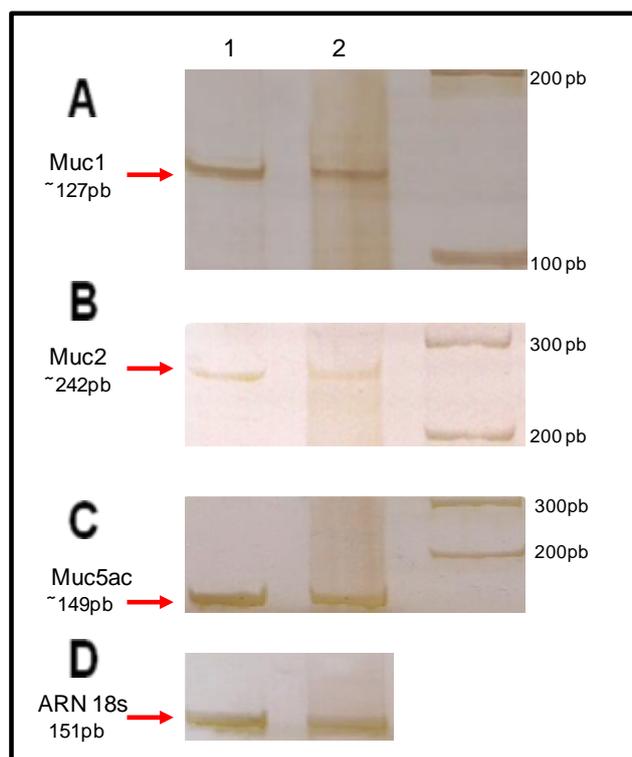


Figura 55. Electroforesis en minigeles de poliacrilamida al 6%. Se observan amplificadas de A- Muc1, B- Muc2, C- Muc5ac y D- ARN 18s.

Muestras neoplásicas 1- benigna, 2- maligna, y 3- Marcador de peso molecular.

6. Análisis mediante mapas de calor y agrupamientos jerárquicos, análisis factorial y resumen.

Se realizó una matriz de expresión en la que las filas corresponden a las muestras y las columnas a los antígenos. Obtenida la matriz, se empleó el programa *Multiexperiment Viewer*® para representar gráficamente la matriz como un mapa de calor y para aplicar el método estadístico no supervisado de agrupamientos jerárquicos, el cual permite agrupar las muestras y antígenos en grupos con perfiles similares.

En un primer análisis se obtuvieron los perfiles de expresión para cada uno de los antígenos Muc1¹¹, Muc2, Muc5ac, Rhbdd2, Le x, Tn y TF, en los distintos tejidos y estadios del desarrollo analizados (Figura 56).

Luego se procedió al análisis de la expresión de todos los antígenos estudiados, con el fin de generar agrupamientos basados en perfiles similares (Figura 57). En este sentido se observa, por un lado, una estrecha asociación entre Muc1 y Rhbdd2 y entre Muc5ac y

¹¹ Se incluyeron los resultados obtenidos con el empleo del Ac CT33 dirigido contra la cola citoplasmática de la MUC1 humana.

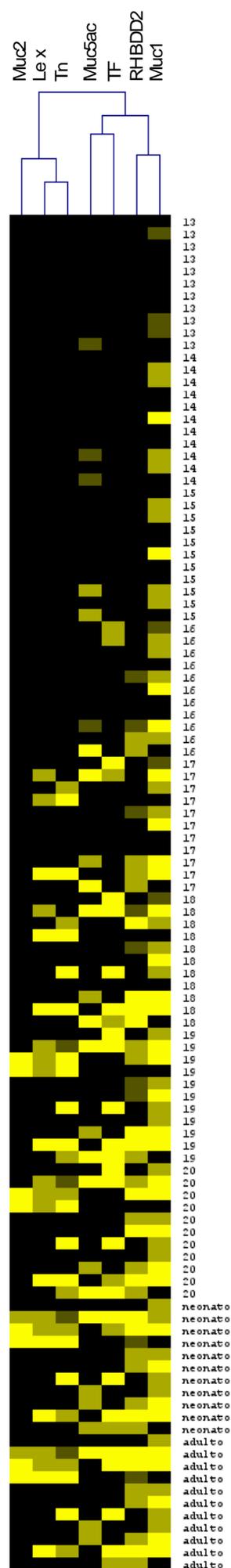


Figura 57. Mapa de calor donde se visualizan los antígenos agrupados según perfiles similares. Se observa, por un lado, una estrecha asociación entre Muc1 y Rhbdd2 y entre Muc5ac y TF, estando a su vez los cuatro antígenos agrupados por un nodo superior. Por otro lado, se observa una clara asociación entre los carbohidratos Le x y Tn, los cuales muestran un perfil de expresión más cercano a Muc2 que al resto de los antígenos.

Resultados

Finalmente, se evaluó la asociación entre los distintos antígenos empleando un análisis factorial con componentes principales (PCA). Se obtuvieron una serie de componentes capaces de resumir y explicar las variaciones entre las muestras. A partir de los 3 componentes principales se construyó un sistema de coordenadas donde la abscisa representó el componente 1, la ordenada representó el componente 2 y el eje Z representó al componente 3 (Figura 58). El porcentaje incluido con cada componente representó la magnitud de las variaciones observadas que dicho componente fue capaz de explicar. La longitud de cada vector fue directamente proporcional al peso que esa variable tuvo para el modelo. La proximidad del vector a la abscisa o a la ordenada o al eje Z representó a su vez la correlación que las variables presentaron con los componentes 1, 2 y 3, así como la proyección de esa variable sobre los ejes demostró el peso de la variable sobre cada factor. Con el empleo de este sistema los componentes 1, 2 y 3 lograron explicar las variaciones observadas en el 70 % de los datos.

Se identificaron 2 grupos de asociación: Muc1 con Rhbdd2 por un lado y los carbohidratos Le x y Tn por otro. Muc2 aparece próximo al grupo de asociación formado por Le x y Tn, mientras que Muc5ac y TF no parecen estar asociados con los otros antígenos incluidos en el análisis.

Según la matriz de correlaciones (Tabla 13), los carbohidratos Le x y Tn presentan el mayor grado de correlación con un valor de $r=0,645$ ($p=0,001$), las variables Muc1 y Rhbdd2 presentan un coeficiente de correlación de $r=0,506$ ($p=0,001$), mientras que Muc2 y Le x presentan un valor de correlación de $r=0,407$ ($p=0,001$).

Gráfico de componentes en espacio rotado

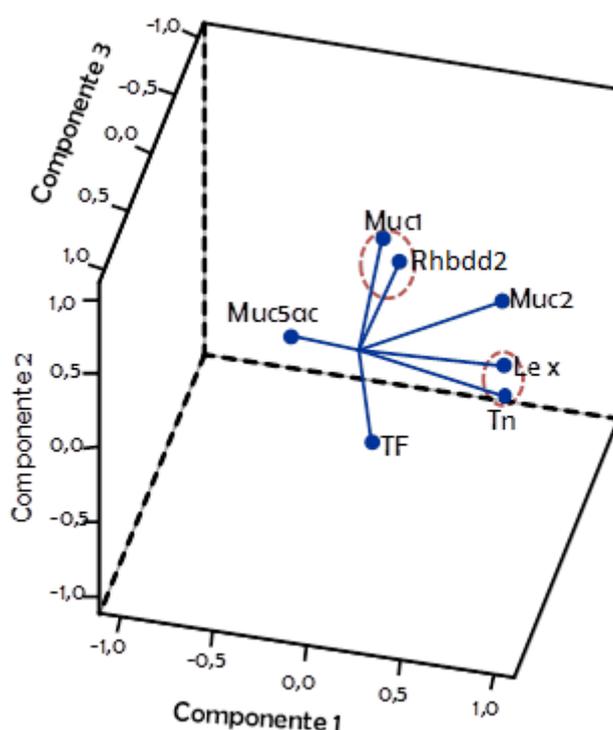


Figura 58. Gráfico tridimensional de la asociación entre las distintas variables halladas según el análisis factorial con componentes principales. Se pueden observar 2 grupos de asociación claramente identificables: Muc1 y Rhbdd2 por un lado, Tn y Le x por otro. Muc2 aparece próximo al grupo formado por Tn y Le x, mientras que Muc5ac y TF no muestran asociación con los otros antígenos incluidos en el análisis.

Tabla 13. Matriz de correlaciones. Se visualizan los coeficientes de correlación de Pearson entre cada par de antígenos analizados. La tabla muestra además los niveles de significancia (Sig. Unilateral) asociados a cada coeficiente de correlación.

		Muc1	Muc2	Muc5ac	Tn	TF	Le x	Rhbdd2
Correlación	Muc1	1,000	,081	,149	,197	,234	,262	,506
	Muc2		1,000	-,040	,375	,010	,407	,231
	Muc5ac			1,000	-,005	,266	,034	,373
	Tn				1,000	,313	,645	,284
	TF					1,000	,318	,303
	Le x						1,000	,413
	Rhbdd2							1,000
Sig. (Unilateral)	Muc1		,029	,000	,000	,000	,000	,000
	Muc2			,173	,000	,403	,000	,000
	Muc5ac				,455	,000	,216	,000
	Tn					,000	,000	,000
	TF						,000	,000
	Le x							,000
	Rhbdd2							

Resultados

En términos generales, podemos decir que las asociaciones encontradas entre los distintos antígenos con el empleo del PCA se hallan en concordancia con los agrupamientos jerárquicos que pueden visualizarse en los mapas de calor, generados con el programa *Multiexperiment Viewer*®. Ambos análisis muestran, por un lado, una estrecha asociación entre Muc1 y Rhbdd2. Por otro lado, se observa una clara asociación entre los carbohidratos Le x y Tn, los cuales muestran un perfil de expresión más cercano a Muc2 que al resto de los antígenos.

DISCUSIÓN

1. Análisis de la expresión de las mucinas Muc1, Muc2 y Muc5ac, de Rhbddd2 y de los antígenos carbohidratos Tn, TF, Le x y sLe x en tejidos adultos y embrionarios.

Los mecanismos biológicos de inducción, proliferación, diferenciación, migración y muerte celular que ocurren en el desarrollo embrionario son el resultado de la expresión selectiva de genes que ocurre en un momento preciso con un patrón determinado.

Es sabido que los mismos genes pueden tener diferentes funciones en distintas etapas del desarrollo y en órganos diferentes. Cada sistema corporal tiene su patrón de desarrollo, pero la mayor parte de los procesos de la morfogénesis son similares, existiendo mecanismos básicos de regulación [Nothias et al., 1995; Adachi-Yamada et al., 2002; Gilbert, 2005].

Los mismos procesos que ocurren en el desarrollo intervienen en la oncogénesis [Potter, 2011]. Los estudios de expresión de las mucinas, de los carbohidratos asociados y de Rhbddd2 se han interesado principalmente en el papel que presentan en la carcinogénesis y en la progresión tumoral, pero el rol que cumplen en la embriogénesis humana y no humana es poco conocido.

En el presente estudio se analizó, en una primera parte, la expresión de las mucinas Muc1, Muc2, Muc5ac, de los antígenos carbohidratos Tn, TF, Le x y sLe x, y de la proteína Rhbddd2 en tejidos adultos y embrionarios mediante el empleo de las técnicas IHQ, SDS-PAGE, WB, dot blot y RT-PCR.

1.1. Muc1.

Se estudió la expresión de Muc1 en adultos, neonatos y distintos estadios gestacionales de rata mediante IHQ, con el empleo de un anticuerpo anti-MUC1CT humana, dirigido

contra el dominio citoplásmico CT altamente conservado de la MUC1 [Croce et al., 2006].

Como es sabido, la MUC1 fue la primera mucina en ser clonada, inicialmente a partir de carcinoma mamario, y posteriormente, a partir de otros tejidos normales y neoplásicos, ya que se halla ampliamente expresada en los epitelios adultos de distintas localizaciones [Lan et al., 1990; Gendler et al., 2001; Croce et al., 2003, 2006; Lacunza et al., 2009]. Fue por tal motivo que se procedió al análisis de la expresión de la mucina 1, desde la etapa embrionaria hasta el nacimiento, en órganos que expresan Muc1 en adultos. Durante la etapa embrionaria, la glándula mamaria es difícil de identificar, debido a su escaso desarrollo, y en consecuencia, se excluyó de este estudio. Posteriormente, se analizó la expresión de Muc1 durante el desarrollo postnatal de la glándula.

En el presente trabajo se observó reacción en la mayoría de los epitelios adultos y neonatos de rata analizados; en esófago, estómago, intestino delgado y grueso, glándulas salivales, hígado, páncreas, pulmón, riñón y tráquea. El patrón de reacción fue predominantemente apical, lo cual coincidió con lo hallado en trabajos realizados previamente [Girling et al., 1989; Croce et al., 1997; Lacunza et al., 2009]. No se detectó expresión de Muc1 en las muestras de piel y de glándula mamaria de rata no preñada. Este resultado podría deberse al alto contenido de tejido graso en la glándula mamaria no preñada, según lo encontrado por Lacunza y col. (2009).

Por otra parte, los resultados hallados mostraron expresión de la Muc1 de rata en varios tejidos epiteliales embrionarios, siendo los epitelios gástrico, pulmonar y renal, los primeros en mostrar reactividad (13G). En consecuencia, estos resultados sugieren un importante rol de la Muc1 en el desarrollo temprano de estos órganos.

Hacia los 14G se detectó una reacción moderada en las células epiteliales del revestimiento intestinal y de los túbulos pancreáticos en desarrollo. Estudios realizados en rata han demostrado que entre los 14 y 16G, el intestino en desarrollo se somete a una intensa proliferación epitelial que ocluye parcialmente el lumen intestinal, en tanto que, a los 15G, las células proliferativas se hacen evidentes en el lumen [Meió et al., 2008]. En coincidencia con este hecho, los resultados arrojados por el presente estudio mostraron que a los 14G la expresión de Muc1 se limitó al epitelio de revestimiento mientras que a los 15G también fueron reactivas las células proliferativas del intestino. Estas observaciones indican que la Muc1 podría estar asociada a la proliferación.

Tal como se dijo previamente, entre los 13 y los 14G, las yemas epiteliales pancreáticas se hallan sometidas a procesos de elongación y ramificación. Lo que nos permite pensar que la detección de Muc1 a los 14G, podría estar vinculada a la diferenciación del epitelio pancreático. Por otra parte, la intensidad de la reacción se vio incrementada en los días siguientes (16-20G), lo cual coincide con el adelgazamiento del lumen de las estructuras tubulares y la diferenciación de los acinos serosos, que se tornan evidentes a partir de los 17-18G. Estos resultados están de acuerdo con lo observado por Braga y col. (1992) en el estudio de la embriogénesis del ratón, en el cual, hallaron expresión de Muc1, en coincidencia con la diferenciación epitelial y la formación de las glándulas.

A partir de los 16G, se observó reacción positiva en los cordones hepáticos embrionarios. Resulta interesante destacar que en este estadio, los hepatoblastos se encuentran en un período de migración activo [St-Pierre et al., 2004; Hayashi et al., 2008]. Estos datos, nos permiten sugerir un posible rol de la Muc1 en la migración celular. Sin embargo, serían necesarios estudios complementarios para confirmar dicha hipótesis.

Discusión

El epitelio esofágico también mostró reacción a partir de los 16G, momento en el cual, consiste en una lámina de 2-3 capas de células indiferenciadas. A partir de los 17G, tales células indiferenciadas, comienzan a diferenciarse en las células escamosas características del esófago. Por lo tanto, no resulta sorprendente la detección de Muc1 previa a la diferenciación. Diversos estudios realizados en muestras humanas sugieren que la MUC1, así como otras mucinas podrían estar involucradas en la diferenciación celular de las células epiteliales del esófago [Guillem et al., 2000].

Las glándulas salivales y la tráquea, mostraron expresión de Muc1 a partir de los 18G. En cuanto a las glándulas salivales, la detección de la mucina es posterior al inicio de la diferenciación de las estructuras tubulares epiteliales (16G), pero, como se mencionó previamente, la mayor parte del desarrollo de las mismas ocurre en los últimos estadios gestacionales y fundamentalmente, luego del nacimiento. Por otro lado, las células del epitelio traqueal resultan indiferenciadas hasta los 17G, mientras que a partir de los 18G, en coincidencia con la detección de Muc1, comienzan a visualizarse células secretoras y algunas células ciliadas inmaduras [McAteer, 1984; Randell et al., 1993; Qi et al., 2000]. Estos resultados sugieren que la Muc1 también puede ser importante en la diferenciación del epitelio traqueal.

Braga y col. (1992) estudiaron la expresión de la proteína Muc1 durante el desarrollo embrionario del ratón y hallaron expresión de la misma en estómago, páncreas, pulmón, tráquea, riñón y glándulas salivales. Tales resultados son acordes a los hallados en este estudio. Sin embargo, en contraste con nuestros resultados, Braga y col. no hallaron reacción en intestino delgado e hígado de ratón. En nuestro estudio, también se detectó expresión en el esófago, pero este órgano no estaba incluido en el trabajo realizado en el desarrollo embrionario del ratón.

A fin de caracterizar a la Muc1 de rata mediante dot blot y WB, se analizaron homogenados de diferentes órganos en distintos estadios de desarrollo, que habían mostrado reacción positiva mediante IHQ. En tal estudio se empleó un anticuerpo dirigido contra la MUC1/Y humana, con el fin de comprobar, por un lado, la reactividad del anticuerpo en rata, y por otra parte, detectar posibles isoformas de la Muc1 en rata.

En el ensayo de dot blot, del mismo modo que en la IHQ, se evidenció una intensa reacción en la mayor parte de las muestras analizadas. Estos resultados nos permitieron comprobar la reactividad del anticuerpo en rata. Mientras que los tejidos analizados mediante WB mostraron ciertas diferencias.

En la mayor parte de los tejidos analizados se identificó una banda mayor a 100 KDa. Considerando que el anticuerpo empleado reconoce la región N-terminal extracelular de la MUC1, resulta altamente probable que el fragmento hallado corresponda a la subunidad α de la Muc1 de rata, que contiene al dominio extracelular. Se sabe que la Muc1 de rata está compuesta por 655 aminoácidos [Strausberg et al., 2002], de los cuales 69-72 y 28-31 corresponden a los dominios citoplásmico y transmembrana respectivamente, que están altamente conservados entre las especies de mamíferos y que constituyen, junto a una corta porción extracelular, la subunidad menor β [Spicer et al., 1995]. Estos datos nos permiten deducir que la subunidad α , estaría constituida por alrededor de 500 aminoácidos, que tendrían un peso molecular promedio de 55 KDa. Asimismo, sabemos que se trata de la porción altamente glicosilada de la Muc1, lo cual, le permite alcanzar un peso mayor, dependiendo del grado de glicosilación de la misma. Es menester mencionar y recordar, que el núcleo proteico de la subunidad mayor de la

MUC1 humana presenta un tamaño de 120-300 KDa; mientras que la proteína madura, luego de la glicosilación, puede duplicar su tamaño [Gendler et al., 2001].

Por otra parte, en páncreas de 18G, en riñón y pulmón de 19G y adulto, se detectó una banda adicional de 25KDa aproximadamente. Considerando que el anticuerpo está dirigido contra la isoforma MUC1/Y humana, cuyo peso es de 22 KDa, se podría sugerir, que la banda detectada corresponde a una isoforma de la Muc1 de rata análoga a MUC1/Y. Recordamos que la MUC1/Y humana constituye una variante asociada a membrana, producto del *splicing* alternativo, que carece de dominios TR y que contiene un módulo SEA truncado [Rubinstein et al., 2009]. Este es un resultado extremadamente interesante, teniendo en cuenta la ausencia de información sobre posibles productos de *splicing* alternativo de la Muc1 de rata. Ahora bien, sería necesario ampliar los estudios en vista de poder aislar y secuenciar esta proteína para confirmar estas hipótesis.

Adicionalmente, se halló una banda menor a 100 KDa, en el páncreas de 18G, que podría corresponder a un producto de distinto peso molecular de diferente alelo de la subunidad α de la Muc1 de rata.

Por otra parte, se analizó la expresión de Muc1 en distintos tejidos embrionarios y fetales a nivel del ARNm. Los resultados hallados permitieron validar los resultados obtenidos a nivel proteico, mediante IHQ, dot blot y WB.

1.2. Muc2.

Para el análisis de la expresión de Muc2 en embriones, fetos y neonatos de rata se utilizó el anticuerpo H300, dirigido contra la MUC2 humana. Mediante IHQ, se detectó expresión de Muc2 en los epitelios intestinales y gástrico de la rata adulta. En tanto que las muestras embrionarias y fetales mostraron expresión de la mucina a partir de los

19G. La reacción se restringió a las células caliciformes ubicadas en el epitelio de revestimiento de las vellosidades y las criptas de Lieberkühn en formación.

Hacia los 20G también se visualizó reacción en la secreción contenida en el lumen intestinal y en algunas células columnares. Diversos autores han demostrado una elevada expresión de ARNm MUC2 en el intestino primitivo de embriones humanos de 12 semanas de gestación [Chambers et al., 1994], lo cual, es equivalente a un estadio mayor a 18G en la rata, según *The Carnegie Institution* [Witschi, 1962; O'Rahilly y Müller, 1987; Hill, 2010]. Estos autores hallaron una reacción restringida principalmente a células individuales, posiblemente caliciformes, distribuidas en el epitelio intestinal que recubre las vellosidades y las criptas de Lieberkühn en formación. En contraste, Buisine y col. (1998) detectaron expresión de MUC2 más tempranamente, en embriones de 9 semanas de desarrollo. Resulta interesante destacar que, en nuestro estudio, el inicio de la expresión de Muc2 coincidió con la detección de las células caliciformes en el epitelio intestinal y con el inicio de la formación de las criptas de Lieberkühn. Nuestros hallazgos son concordantes con lo que describió Hill (1991), quien estudió la morfogénesis del colon de la rata y observó también las primeras células caliciformes a los 19G junto con el inicio de la conformación de las criptas y la secreción de moco a partir de los 20G.

Todos estos datos, nos permiten sugerir, un posible rol de la mucina 2 en la diferenciación de este tipo celular y en la morfogénesis de la mucosa intestinal. Estudios realizados en ratones demostraron que en ausencia de Muc2 (ratones *Muc2*^{-/-}), las criptas intestinales mostraban morfologías aberrantes y los procesos de maduración y migración celular resultaban alterados [Velcich et al., 2002]. La interacción de Muc2 con mucinas asociadas a membrana [Hollingsworth y Swanson, 2004], tales como Muc1,

podría indicar su participación en los procesos de señalización que conducen a la diferenciación y proliferación del epitelio intestinal.

Por otra parte, se ha reportado la expresión de MUC2 en otros órganos, tales como pulmón, tráquea y estómago humanos [Buisine et al., 1999; 2000; Rose y Voynow, 2006].

En nuestro estudio, las muestras de tráquea y pulmón analizadas fueron negativas, pero sí se halló expresión de Muc2 en estómago adulto y en neonatos a partir de los 3 días posteriores al nacimiento. Las muestras de estómago embrionario y fetal fueron negativas.

De acuerdo a lo expuesto, podemos sugerir que la Muc2 en estómago, podría tener un rol protector de la mucosa gástrica frente a la acidez del jugo gástrico, el daño mecánico y la exposición a los agentes patógenos (microorganismos, toxinas) que aparecen en el neonato al momento del inicio de la ingesta de alimento. Estudios adicionales serían necesarios para confirmar esta hipótesis.

A fin de validar los resultados obtenidos mediante IHQ, se llevaron a cabo las técnicas de WB y RT-PCR. En concordancia con lo esperado, en el análisis de homogenados de intestino delgado y grueso mediante WB, se detectó una banda de 200 KDa a partir de los 19G. Sin embargo, en el estudio realizado en muestras de ADNc de intestino delgado/grueso y estómago, de 16G-20G y adultos, se observó expresión positiva en todos los casos analizados. Estos resultados estarían indicando que la expresión del ARNm en el desarrollo es más temprana que la detección de la proteína correspondiente. En concordancia con estos datos, Buisine y col. (2000) hallaron expresión de ARNm MUC2 en fetos humanos. Sin embargo, los primeros indicios de reacción aparecieron a las 26 semanas de gestación, lo cual representa un estadio de desarrollo avanzado, en el que las glándulas mucosas ya están completamente

diferenciadas. Este hecho condujo a los autores a la conclusión de que MUC2 no presenta un papel importante en la morfogénesis del epitelio gástrico ni en la diferenciación celular normal.

Todos estos datos, nos permiten sugerir, a modo especulativo, que existe un mecanismo de regulación de la expresión génica que actúa postranscripcionalmente, lo cual explicaría la detección de ARNm Muc2 previa a la expresión proteica. No debe descartarse tampoco que la discrepancia entre el momento en que pueden detectarse el ARNm y la proteína, obedezcan a diferencias en la sensibilidad de detección de reacción de las metodologías empleadas.

1.3. Muc5ac.

Es sabido que la mucina MUC5AC es la principal mucina secretada por las células mucosas del estómago y las células caliciformes que se hallan en el pulmón y en el ojo [Lesuffleur et al., 1995; Buisine et al., 1998].

Los resultados hallados en este estudio, mediante el empleo de IHQ, mostraron expresión de Muc5ac en el epitelio gástrico y las células caliciformes de pulmón y tráquea, como así también en las glándulas sebáceas de la piel de la rata adulta. Según nuestro conocimiento, hasta el momento son pocos los datos concernientes a la expresión de Muc5ac en piel en condiciones no patológicas. Varios estudios han demostrado que la piel normal exhibe una expresión bastante restringida de mucinas [Chakraborty et al., 2011]. Incluso, la mayor parte de los autores coinciden en la ausencia de expresión de MUC1 y MUC5AC en el epitelio escamoso de la epidermis adulta normal [Kuan et al., 2001; Yoshii et al., 2002]. Sin embargo, en concordancia con nuestros resultados, Smith y col. (2008) detectaron una leve expresión de MUC5AC en algunas

glándulas sebáceas de la piel adulta normal. Por otra parte, se ha demostrado la expresión de MUC5AC en las células de Paget características de la enfermedad de Paget extramamaria, un tipo de carcinoma epidérmico raro que aparece generalmente en la región anogenital [Yoshii et al., 2002; Smith et al., 2008].

En cuanto a la expresión de la mucina en las muestras embrionarias, fetales y neonatales, se registró una leve reacción en algunas células de la mucosa gástrica a partir de los 17G y un incremento en la intensidad de reacción hacia los 18G. Resulta interesante destacar que entre los 17-18G de la rata comienzan a visualizarse las glándulas en formación en la mucosa gástrica, aunque la diferenciación de las células epiteliales no ocurre antes de los 19-20G [Familiari et al., 1998]. Estos datos estarían indicando que la expresión de Muc5ac coincide con la morfogénesis glandular y aparece previamente a la citodiferenciación, lo cual, sugiere que podría tener un papel importante en la proliferación y diferenciación del epitelio gástrico. Estudios realizados en embriones y fetos, humanos y de ratón, demostraron que la MUC5AC/Muc5ac se expresa tempranamente en el desarrollo (8 semanas en humanos, 18.5 días en el ratón) [Buisine et al., 2000; 2008; Jonckheere et al., 2012]. En conformidad con nuestras suposiciones, Jonckheere y col. (2012) determinaron que el patrón de expresión de la Muc5ac en el ratón, estaría correlacionado con ciertos factores de transcripción (GATA-6 y HNF4 α) involucrados en la diferenciación gastrointestinal.

En la embriogénesis del pulmón de ratón se han descrito 4 etapas cronológicas: 1) pseudoglandular, en la que se desarrolla el árbol bronquial y respiratorio (9.5 - 16.5G), 2) canalicular, en la que se originan los sacos terminales (16.5 - 17.5G), 3) de sacos terminales, etapa en la que se incrementa el número de sacos terminales y se diferencian las células tipo I y II (17.5G - 5DP), y 4) alveolar, posterior al nacimiento, en la cual se

forman los conductos alveolares y los alvéolos maduros (5 - 30DP) [Warburton et al., 2000]. Nuestros resultados muestran una leve expresión de Muc5ac en el epitelio que reviste los ductos pulmonares a partir de los 14G de la rata, lo cual es coincidente con la etapa de proliferación y ramificación del árbol bronquial. En contraste, en un reciente trabajo, Roy y col. (2011) estudiaron la producción de mucinas durante el desarrollo prenatal y postnatal del pulmón de ratón y no hallaron expresión de la proteína Muc5ac antes de los 14DP. Sin embargo, en el análisis a nivel del ARNm detectaron una expresión temprana, a partir de los 14.5G.

Asimismo, estudios realizados en embriones y fetos humanos mostraron expresión de ARNm MUC5AC en los bronquios segmentarios a partir de las 13 semanas de gestación [Buisine et al., 1999].

Todos estos datos sugieren un probable rol de la mucina en la proliferación, ramificación y morfogénesis del árbol bronquial.

Por otra parte, las muestras de tráquea fetales analizadas fueron negativas. Se detectó una leve reacción en el epitelio y en las glándulas traqueales a partir de los 7DP. En contraposición, Buisine y col. (1999) hallaron una leve expresión de ARNm MUC5AC en fetos humanos, aunque en una etapa muy avanzada del desarrollo, hacia las 23 semanas de gestación.

En cuanto a la expresión de la glicoproteína en las muestras de piel, se registró tempranamente, a partir de los 13G, una leve reacción en la epidermis embrionaria. Asimismo, las muestras de piel de neonatos de 2 - 6DP mostraron una elevada intensidad de reacción en los distintos estratos que constituyen la epidermis, y además se detectó Muc5ac en las células que integran las glándulas sebáceas. Cabe recordar que estas estructuras se originan como prominencias asociadas a los folículos pilosos en

Discusión

formación y aparecen durante la primera semana de vida en ratas y ratones [Fluhr et al., 2004]. Finalmente, hacia los 7DP, el patrón de expresión coincide con el de la rata adulta, la epidermis resulta negativa y la reacción queda restringida a las glándulas de sebo. Resulta necesario destacar que la pérdida de la expresión de la mucina en la epidermis coincide con la aparición de los primeros pelos. Una posible explicación podría ser que la Muc5ac cumpla una función de protección frente al líquido amniótico en el embrión y en el feto, y que dicha función sea asumida por el recubrimiento piloso que aparece en la primera semana de vida del neonato. Es interesante mencionar que hasta el momento, no se han registrado datos concernientes a la expresión de la mucina Muc5ac en la epidermis embrionaria.

Los resultados hallados mediante WB permitieron validar los datos provenientes del análisis IHQ. En todos los casos que resultaron positivos, se detectó una banda de 200 KDa aproximadamente, coincidente con la hallada por Lacunza y col. (2009) en diferentes especies de mamíferos.

Por otra parte, el empleo de la metodología RT-PCR mostró expresión del ARNm Muc5ac en todas las muestras de ADNc de estómago, de pulmón y de piel analizadas. Sorprendentemente, se detectó expresión del ARNm Muc5ac en muestras ADNc de estómago de 16G, lo cual es previo a la detección de la proteína mediante IHQ y WB.

Esta discrepancia en los resultados obtenidos, podría estar indicando la presencia de algún mecanismo de regulación de la expresión postranscripcional, o bien, podría deberse a las diferencias en la sensibilidad de las metodologías empleadas en este estudio.

1.4. Antígenos carbohidratos.

Los complejos mecanismos de reconocimiento, adhesión y comunicación celular son llevados a cabo por medio de moléculas asociadas a la superficie de la célula, entre las cuales se encuentran las glicoproteínas.

Como se comentó anteriormente, muchas glicoproteínas presentan en sus ejes proteicos cadenas de carbohidratos unidas mediante O-glicosilación. Este proceso constituye un mecanismo de modificación proteica altamente conservado, hallado en mamíferos, peces, equinodermos, insectos, gusanos, protozoos y ciertos hongos [Hagen et al., 1999; Schwientek et al., 2002; Ten Hagen et al., 2003, Tran y Ten Hagen, 2013]. La O-glicosilación ocurre en el complejo de Golgi y se caracteriza, por lo general, por la adición inicial de un azúcar GalNAc a un residuo de serina o treonina mediante glicosiltransferasas (GTs) específicas. Diversos estudios han determinado que muchas de las GTs se encuentran expresadas de un modo espacial y temporal específico durante el desarrollo de mamíferos, lo cual, sugiere que las GTs podrían tener importantes funciones a lo largo de la embriogénesis [Kingsley et al., 2001; Tian y Ten Hagen, 2006; Tran y Ten Hagen, 2013]. En el presente trabajo, se analizó mediante IHQ, la expresión y localización de los antígenos carbohidratos Tn y TF en diferentes tejidos epiteliales de rata adulta y de distintos estadios gestacionales.

Normalmente, la adición inicial del monosacárido GalNAc a residuos de serina o treonina del péptido en crecimiento, genera el antígeno Tn, en tanto que, la subsiguiente unión de Gal al C-3 de GalNAc da origen al disacárido TF (también denominado T o *core1*).

En cuanto al antígeno Tn en los tejidos adultos, se detectó una reacción restringida a los órganos del tubo digestivo, estómago, intestino delgado y grueso, a las glándulas

salivales y al riñón.

Las muestras embrionarias y fetales analizadas mostraron expresión de Tn en el epitelio intestinal, en los túbulos renales, en los acinos en formación de las glándulas salivales, en glándulas gástricas y en epidermis. Estudios realizados en ratón demostraron que la ausencia de determinadas GTs involucradas en la síntesis de Tn produce alteraciones en la morfogénesis de las glándulas salivales [Tenno et al., 2007]. Aparentemente la pérdida de tales GTs produce una disminución de ciertos componentes de la matriz extracelular que intervienen en procesos de señalización involucrados en la proliferación celular y en la organogénesis [Tian et al., 2012; Tran y Ten Hagen, 2013].

Por otra parte, el disacárido TF mostró expresión en estómago, intestino delgado, glándulas salivales, riñón y piel de rata adulta. Asimismo, en las muestras embrionarias y fetales analizadas, se halló reacción en los epitelios esofágico y gástrico, en el epitelio de revestimiento y en las glándulas intestinales, en los conductos excretores y acinos en formación de las glándulas salivales, en los túbulos proximales y corpúsculos renales del riñón y en los estratos más superficiales de la epidermis. Alexander y col. (2006) estudiaron ratones deficientes en el antígeno TF y comprobaron que a los 200 días de vida los animales morían a causa de una insuficiencia renal. Los riñones de tales ratones presentaban glomérulos y túbulos proximales distorsionados. Estos autores sugieren que la ausencia del antígeno TF genera una glicosilación aberrante en ciertas glicoproteínas normales presentes en las prolongaciones de los podocitos renales, lo cual, sería causante del mal funcionamiento del riñón.

Adicionalmente, estudios recientes realizados en *Drosophila* demostraron una elevada expresión de O-glicanos en la superficie apical y luminal de las células que recubren los intestinos anterior y posterior, las glándulas salivales, los túbulos de Malpighi

(equivalentes funcionales al riñón de vertebrados) y el sistema traqueal [Tian y Ten Hagen, 2006]. Estas observaciones indicarían un probable rol de los O-glicanos en la formación de los órganos tubulares en *Drosophila*.

Los resultados obtenidos en este análisis estarían demostrando que los carbohidratos Tn y TF se hallan ampliamente expresados en los epitelios normales de la rata, especialmente aquellos expuestos a condiciones locales variables, a toxinas y microorganismos, como son los órganos del tubo digestivo, del sistema urinario y de la piel.

Tomados en conjunto, todos estos datos nos permiten sugerir un posible rol de los epitopes Tn y TF en los eventos moleculares que regulan la formación de órganos tubulares en la rata. Esto es probablemente, influyendo en las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular necesarias para el desarrollo y el funcionamiento adecuados de los órganos tubulares. Sin embargo, serían necesarios estudios complementarios para determinar el rol potencial de estos carbohidratos en la morfogénesis de tales órganos.

Como se dijo previamente, la mayoría de los carbohidratos de la periferia de los glicanos son residuos de fucosa, sulfatos y ácido siálico. Un ejemplo de glicoconjugados fucosilados es el grupo de los antígenos sanguíneos Lewis. En el presente estudio, analizamos mediante IHQ, la expresión y localización de los antígenos Le^x y sLe^x en diferentes tejidos epiteliales de la rata adulta y de distintos estadios de desarrollo.

Le^x mostró expresión principalmente en el tubo digestivo de la rata adulta: en estómago, y en intestino delgado y grueso. También se halló una intensa reacción en riñón. Asimismo, en el análisis de las muestras embrionarias y fetales, se identificó Le^x en la mucosa gástrica, en el epitelio intestinal, en los túbulos renales y en la epidermis.

En resumen, podemos afirmar que Le x también es un antígeno ampliamente expresado en los epitelios normales de la rata, especialmente en los órganos del tubo digestivo y del sistema urinario. Por otra parte, la expresión relativamente temprana en el desarrollo de estos órganos, a partir de los 17G, podría estar indicando que el antígeno Le x también posee alguna función vinculada a los mecanismos de adhesión celular necesarios para el desarrollo y mantenimiento de la integridad de los epitelios de los órganos tubulares en formación.

El epitope sLe x ha sido ampliamente caracterizado como un antígeno asociado a cáncer. Diversos autores confirmaron que sLe x se sobre-expresa en carcinomas gástrico, colónico, mamario y renal, aunque también se halló expresión en algunas muestras normales de mama, riñón, colon y cavidad oral [Brockhausem et al., 2003; Croce et al., 2007]. En el presente trabajo, mediante el empleo del anticuerpo monoclonal KM93, no se detectó expresión de sLe x en ninguna de las muestras analizadas, lo cual estaría indicando que este antígeno no presenta una función importante en el desarrollo y el mantenimiento de los epitelios de la rata en condiciones normales.

En conclusión, los resultados hallados en este estudio nos permiten sugerir que los carbohidratos Tn, TF y Le x presentarían roles esenciales en el desarrollo embrionario, en la morfogénesis y en la homeostasis de varios tejidos epiteliales.

1.5. Rhbdd2.

La proteína RHBDD2/Rhbdd2 constituye un miembro de la familia de serín-proteasas intramembrana que reciben el nombre de Romboides y que se encuentran altamente conservadas entre las especies. Particularmente, RHBDD2/Rhbdd2 pertenece a un subgrupo de proteasas que se hallan alejadas evolutivamente entre ellas mismas y con

respecto a las demás proteínas Romboide.

Diversos autores han determinado que varias de tales proteínas, como por ejemplo, Rhomboide-1 en *Drosophila*, intervienen en la vía de señalización EGFR que regula numerosos aspectos de la embriogénesis, por lo que estarían jugando un importante rol en el desarrollo normal del organismo. Sin embargo, son pocos los datos concernientes a la expresión de proteínas Romboides en el desarrollo de mamíferos. En un trabajo reciente, Adrain y col. (2011) analizaron la expresión de la proteína RHBDL2 en líneas celulares humanas y determinaron su participación en la vía de señalización EGFR. Estos autores sugieren que RHBDL2 funciona de manera similar a Rhomboide-1 en *Drosophila*, provocando la escisión y la subsiguiente liberación del ligando EGF al medio extracelular, el cual en consecuencia, activa al receptor EGFR. En otro estudio, Zou y col. (2009) determinaron que RHBDF1 interviene en la transactivación de EGFR mediada por receptores acoplados a proteína G (GPCRs), probablemente facilitando la liberación del ligando TGF α , el cual también activa la vía de señalización EGFR. Sin embargo, el rol preciso de RHBDF1 aún no ha sido establecido.

Todos estos datos sugieren que las proteínas Romboides podrían resultar importantes en el desarrollo normal de los mamíferos.

En el presente estudio, se analizó mediante IHQ la expresión y localización de la proteína Rhbdd2 en diferentes tejidos epiteliales de rata adulta y de distintos estadios gestacionales. Todos los tejidos adultos estudiados, con excepción del esófago y la tráquea, mostraron reacción positiva. Resulta interesante resaltar que algunas de las células de los epitelios gástrico e intestinal como también algunos hepatocitos mostraron reacción en el núcleo. Tales observaciones podrían ser producto de un artefacto de la técnica empleada, o bien, podrían estar indicando un posible rol de Rhbdd2 en algún

proceso nuclear tal como la transcripción génica. Estudios complementarios serían necesarios para confirmar dicha hipótesis.

En estudios realizados previamente, Lacunza y col. (2012) analizaron la expresión de RHBDD2 en muestras humanas de colon normales, benignas y carcinomas, y detectaron una intensa reacción que abarcó todo el citoplasma en las células cancerosas, mientras que en las muestras normales y benignas, la reacción fue menos intensa y restringida a la región perinuclear.

En cuanto a la expresión de la proteína en las muestras embrionarias y fetales, se registró reacción en los cordones hepáticos en formación, en los túbulos renales, en los ductos del pulmón embrionario y en las células epidérmicas a partir de los 16G. Es menester recordar que en este estadio de gestación de la rata, se determinó también el inicio de la expresión de Muc1 en los hepatoblastos y que los mismos se encuentran en una etapa de migración activa. El riñón metanéfrico se halla casi totalmente diferenciado y encapsulado, con la organización interna del riñón adulto y en el pulmón embrionario comienzan a diferenciarse los sacos pulmonares. Por otra parte, hacia los 16G, se inicia un período de rápida proliferación celular en la epidermis embrionaria.

Considerando que la epidermis adulta no mostró expresión de la proteína, podríamos sugerir un posible rol de Rhbdd2 en la rápida proliferación que sufren las células epidérmicas hacia el final del desarrollo. Asimismo, Abba y col. (2009) realizaron un ensayo de silenciamiento *in vitro* con *siRNA* de la expresión de RHBDD2 en la línea celular de cáncer de mama MCF7 y detectaron un descenso significativo en la proliferación celular en comparación con los controles correspondientes. Estas evidencias permitieron a los autores determinar que la proteína RHBDD2 podría estar involucrada en la regulación de la proliferación en las células tumorales. Toda esta

información podría estar indicando que RHBDD2 presenta un rol importante en las células que se hallan en activa y rápida proliferación, como sucede con frecuencia en las células tumorales y embrionarias.

Por otro lado, se detectó expresión de Rhbdd2 en los epitelios gástrico e intestinal a partir de los 18G. La reacción quedó restringida a las células mucosas que recubren las glándulas gástricas e intestinales en formación. Como se mencionó previamente, el inicio de la morfogénesis glandular en la rata, ocurre entre los 17-18G en estómago y entre los 18-19G en intestino delgado y grueso. Estos datos estarían demostrando que la expresión de la proteína Rhbdd2 coincide con el comienzo de la formación de las glándulas gástricas e intestinales, lo cual sugiere que podría tener un papel en la proliferación y morfogénesis glandular.

Por otra parte, los acinos pancreáticos mostraron una moderada reacción a partir de los 19G. Como se comentó anteriormente, la diferenciación de los acinos serosos en el páncreas ocurre entre los 17-18G, lo cual indica que la expresión de Rhbdd2 es posterior a dicho evento.

Los resultados hallados mediante WB permitieron validar los resultados obtenidos mediante IHQ y verificar que el anticuerpo empleado reconoce a Rhbdd2 de rata y por ende no estaría reaccionando con otro epitope.

En un trabajo reciente, Ahmedli y col. (2013), estudiaron la expresión de Rhbdd2 en la retina de ratones adultos y de distintos tiempos de desarrollo pre y postnatal, y determinaron que los niveles de expresión de la proteína varían dependiendo de la edad. Estos autores sugieren que Rhbdd2 juega un papel importante en el desarrollo y en el funcionamiento normal de la retina. Incluso, sostienen que una mutación en Rhbdd2 podría conducir al desarrollo de ciertas patologías tales como la retinitis

pigmentaria. Sin embargo, aún no se ha establecido con certeza la función de Rhbdd2 en mamíferos ni su papel en las vías moleculares de señalización. Estudios adicionales serían necesarios para determinar el rol potencial de RHBDD2/Rhbdd2 en células y tejidos normales de mamíferos.

2. Análisis de la expresión de las mucinas Muc1, Muc2 y Muc5ac en el desarrollo postnatal normal de la glándula mamaria y de tumores asociados a la misma.

La mayor parte del desarrollo de la glándula mamaria se produce luego del nacimiento, alcanzando su plena diferenciación únicamente en presencia de los estímulos hormonales que se producen en la preñez y en la lactancia, cuando la glándula adquiere funcionalidad [Russo y Russo, 1987].

Por otra parte, los modelos de roedores han sido particularmente útiles en el estudio del cáncer de mama, debido a que suelen desarrollar neoplasias mamarias espontáneas en los estudios a largo plazo. La formación de tumores, que aumenta con la edad del animal, ha sido atribuida a los desequilibrios hormonales, tales como el celo constante que se produce en las ratas viejas.

En el presente trabajo se estudiaron las variaciones en la expresión de las mucinas Muc1, Muc2 y Muc5ac en el desarrollo postnatal normal de la glándula mamaria de rata y en comparación con neoplasias espontáneas asociadas a la misma, con el empleo de las técnicas IHQ y RT-PCR.

2.1. Muc1.

Como mencionáramos previamente, la MUC1 fue clonada inicialmente a partir de líneas celulares de cáncer de mama [Gendler et al., 1987]. En efecto, más del 90% de los

carcinomas mamarios humanos sobre-expresan MUC1. Sin embargo, diversos estudios han demostrado que la mucina también se expresa en las enfermedades benignas mamarias y en el epitelio mamario humano normal [Kufe et al., 1984; Croce et al., 2003; Demichelis et al., 2010].

Por otra parte, el estudio del desarrollo de la glándula mamaria humana ha puesto de manifiesto que la mama de mujeres nulíparas post-puberales se halla compuesta por estructuras lobulares que reflejan distintos estadios de desarrollo. Los lóbulos tipo 1 son los más indiferenciados y se componen de 6 - 11 conductillos, mientras que los lóbulos tipo 2 evolucionan a partir de los anteriores y tienen una morfología más compleja, con un mayor número de conductillos. Durante el embarazo, los lóbulos tipo 1 y 2 progresan a lóbulos tipo 3 que se caracterizan por tener un promedio de 80 conductillos, en tanto que los lóbulos tipo 4 sólo están presentes durante la lactancia, involucionando a lóbulos tipo 3 en la etapa post-lactante. Las estructuras tipo 1 son las más frecuentes en las mujeres nulíparas mientras que, en las mujeres multíparas pre-menopáusicas predominan las estructuras tipo 3.

En este sentido, resulta interesante mencionar que la estructura lobular de tipo 1 ha sido identificada como el sitio de origen de uno de los tumores malignos más frecuentes en las mujeres, el carcinoma ductal *in situ* [Russo et al., 2005].

Debido a lo expuesto, en el presente estudio, se procedió al análisis de la expresión de Muc1 en distintas etapas del desarrollo postnatal normal de la glándula mamaria de rata y en tumores espontáneos asociados a la misma.

Mediante IHQ, se observó expresión de Muc1 en la glándula mamaria en lactancia, en involución post-lactancia y en involución senil. Los estadios de desarrollo previos a la lactancia fueron negativos. En concordancia con estos resultados, estudios realizados

previamente con el empleo del Ac CT33 también mostraron reacción negativa en mama adulta normal no lactante de rata y otras especies de mamíferos analizadas [Lacunza et al., 2009].

En tanto que, con el empleo de la metodología RT-PCR se detectó expresión del ARNm Muc1 en todas las etapas del desarrollo postnatal analizadas. Estas discrepancias en los resultados, podrían corresponderse a las diferencias en la sensibilidad de las distintas metodologías empleadas. Aunque también podrían estar indicando una expresión del ARNm previa a la proteína.

De acuerdo a todo lo expuesto, podríamos concluir que la mucina Muc1 se expresa, o alcanza su mayor nivel de expresión, en la etapa de lactancia, la cual, justamente corresponde, como comentáramos anteriormente, al estadio en el que la glándula alcanza su máxima diferenciación. Estas observaciones nos conducen nuevamente a la hipótesis de que Muc1 presentaría un importante rol en la diferenciación glandular.

En cuanto a los estadios de involución post-lactancia y senil, la expresión de Muc1 es menos intensa y el porcentaje de reacción observado es menor que en la etapa de lactancia. Como ya se comentó, estos estadios se caracterizan por presentar una gran eliminación de tejido secretor generado por un proceso de apoptosis masiva.

En este sentido, Schroeder y col. (2004) desarrollaron ratones transgénicos que sobre-expresan MUC1 humana en la glándula mamaria. Estos autores observaron que la prolongada expresión de MUC1 inhibe la involución post-lactancia, probablemente mediante la inhibición de la apoptosis celular. Este hecho podría estar indicando que la normal involución de la glándula requiere una disminución en el nivel de expresión de la mucina.

Por otra parte, el análisis IHQ, también mostró una intensa reacción en las muestras tumorales malignas. En tanto que las muestras tumorales benignas incluidas en este estudio, fueron negativas.

En cuanto al análisis de expresión del ARNm mediante RT-PCR se detectó amplificado de Muc1 en todas las muestras neoplásicas analizadas, benignas y carcinomas.

También en este caso, las discrepancias en los resultados probablemente se correspondan con las diferencias en la sensibilidad de las distintas metodologías empleadas, o bien, con una expresión del ARNm previa a la proteína correspondiente.

Como ya hemos mencionado, varios autores han demostrado la expresión de MUC1 en lesiones benignas y carcinomas mamarios humanos y de ratón, con patrones de reacción variables. Generalmente, las neoplasias malignas pierden el patrón apical de expresión, mostrando una reacción citoplásmica, tal como se visualizó en nuestros resultados [Schroeder et al., 2004; Croce et al., 2003; Demichelis et a., 2010].

2.2. *Muc2*.

Varios estudios han demostrado la expresión de MUC2 en algunos tipos de carcinomas mamarios [Walsh et al., 1993; Hanski et al., 1997; Rahka et al., 2005]. Sin embargo, la información acerca de la expresión de MUC2 en glándula mamaria normal y en lesiones benignas, resulta muy escasa.

En el presente trabajo, se analizó la expresión de Muc2 en los distintos estadios de desarrollo de la glándula mamaria y en neoplasias mamarias de la rata.

Mediante IHQ, no se hallaron resultados positivos en ninguna de las muestras analizadas. En tanto que el análisis del ARNm mediante RT-PCR mostró una expresión muy leve en todas las etapas del desarrollo de la glándula analizadas. Asimismo, las

muestras tumorales benignas y malignas también resultaron positivas pero con un nivel de expresión relativamente bajo.

Las diferencias en los resultados obtenidos con ambas metodologías, podrían ser causa de las distintas sensibilidades de detección que presentan. Probablemente el nivel de expresión de la proteína Muc2 no resulte suficiente para ser detectado por la técnica empleada. Incluso, el análisis a nivel del ARNm muestra un nivel de expresión bajo. Tampoco puede descartarse la presencia de un mecanismo de regulación postranscripcional.

En resumen, Muc2 no parece presentar un papel importante en el desarrollo ni en el funcionamiento normal o patológico de la glándula mamaria.

2.3. Muc5ac.

La MUC5AC/Muc5ac ha sido ampliamente vinculada a la función de protección de la mucosa epitelial gástrica. Sin embargo, son muy pocos los estudios que muestran su expresión en la glándula mamaria normal y en lesiones neoplásicas asociadas. Por tal motivo, se procedió al análisis de la expresión de Muc5ac en distintas etapas del desarrollo postnatal normal de la glándula mamaria de rata y en tumores espontáneos asociados a la misma.

En el análisis IHQ, se halló expresión de Muc5ac en todas las etapas analizadas, con excepción del período lactante. En todas las muestras positivas se visualizó un patrón de reacción mixto apical, con una intensidad que varió de leve a moderada. Asimismo, mediante RT-PCR se visualizó una intensa expresión de Muc5ac en casi todas las etapas analizadas, excepto durante la lactancia, en la cual, no se detectó amplificado. Mientras

que en el período de involución post-lactancia, el nivel de expresión fue bajo en comparación con las restantes etapas.

Como se explicó anteriormente, la mayor diferenciación de las estructuras lobulares secretoras es alcanzada en el período de lactancia; mientras que, en las etapas previas, la glándula se encuentra sometida a sucesivos episodios de proliferación y ramificación que conducen a la formación del árbol epitelial completo. Teniendo en cuenta estos datos, es probable, que la Muc5ac presente un papel importante en la morfogénesis glandular previa a la diferenciación de las estructuras secretoras. Este hecho coincidiría con lo observado en el pulmón embrionario, en el cual, se identificó a la Muc5ac en el momento en que se inicia la proliferación y ramificación del árbol bronquial respiratorio. Por otra parte, el análisis IHQ de las muestras tumorales incluidas en este estudio, no mostró expresión de Muc5ac. Sin embargo, mediante RT-PCR se detectó una elevada expresión tanto en neoplasias benignas como en los carcinomas. Estas diferencias en los resultados podrían ser debidas a las distintas metodologías empleadas. O bien, a la existencia de un mecanismo de regulación postranscripcional. Estudios realizados previamente han demostrado la expresión de Muc5ac en varios tipos de cáncer mamario, aunque la proporción de muestras positivas suele ser baja en comparación con el porcentaje de carcinomas que expresan MUC1/ Muc1 [Pereira et al., 2001; Rahka et al., 2005; Do et al., 2013]. Estudios complementarios serían necesarios para comprender la función de la MUC5AC/Muc5ac en los diferentes tipos de lesiones mamarias y para evaluar su relevancia en el pronóstico del cáncer de mama.

3. Análisis mediante mapas de calor y agrupamientos jerárquicos, análisis factorial y resumen.

Finalmente, se procedió al análisis de la expresión de todos los antígenos estudiados con el fin de generar agrupamientos basados en perfiles similares y evaluar las posibles asociaciones entre los mismos. Para ello, se emplearon dos metodologías distintas: se efectuó un análisis mediante mapas de calor y agrupamientos jerárquicos, y luego se realizó un análisis factorial con componentes principales.

Ambos análisis mostraron una estrecha asociación entre Muc1 y Rhbdd2, lo cual, podría estar indicando que las funciones de ambas proteínas están, por lo menos, emparentadas. Por otro lado, se observó una clara asociación entre los carbohidratos Le x y Tn, con un elevado coeficiente de correlación ($r=0,645$). Los mismos mostraron un perfil de expresión más cercano a Muc2 que al resto de los antígenos. Estos datos sugieren que Muc2 podría ser un transportador de ambos carbohidratos.

Asimismo, el análisis de la matriz de correlaciones nos indica que Le x puede ser transportado también por Muc1 ($r=0,262$). En tanto que el disacárido TF estaría más estrechamente asociado a Muc5ac ($r=0,266$). Esto último también puede verificarse en el análisis mediante mapas de calor.

CONCLUSIONES

Del análisis de los resultados obtenidos en el presente estudio se puede concluir:

- Las mucinas analizadas en este estudio podrían desempeñar un papel relevante en la diferenciación y proliferación celular durante el desarrollo prenatal de los epitelios en la rata: Muc1 en esófago, estómago, intestino, páncreas, hígado, glándulas salivales, tráquea, pulmón y riñón, Muc2 en la mucosa intestinal y Muc5ac en el epitelio gástrico, pulmón y epidermis.
- Los epitopes carbohidratos asociados a mucinas aquí considerados Tn, TF y Lex tendrían un rol en los eventos moleculares que regulan la formación de los órganos tubulares en el embrión de rata. Por otra parte, la falta de expresión de sLex indicaría que este epitope no presenta una función importante en el desarrollo normal y mantenimiento de estos tejidos en condiciones normales.
- Los resultados hallados en el estudio de la expresión de Rhbdd2 en tejidos embrionarios y fetales sugieren una posible función de la proteína en las células que se hallan en activa y rápida proliferación, como así también en los procesos de morfogénesis glandular.
- El estudio en el desarrollo postnatal de la expresión de mucinas en la glándula mamaria demostró que Muc1 alcanza su máxima expresión durante la lactancia lo cual nos permite confirmar la hipótesis de que Muc1 desempeñaría un importante rol en la diferenciación glandular. Por otra parte, Muc2 no parece presentar un papel importante en el desarrollo normal ni diferenciación de la glándula mamaria. La expresión de Muc5ac permite sugerir que esta mucina jugaría un rol en la morfogénesis glandular previa la diferenciación de las estructuras secretoras.

Conclusiones

- La intensa expresión de Muc1 en las neoplasias mamarias de rata está en coincidencia con el rol de esta mucina en los procesos de desarrollo y diseminación tumoral.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis permitieron establecer, a partir del empleo de diversas metodologías, el perfil de expresión y la localización específica de las mucinas y de Rhbdd2, como así también de los carbohidratos asociados, en los epitelios normales en distintos estadios del desarrollo y en neoplasias asociadas a la glándula mamaria de la rata.

La información aportada proporciona una mayor comprensión acerca de la biología de estos antígenos y permite concluir claramente que tales proteínas y carbohidratos asociados estarían desempeñando un rol importante en la biología del desarrollo, fundamentalmente en la formación y diferenciación normal de los epitelios.

Asimismo, los datos obtenidos del estudio en la rata, son de importancia en el establecimiento de modelos animales, con fines comparativos de los procesos patológicos que afectan a los epitelios de los mamíferos.

Bibliografia:

- Abba, M. C., V. T. Fabris, Y. Hu, F. S. Kittrell, W. W. Cai, L. A. Donehower, A. Sahin, D. Medina, and C. M. Aldaz. "Identification of Novel Amplification Gene Targets in Mouse and Human Breast Cancer at a Syntenic Cluster Mapping to Mouse Ch8a1 and Human Ch13q34." *Cancer Res* 67, no. 9 (2007): 4104-12.
- Abba, M. C., E. Lacunza, M. I. Nunez, A. Colussi, M. Isla-Larrain, A. Segal-Eiras, M. V. Croce, and C. M. Aldaz. "Rhomboid Domain Containing 2 (Rhbdd2): A Novel Cancer-Related Gene over-Expressed in Breast Cancer." *Biochim Biophys Acta* 1792, no. 10 (2009): 988-97.
- Adachi-Yamada, T., and M. B. O'Connor. "Morphogenetic Apoptosis: A Mechanism for Correcting Discontinuities in Morphogen Gradients." *Dev Biol* 251, no. 1 (2002): 74-90.
- Adrain, C., K. Strisovsky, M. Zettl, L. Hu, M. K. Lemberg, and M. Freeman. "Mammalian Egf Receptor Activation by the Rhomboid Protease Rhbdl2." *EMBO Rep* 12, no. 5 (2011): 421-7.
- Ahmedli, N. B., Y. Gribanova, C. C. Njoku, A. Naidu, A. Young, E. Mendoza, C. K. Yamashita, R. K. Ozgul, J. E. Johnson, D. A. Fox, and D. B. Farber. "Dynamics of the Rhomboid-Like Protein Rhbdd2 Expression in Mouse Retina and Involvement of Its Human Ortholog in Retinitis Pigmentosa." *J Biol Chem* 288, no. 14 (2013): 9742-54.
- Alexander, W. S., E. M. Viney, J. G. Zhang, D. Metcalf, M. Kauppi, C. D. Hyland, M. R. Carpinelli, W. Stevenson, B. A. Croker, A. A. Hilton, S. Ellis, C. Selan, H. H. Nandurkar, C. C. Goodnow, B. T. Kile, N. A. Nicola, A. W. Roberts, and D. J. Hilton. "Thrombocytopenia and Kidney Disease in Mice with a Mutation in the C1galt1 Gene." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, no. 44 (2006): 16442-7.
- Aman, A., and T. Piotrowski. "Cell Migration During Morphogenesis." *Dev Biol* 341, no. 1 (2010): 20-33.

- Amit-Romach, E., R. Reifen, and Z. Uni. "Mucosal Function in Rat Jejunum and Ileum Is Altered by Induction of Colitis." *Int J Mol Med* 18, no. 4 (2006): 721-7.
- Andrianifahanana, M., N. Moniaux, and S. K. Batra. "Regulation of Mucin Expression: Mechanistic Aspects and Implications for Cancer and Inflammatory Diseases." *Biochim Biophys Acta* 1765, no. 2 (2006): 189-222.
- Angulo, MT, López, M, Durán Castro, H, Villavicencio, N, Ramírez, Emiliano J, Solís Ortíz, M. "Ciclo Estral Del Ratón Hembra Intacto Y Ovariectomizado." *Acta Universitaria, Universidad de Guanajuato*. 22, no. 2 (2012): 5-8.
- Aplin, J. D., M. Meseguer, C. Simon, M. E. Ortiz, H. Croxatto, and C. J. Jones. "Muc1, Glycans and the Cell-Surface Barrier to Embryo Implantation." *Biochem Soc Trans* 29, no. Pt 2 (2001): 153-6.
- Arata de Bellabarba; G., Bishop, W., Rojas, F. . "El Inicio De La Pubertad En La Rata Hembra." *Acta Cient. Venezolana*, no. 32 (1981): 457-462.
- Asker, N., M. A. Axelsson, S. O. Olofsson, and G. C. Hansson. "Dimerization of the Human Muc2 Mucin in the Endoplasmic Reticulum Is Followed by a N-Glycosylation-Dependent Transfer of the Mono- and Dimers to the Golgi Apparatus." *J Biol Chem* 273, no. 30 (1998): 18857-63.
- Balague, C., J. P. Audie, N. Porchet, and F. X. Real. "In Situ Hybridization Shows Distinct Patterns of Mucin Gene Expression in Normal, Benign, and Malignant Pancreas Tissues." *Gastroenterology* 109, no. 3 (1995): 953-64.
- Baldus, S. E., K. Engelmann, and F. G. Hanisch. "Muc1 and the Mucs: A Family of Human Mucins with Impact in Cancer Biology." *Crit Rev Clin Lab Sci* 41, no. 2 (2004): 189-231.

- Bara, J., E. Chastre, J. Mahiou, R. L. Singh, M. E. Forgue-Lafitte, E. Hollande, and F. Godeau. "Gastric M1 Mucin, an Early Oncofetal Marker of Colon Carcinogenesis, Is Encoded by the Muc5ac Gene." *Int J Cancer* 75, no. 5 (1998): 767-73.
- Bara, J., C. Decaens, B. Loridon-Rosa, and R. Oriol. "Immunohistological Characterization of Mucin Epitopes by Pre-Treatment of Gastro-Intestinal Sections with Periodic Acid." *J Immunol Methods* 149, no. 1 (1992): 105-13.
- Bara, J., R. Gautier, P. Mouradian, C. Decaens, and N. Daher. "Oncofetal Mucin M1 Epitope Family: Characterization and Expression During Colonic Carcinogenesis." *Int J Cancer* 47, no. 2 (1991): 304-10.
- Barr, N., C. R. Taylor, T. Young, and G. F. Springer. "Are Pancarcinoma T and Tn Differentiation Antigens?" *Cancer* 64, no. 4 (1989): 834-41.
- Bartman, A. E., S. J. Sanderson, S. L. Ewing, G. A. Niehans, C. L. Wiehr, M. K. Evans, and S. B. Ho. "Aberrant Expression of Muc5ac and Muc6 Gastric Mucin Genes in Colorectal Polyps." *Int J Cancer* 80, no. 2 (1999): 210-8.
- Becker; Kleinsmith, W; Hardin, LJ; Bertoni, G. *The World of the Cell*. 17^o Edition ed.: Pearson Education Inc., 2009.
- Bird, J. M., and S. J. Kimber. "Oligosaccharides Containing Fucose Linked Alpha(1-3) and Alpha(1-4) to N-Acetylglucosamine Cause Decompaction of Mouse Morulae." *Dev Biol* 104, no. 2 (1984): 449-60.
- Boshell, M., E. N. Lalani, L. Pemberton, J. Burchell, S. Gendler, and J. Taylor-Papadimitriou. "The Product of the Human Muc1 Gene When Secreted by Mouse Cells Transfected with the Full-Length Cdna Lacks the Cytoplasmic Tail." *Biochem Biophys Res Commun* 185, no. 1 (1992): 1-8.

- Braga, V. M., L. F. Pemberton, T. Duhig, and S. J. Gendler. "Spatial and Temporal Expression of an Epithelial Mucin, Muc-1, During Mouse Development." *Development* 115, no. 2 (1992): 427-37.
- Brayman, M., A. Thathiah, and D. D. Carson. "Muc1: A Multifunctional Cell Surface Component of Reproductive Tissue Epithelia." *Reprod Biol Endocrinol* 2, (2004): 4.
- Brockhausen, I. "Biosynthesis and Functions of O-Glycans and Regulation of Mucin Antigen Expression in Cancer." *Biochem Soc Trans* 25, no. 3 (1997): 871-4.
- Brockhausen, I. "Sulphotransferases Acting on Mucin-Type Oligosaccharides." *Biochem Soc Trans* 31, no. 2 (2003): 318-25.
- Brooks, S. A. "Strategies for Analysis of the Glycosylation of Proteins: Current Status and Future Perspectives." *Mol Biotechnol* 43, no. 1 (2009): 76-88.
- Buisine, M. P., L. Devisme, M. C. Copin, M. Durand-Reville, B. Gosselin, J. P. Aubert, and N. Porchet. "Developmental Mucin Gene Expression in the Human Respiratory Tract." *Am J Respir Cell Mol Biol* 20, no. 2 (1999): 209-18.
- Buisine, M. P., L. Devisme, P. Degand, M. C. Dieu, B. Gosselin, M. C. Copin, J. P. Aubert, and N. Porchet. "Developmental Mucin Gene Expression in the Gastroduodenal Tract and Accessory Digestive Glands. Ii. Duodenum and Liver, Gallbladder, and Pancreas." *J Histochem Cytochem* 48, no. 12 (2000): 1667-76.
- Buisine, M. P., L. Devisme, V. Maunoury, E. Deschodt, B. Gosselin, M. C. Copin, J. P. Aubert, and N. Porchet. "Developmental Mucin Gene Expression in the Gastroduodenal Tract and Accessory Digestive Glands. I. Stomach. A Relationship to Gastric Carcinoma." *J Histochem Cytochem* 48, no. 12 (2000): 1657-66.

- Buisine, M. P., L. Devisme, T. C. Savidge, C. Gespach, B. Gosselin, N. Porchet, and J. P. Aubert. "Mucin Gene Expression in Human Embryonic and Fetal Intestine." *Gut* 43, no. 4 (1998): 519-24.
- Buisine, M. P., A. Wacrenier, C. Mariette, E. Leteurtre, F. Escande, S. Aissi, A. Ketele, A. Leclercq, N. Porchet, and T. Lesuffleur. "Frequent Mutations of the Ca Simple Sequence Repeat in Intron 1 of Egfr in Mismatch Repair-Deficient Colorectal Cancers." *World J Gastroenterol* 14, no. 7 (2008): 1053-9.
- Byrd, J. C., and R. S. Bresalier. "Mucins and Mucin Binding Proteins in Colorectal Cancer." *Cancer Metastasis Rev* 23, no. 1-2 (2004): 77-99.
- Caballero-Franco, C., K. Keller, C. De Simone, and K. Chadee. "The Vsl#3 Probiotic Formula Induces Mucin Gene Expression and Secretion in Colonic Epithelial Cells." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292, no. 1 (2007): G315-22.
- Cao, Y., A. Merling, U. Karsten, S. Goletz, M. Punzel, R. Kraft, G. Butschak, and R. Schwartz-Albiez. "Expression of Cd175 (Tn), Cd175s (Sialosyl-Tn) and Cd176 (Thomsen-Friedenreich Antigen) on Malignant Human Hematopoietic Cells." *Int J Cancer* 123, no. 1 (2008): 89-99.
- Carlson. *Embriología Humana Y Biología Del Desarrollo*. 3^o Edición ed., 2005.
- Ciborowski, P., and O. J. Finn. "Non-Glycosylated Tandem Repeats of Muc1 Facilitate Attachment of Breast Tumor Cells to Normal Human Lung Tissue and Immobilized Extracellular Matrix Proteins (Ecm) in Vitro: Potential Role in Metastasis." *Clin Exp Metastasis* 19, no. 4 (2002): 339-45.
- Conn, P.M. "Handbook of Models for Human Aging." *Elsevier Academic Press*, (2006): 537.

- Cotsarelis, G., T. T. Sun, and R. M. Lavker. "Label-Retaining Cells Reside in the Bulge Area of Pilosebaceous Unit: Implications for Follicular Stem Cells, Hair Cycle, and Skin Carcinogenesis." *Cell* 61, no. 7 (1990): 1329-37.
- Crema, V. O., A. C. Fossati, D. E. Hamassaki, and M. F. Santos. "Distribution of Small Rho Gtpases in the Developing Rat Submandibular Gland." *J Mol Histol* 39, no. 5 (2008): 519-25.
- Croce, M. V., A. G. Colussi, M. R. Price, and A. Segal-Eiras. "Expression of Tumour Associated Antigens in Normal, Benign and Malignant Human Mammary Epithelial Tissue: A Comparative Immunohistochemical Study." *Anticancer Res* 17, no. 6D (1997): 4287-92.
- Croce, M. V., M. Isla-Larrain, M. E. Rabassa, S. Demichelis, A. G. Colussi, M. Crespo, E. Lacunza, and A. Segal-Eiras. "Lewis X Is Highly Expressed in Normal Tissues: A Comparative Immunohistochemical Study and Literature Revision." *Pathol Oncol Res* 13, no. 2 (2007): 130-8.
- Croce, M. V., M. Isla-Larrain, F. Remes-Lenicov, A. G. Colussi, E. Lacunza, K. C. Kim, S. J. Gendler, and A. Segal-Eiras. "Muc1 Cytoplasmic Tail Detection Using Ct33 Polyclonal and Ct2 Monoclonal Antibodies in Breast and Colorectal Tissue." *Histol Histopathol* 21, no. 8 (2006): 849-55.
- Croce, M. V., M. T. Isla-Larrain, C. E. Rua, M. E. Rabassa, S. J. Gendler, and A. Segal-Eiras. "Patterns of Muc1 Tissue Expression Defined by an Anti-Muc1 Cytoplasmic Tail Monoclonal Antibody in Breast Cancer." *J Histochem Cytochem* 51, no. 6 (2003): 781-8.
- Croce, M. V., and A. Segal-Eiras. "The Use of Carbohydrate Antigens for the Preparation of Vaccines for Therapy in Breast Cancer." *Drugs Today (Barc)* 38, no. 11 (2002): 759-68.
- Cutler, LS; Chaudhry AP. "Intercellular Contacts at the Epithelial-Mesenchymal Interface During the Prenatal Development of the Rat Submandibular Gland." *Dev Biol.* 33, no. 2 (1973): 229-40.

- Chakraborty, S., N. Bonthu, B. J. Swanson, and S. K. Batra. "Role of Mucins in the Skin During Benign and Malignant Conditions." *Cancer Lett* 301, no. 2 (2011): 127-41.
- Chambers, J. A., M. A. Hollingsworth, A. E. Trezise, and A. Harris. "Developmental Expression of Mucin Genes Muc1 and Muc2." *J Cell Sci* 107 (Pt 2), (1994): 413-24.
- Chomczynski, P. "A Reagent for the Single-Step Simultaneous Isolation of Rna, DNA and Proteins from Cell and Tissue Samples." *Biotechniques* 15, no. 3 (1993): 532-4, 536-7.
- Chomczynski, P., and N. Sacchi. "Single-Step Method of Rna Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction." *Anal Biochem* 162, no. 1 (1987): 156-9.
- Dekker, J., J. W. Rossen, H. A. Buller, and A. W. Einerhand. "The Muc Family: An Obituary." *Trends Biochem Sci* 27, no. 3 (2002): 126-31.
- Demichelis, S. O., C. G. Alberdi, W. J. Servi, M. T. Isla-Larrain, A. Segal-Eiras, and M. V. Croce. "Comparative Immunohistochemical Study of Muc1 and Carbohydrate Antigens in Breast Benign Disease and Normal Mammary Gland." *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 18, no. 1 (2010): 41-50.
- DeSouza, M. M., G. A. Surveyor, R. E. Price, J. Julian, R. Kardon, X. Zhou, S. Gendler, J. Hilkens, and D. D. Carson. "Muc1/Episialin: A Critical Barrier in the Female Reproductive Tract." *J Reprod Immunol* 45, no. 2 (1999): 127-58.
- Do, SI; Kim, K; Kim, DH; Chae, SW; Park, YL; Park, CH; Sohn, JH. "Associations between the Expression of Mucins (Muc1, Muc2, Muc5ac, and Muc6) and Clinicopathologic Parameters of Human Breast Ductal Carcinomas." *J Breast Cancer* 16, no. 2 (2013): 152-8.

- Familiar, M., G. A. Cook, D. R. Taupin, G. Marryatt, N. D. Yeomans, and A. S. Giraud. "Trefoil Peptides Are Early Markers of Gastrointestinal Maturation in the Rat." *Int J Dev Biol* 42, no. 6 (1998): 783-9.
- Fan, Q. W., K. Uchimura, Y. Yuzawa, S. Matsuo, C. Mitsuoka, R. Kannagi, H. Muramatsu, K. Kadomatsu, and T. Muramatsu. "Spatially and Temporally Regulated Expression of N-Acetylglucosamine-6-O-Sulfotransferase During Mouse Embryogenesis." *Glycobiology* 9, no. 9 (1999): 947-55.
- Farrell, G. C., C. Z. Larter, J. Y. Hou, R. H. Zhang, M. M. Yeh, J. Williams, A. dela Pena, R. Francisco, S. R. Osvath, J. Brooling, N. Teoh, and L. M. Sedger. "Apoptosis in Experimental Nash Is Associated with P53 Activation and Trail Receptor Expression." *J Gastroenterol Hepatol* 24, no. 3 (2009): 443-52.
- Feickert, H. J., B. R. Anger, C. Cordon-Cardo, and K. O. Lloyd. "Cell-Surface Antigens of Human Lung Tumors Detected by Mouse Monoclonal Antibodies: Definition of Blood-Group- and Non-Blood-Group-Related Antigenic Systems." *Int J Cancer* 46, no. 6 (1990): 1007-13.
- Fenderson, B. A., U. Zehavi, and S. Hakomori. "A Multivalent Lacto-N-Fucopentaose Iii-Lysyllysine Conjugate Decompact Preimplantation Mouse Embryos, While the Free Oligosaccharide Is Ineffective." *J Exp Med* 160, no. 5 (1984): 1591-6.
- Fluhr, J. W., M. J. Behne, B. E. Brown, D. G. Moskowitz, C. Selden, M. Mao-Qiang, T. M. Mauro, P. M. Elias, and K. R. Feingold. "Stratum Corneum Acidification in Neonatal Skin: Secretory Phospholipase A2 and the Sodium/Hydrogen Antiporter-1 Acidify Neonatal Rat Stratum Corneum." *J Invest Dermatol* 122, no. 2 (2004): 320-9.
- Fowler, J., L. Vinall, and D. Swallow. "Polymorphism of the Human Muc Genes." *Front Biosci* 6, (2001): D1207-15.
- Freeman, M. "Rhomboids: 7 Years of a New Protease Family." *Semin Cell Dev Biol* 20, no. 2 (2009): 231-9.

- Freire, T., S. Bay, S. von Mensdorff-Pouilly, and E. Osinaga. "Molecular Basis of Incomplete O-Glycan Synthesis in MCF-7 Breast Cancer Cells: Putative Role of Muc6 in Tn Antigen Expression." *Cancer Res* 65, no. 17 (2005): 7880-7.
- Gendler, S. J. "Muc1, the Renaissance Molecule." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 6, no. 3 (2001): 339-53.
- Gendler, S. J., J. M. Burchell, T. Duhig, D. Lamport, R. White, M. Parker, and J. Taylor-Papadimitriou. "Cloning of Partial Cdna Encoding Differentiation and Tumor-Associated Mucin Glycoproteins Expressed by Human Mammary Epithelium." *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, no. 17 (1987): 6060-4.
- Gendler, S. J., and A. P. Spicer. "Epithelial Mucin Genes." *Annu Rev Physiol* 57, (1995): 607-34.
- Gilbert, S. *Biología Del Desarrollo*. 7^o Edición ed.: Editorial Médica Panamericana, 2005.
- Girling, A., J. Bartkova, J. Burchell, S. Gendler, C. Gillett, and J. Taylor-Papadimitriou. "A Core Protein Epitope of the Polymorphic Epithelial Mucin Detected by the Monoclonal Antibody Sm-3 Is Selectively Exposed in a Range of Primary Carcinomas." *Int J Cancer* 43, no. 6 (1989): 1072-6.
- Gjorevski, N., and C. M. Nelson. "Integrated Morphodynamic Signalling of the Mammary Gland." *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, no. 9 (2011): 581-93.
- Gómez Dumm. "Embiología humana", Atlas y Texto, 1^o Edición, Ed. El Ateneo (2003).
- Green, M. R., and J. R. Couchman. "Distribution of Epidermal Growth Factor Receptors in Rat Tissues During Embryonic Skin Development, Hair Formation, and the Adult Hair Growth Cycle." *J Invest Dermatol* 83, no. 2 (1984): 118-23.

- Guddo, F., A. Giatromanolaki, M. I. Koukourakis, C. Reina, A. M. Vignola, G. Chlouverakis, J. Hilkens, K. C. Gatter, A. L. Harris, and G. Bonsignore. "Muc1 (Episialin) Expression in Non-Small Cell Lung Cancer Is Independent of Egfr and C-ErbB-2 Expression and Correlates with Poor Survival in Node Positive Patients." *J Clin Pathol* 51, no. 9 (1998): 667-71.
- Guillem, P., V. Billeret, M. P. Buisine, J. F. Flejou, M. Lecomte-Houcke, P. Degand, J. P. Aubert, J. P. Triboulet, and N. Porchet. "Mucin Gene Expression and Cell Differentiation in Human Normal, Premalignant and Malignant Esophagus." *Int J Cancer* 88, no. 6 (2000): 856-61.
- Gum, J. R., Jr., J. W. Hicks, N. W. Toribara, B. Siddiki, and Y. S. Kim. "Molecular Cloning of Human Intestinal Mucin (Muc2) Cdna. Identification of the Amino Terminus and Overall Sequence Similarity to Prepro-Von Willebrand Factor." *J Biol Chem* 269, no. 4 (1994): 2440-6.
- Hagen, F. K., B. Hazes, R. Raffo, D. deSa, and L. A. Tabak. "Structure-Function Analysis of the Udp-N-Acetyl-D-Galactosamine:Polypeptide N-Acetylgalactosaminyltransferase. Essential Residues Lie in a Predicted Active Site Cleft Resembling a Lactose Repressor Fold." *J Biol Chem* 274, no. 10 (1999): 6797-803.
- Haltiwanger, R. S., and J. B. Lowe. "Role of Glycosylation in Development." *Annu Rev Biochem* 73, (2004): 491-537.
- Hanahan, D., and R. A. Weinberg. "The Hallmarks of Cancer." *Cell* 100, no. 1 (2000): 57-70.
- Hanai, N., K. Shitara, and H. Yoshida. "Generation of Monoclonal Antibodies against Human Lung Squamous Cell Carcinoma and Adenocarcinoma Using Mice Rendered Tolerant to Normal Human Lung." *Cancer Res* 46, no. 9 (1986): 4438-43.
- Hanisch, F. G. "O-Glycosylation of the Mucin Type." *Biol Chem* 382, no. 2 (2001): 143-9.

- Hanski, C., E. Riede, A. Gratchev, H. D. Foss, C. Bohm, E. Klusmann, M. Hummel, B. Mann, H. J. Buhr, H. Stein, Y. S. Kim, J. Gum, and E. O. Riecken. "Muc2 Gene Suppression in Human Colorectal Carcinomas and Their Metastases: In Vitro Evidence of the Modulatory Role of DNA Methylation." *Lab Invest* 77, no. 6 (1997): 685-95.
- Hardy, M. H. "The Secret Life of the Hair Follicle." *Trends Genet* 8, no. 2 (1992): 55-61.
- Hastie, T; Tibshirani, R; Friedman, J. "14.3.12 Hierarchical Clustering." In *The Elements of Statistical Learning*: New York: Springer, 2009.
- Hattrup, C. L., J. M. Bradley, K. L. Kotlarczyk, C. S. Madsen, J. G. Hentz, R. J. Marler, and S. J. Gendler. "The Muc1 Cytoplasmic Tail and Tandem Repeat Domains Contribute to Mammary Oncogenesis in Fvb Mice." *Breast Cancer (Auckl)* 1, (2008): 57-63.
- Hayashi, Y., K. Toda, T. Saibara, S. Okamoto, M. Osanai, H. Enzan, and G. H. Lee. "Expression of Fascin-1, an Actin-Bundling Protein, in Migrating Hepatoblasts During Rat Liver Development." *Cell Tissue Res* 334, no. 2 (2008): 219-26.
- Heimburg, J., J. Yan, S. Morey, O. V. Glinskii, V. H. Huxley, L. Wild, R. Klick, R. Roy, V. V. Glinsky, and K. Rittenhouse-Olson. "Inhibition of Spontaneous Breast Cancer Metastasis by Anti-Thomsen-Friedenreich Antigen Monoclonal Antibody Jaa-F11." *Neoplasia* 8, no. 11 (2006): 939-48.
- Hilkens, J., M. J. Ligtenberg, H. L. Vos, and S. V. Litvinov. "Cell Membrane-Associated Mucins and Their Adhesion-Modulating Property." *Trends Biochem Sci* 17, no. 9 (1992): 359-63.
- Hill, M *The Carnegie Staged Embryos*, 2010.
- Hill, R. R., and G. de Bruyn. "Changes in Lectin-Binding Patterns During Late Fetal Development of the Rat Colon." *Acta Anat (Basel)* 141, no. 3 (1991): 245-50.

- Hisaoka, M., J. Haratake, and H. Hashimoto. "Pancreatic Morphogenesis and Extracellular Matrix Organization During Rat Development." *Differentiation* 53, no. 3 (1993): 163-72.
- Hoar, RM. "Comparative Developmental Aspects of Selected Organ Systems. Ii. Gastrointestinal and Urogenital Systems. ." *Environmental Health Perspectives*. 1, (1976): 61-66.
- Hoar, RM; Monie IW. "Comparative Development of Specific Organ Systems " *Developmental Toxicology*, (1981).
- Hollingsworth, M. A., and B. J. Swanson. "Mucins in Cancer: Protection and Control of the Cell Surface." *Nat Rev Cancer* 4, no. 1 (2004): 45-60.
- Horm, T. M., and J. A. Schroeder. "Muc1 and Metastatic Cancer: Expression, Function and Therapeutic Targeting." *Cell Adh Migr* 7, no. 2 (2013): 187-98.
- Hounsell, E. F. "Physicochemical Analyses of Oligosaccharide Determinants of Glycoproteins." *Adv Carbohydr Chem Biochem* 50, (1994): 311-50.
- Hua, X., X. Liu, D. O. Ansari, and H. F. Lodish. "Synergistic Cooperation of Tfe3 and Smad Proteins in Tgf-Beta-Induced Transcription of the Plasminogen Activator Inhibitor-1 Gene." *Genes Dev* 12, no. 19 (1998): 3084-95.
- Hudson, M. J., G. W. Stamp, K. S. Chaudhary, R. Hewitt, A. P. Stubbs, P. D. Abel, and E. N. Lalani. "Human Muc1 Mucin: A Potent Glandular Morphogen." *J Pathol* 194, no. 3 (2001): 373-83.
- Hull, S. R., A. Bright, K. L. Carraway, M. Abe, D. F. Hayes, and D. W. Kufe. "Oligosaccharide Differences in the Df3 Sialomucin Antigen from Normal Human Milk and the Bt-20 Human Breast Carcinoma Cell Line." *Cancer Commun* 1, no. 4 (1989): 261-7.

- Irazoqui, F. J., and G. A. Nores. "Thomsen-Friedenreich Disaccharide Immunogenicity." *Curr Cancer Drug Targets* 3, no. 6 (2003): 433-43.
- Isla Larrain, M. T., A. G. Colussi, S. O. Demichelis, A. Barbera, A. Creton, A. Segal-Eiras, and M. V. Croce. "Humoral Immune Response against Tumoral Mucin 1 (Muc1) in Breast Cancer Patients." *Int J Biol Markers*, (2013): 0.
- Johnson, E. B., D. J. Steffen, K. W. Lynch, and J. Herz. "Defective Splicing of Megf7/Lrp4, a Regulator of Distal Limb Development, in Autosomal Recessive Mulefoot Disease." *Genomics* 88, no. 5 (2006): 600-9.
- Jonckheere, N., A. Vincent, H. Franquet-Ansart, J. Witte-Bouma, A. Korteland-van Male, E. Leteurtre, I. B. Renes, and I. Van Seuningen. "Gata-4/-6 and Hnf-1/-4 Families of Transcription Factors Control the Transcriptional Regulation of the Murine Muc5ac Mucin During Stomach Development and in Epithelial Cancer Cells." *Biochim Biophys Acta* 1819, no. 8 (2012): 869-76.
- Kamio, K., I. Matsushita, M. Hijikata, Y. Kobashi, G. Tanaka, K. Nakata, T. Ishida, K. Tokunaga, Y. Taguchi, S. Homma, A. Azuma, S. Kudoh, and N. Keicho. "Promoter Analysis and Aberrant Expression of the Muc5b Gene in Diffuse Panbronchiolitis." *Am J Respir Crit Care Med* 171, no. 9 (2005): 949-57.
- Kanitakis, J., I. al-Rifai, M. Faure, and A. Claudy. "Differential Expression of the Cancer Associated Antigens T (Thomsen-Friedenreich) and Tn to the Skin in Primary and Metastatic Carcinomas." *J Clin Pathol* 51, no. 8 (1998): 588-92.
- Karlsson, N. G., M. E. Johansson, N. Asker, H. Karlsson, S. J. Gendler, I. Carlstedt, and G. C. Hansson. "Molecular Characterization of the Large Heavily Glycosylated Domain Glycopeptide from the Rat Small Intestinal Muc2 Mucin." *Glycoconj J* 13, no. 5 (1996): 823-31.

- Kingsley, P. D., K. E. McGrath, K. M. Maltby, A. D. Koniski, R. Ramchandran, and J. Palis. "Subtractive Hybridization Reveals Tissue-Specific Expression of Ahnak During Embryonic Development." *Dev Growth Differ* 43, no. 2 (2001): 133-43.
- Kruger, N. J. "The Bradford Method for Protein Quantitation." *Methods Mol Biol* 32, (1994): 9-15.
- Kuan, S. F., A. G. Montag, J. Hart, T. Krausz, and W. Recant. "Differential Expression of Mucin Genes in Mammary and Extramammary Paget's Disease." *Am J Surg Pathol* 25, no. 12 (2001): 1469-77.
- Kufe, D., G. Inghirami, M. Abe, D. Hayes, H. Justi-Wheeler, and J. Schlom. "Differential Reactivity of a Novel Monoclonal Antibody (Df3) with Human Malignant Versus Benign Breast Tumors." *Hybridoma* 3, no. 3 (1984): 223-32.
- Kyo, K., M. Parkes, Y. Takei, H. Nishimori, P. Vyas, J. Satsangi, J. Simmons, H. Nagawa, S. Baba, D. Jewell, T. Muto, G. M. Lathrop, and Y. Nakamura. "Association of Ulcerative Colitis with Rare Vntr Alleles of the Human Intestinal Mucin Gene, Muc3." *Hum Mol Genet* 8, no. 2 (1999): 307-11.
- Lacunza, E., M. C. Abba, A. Segal-Eiras, and M. V. Croce. "Identification and Expression of the Epithelial Muc1 Mucin in Normal Feline Tissues." *Vet Immunol Immunopathol* 130, no. 1-2 (2009): 17-24.
- Lacunza, E., J. Bara, A. Segal-Eiras, and M. V. Croce. "Expression of Conserved Mucin Domains by Epithelial Tissues in Various Mammalian Species." *Res Vet Sci* 86, no. 1 (2009): 68-77.
- Lacunza, E., R. Canzoneri, M. E. Rabassa, A. Zwenger, A. Segal-Eiras, M. V. Croce, and M. C. Abba. "Rhbdd2: A 5-Fluorouracil Responsive Gene Overexpressed in the Advanced Stages of Colorectal Cancer." *Tumour Biol* 33, no. 6 (2012): 2393-9.

- Lan, M. S., S. K. Batra, W. N. Qi, R. S. Metzgar, and M. A. Hollingsworth. "Cloning and Sequencing of a Human Pancreatic Tumor Mucin Cdna." *J Biol Chem* 265, no. 25 (1990): 15294-9.
- Lang, T., G. C. Hansson, and T. Samuelsson. "Gel-Forming Mucins Appeared Early in Metazoan Evolution." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, no. 41 (2007): 16209-14.
- Lau, S. K., D. J. Shields, E. A. Murphy, J. S. Desgrosellier, S. Anand, M. Huang, S. Kato, S. T. Lim, S. M. Weis, D. G. Stupack, D. D. Schlaepfer, and D. A. Cheresh. "Egfr-Mediated Carcinoma Cell Metastasis Mediated by Integrin Alphavbeta5 Depends on Activation of C-Src and Cleavage of Muc1." *PLoS One* 7, no. 5 (2012): e36753.
- Lesuffleur, T., F. Roche, A. S. Hill, M. Lacasa, M. Fox, D. M. Swallow, A. Zweibaum, and F. X. Real. "Characterization of a Mucin Cdna Clone Isolated from Ht-29 Mucus-Secreting Cells. The 3' End of Muc5ac?" *J Biol Chem* 270, no. 23 (1995): 13665-73.
- Li, R., Z. Meng, and J. Xie. "Effects of Sulfur Dioxide on the Expressions of Muc5ac and Icam-1 in Airway of Asthmatic Rats." *Regul Toxicol Pharmacol* 48, no. 3 (2007): 284-91.
- Ligtenberg, M. J., F. Buijs, H. L. Vos, and J. Hilkens. "Suppression of Cellular Aggregation by High Levels of Episialin." *Cancer Res* 52, no. 8 (1992): 2318-24.
- Lillehoj, E. P., F. Han, and K. C. Kim. "Mutagenesis of a Gly-Ser Cleavage Site in Muc1 Inhibits Ectodomain Shedding." *Biochem Biophys Res Commun* 307, no. 3 (2003): 743-9.
- Liu, M. L., J. Jeong, R. Ambannavar, C. Millward, F. Baehner, C. Sangli, D. Dutta, M. Pho, A. Nguyen, and M. T. Cronin. "Rt-Pcr Gene Expression Profiling of Rna from Paraffin-Embedded Tissues Prepared Using a Range of Different Fixatives and Conditions." *Methods Mol Biol* 724, (2011): 205-37.
- Liu, S., X. Yang, Y. Liu, X. Wang, and Q. Yan. "Slex/L-Selectin Mediates Adhesion in Vitro Implantation Model." *Mol Cell Biochem* 350, no. 1-2 (2011): 185-92.

- Lodish. *Biología Celular Y Molecular*. 5° Edición ed.: Editorial Médica Panamericana, 2005.
- Logan, C. Y., and R. Nusse. "The Wnt Signaling Pathway in Development and Disease." *Annu Rev Cell Dev Biol* 20, (2004): 781-810.
- Luna-More, S., F. Rius, B. Weil, A. Jimenez, M. D. Bautista, and A. Perez-Mellado. "Ema: A Differentiation Antigen Related to Node Metastatic Capacity of Breast Carcinomas." *Pathol Res Pract* 197, no. 6 (2001): 419-25.
- Macao, B., D. G. Johansson, G. C. Hansson, and T. Hard. "Autoproteolysis Coupled to Protein Folding in the Sea Domain of the Membrane-Bound Muc1 Mucin." *Nat Struct Mol Biol* 13, no. 1 (2006): 71-6.
- Mack, D. R., S. Ahrne, L. Hyde, S. Wei, and M. A. Hollingsworth. "Extracellular Muc3 Mucin Secretion Follows Adherence of Lactobacillus Strains to Intestinal Epithelial Cells in Vitro." *Gut* 52, no. 6 (2003): 827-33.
- Masso-Welch, P. A., K. M. Darcy, N. C. Stangle-Castor, and M. M. Ip. "A Developmental Atlas of Rat Mammary Gland Histology." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 5, no. 2 (2000): 165-85.
- McAteer, J. A. "Tracheal Morphogenesis and Fetal Development of the Mucociliary Epithelium of the Rat." *Scan Electron Microsc*, no. Pt 4 (1984): 1995-2008.
- McNamara, N., and C. Basbaum. "Signaling Networks Controlling Mucin Production in Response to Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria." *Glycoconj J* 18, no. 9 (2001): 715-22.
- Meio, I. B., I. Siviero, S. M. Ferrante, and J. J. Carvalho. "Morphologic Study of Embryonic Development of Rat Duodenum through a Computerized Three-Dimensional

Reconstruction: Critical Analysis of Solid Core Theory." *Pediatr Surg Int* 24, no. 5 (2008): 561-5.

- Miller, S. J., T. T. Sun, and R. M. Lavker. "Hair Follicles, Stem Cells, and Skin Cancer." *J Invest Dermatol* 100, no. 3 (1993): 288S-294S.
- Mitsudomi, T., and Y. Yatabe. "Epidermal Growth Factor Receptor in Relation to Tumor Development: Egfr Gene and Cancer." *FEBS J* 277, no. 2 (2010): 301-8.
- Moniaux, N., F. Escande, S. K. Batra, N. Porchet, A. Laine, and J. P. Aubert. "Alternative Splicing Generates a Family of Putative Secreted and Membrane-Associated Muc4 Mucins." *Eur J Biochem* 267, no. 14 (2000): 4536-44.
- Moniaux, N., F. Escande, N. Porchet, J. P. Aubert, and S. K. Batra. "Structural Organization and Classification of the Human Mucin Genes." *Front Biosci* 6, (2001): D1192-206.
- Monie, I. W. "Comparative Development of the Nervous, Respiratory, and Cardiovascular Systems." *Environ Health Perspect* 18, (1976): 55-60.
- Muramatsu, T., and H. Muramatsu. "Carbohydrate Antigens Expressed on Stem Cells and Early Embryonic Cells." *Glycoconj J* 21, no. 1-2 (2004): 41-5.
- Nothias, J. Y., S. Majumder, K. J. Kaneko, and M. L. DePamphilis. "Regulation of Gene Expression at the Beginning of Mammalian Development." *J Biol Chem* 270, no. 38 (1995): 22077-80.
- O'Rahilly, R. "Early Human Development and the Chief Source of Information on Staged Human Embryos." *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 9, no. 4 (1979): 273-80.

- Ochoa-Hernandez, A. B., C. I. Juarez-Vazquez, M. A. Rosales-Reynoso, and P. Barros-Nunez. "[Wnt-Beta-Catenin Signaling Pathway and Its Relationship with Cancer]." *Cir Cir* 80, no. 4 (2012): 389-98.
- Ohmori, H., A. F. Dohrman, M. Gallup, T. Tsuda, H. Kai, J. R. Gum, Jr., Y. S. Kim, and C. B. Basbaum. "Molecular Cloning of the Amino-Terminal Region of a Rat Muc 2 Mucin Gene Homologue. Evidence for Expression in Both Intestine and Airway." *J Biol Chem* 269, no. 27 (1994): 17833-40.
- Ohshio, G., T. Imamura, M. Imamura, H. Yamabe, H. Sakahara, H. Nakada, and I. Yamashina. "Distribution of Tn Antigen Recognized by an Anti-Tn Monoclonal Antibody (Mls128) in Normal and Malignant Tissues of the Digestive Tract." *J Cancer Res Clin Oncol* 121, no. 4 (1995): 247-52.
- Orr, F. W., H. H. Wang, R. M. Lafrenie, S. Scherbarth, and D. M. Nance. "Interactions between Cancer Cells and the Endothelium in Metastasis." *J Pathol* 190, no. 3 (2000): 310-29.
- Parry, S., H. S. Silverman, K. McDermott, A. Willis, M. A. Hollingsworth, and A. Harris. "Identification of Muc1 Proteolytic Cleavage Sites in Vivo." *Biochem Biophys Res Commun* 283, no. 3 (2001): 715-20.
- Parsa, I., W. H. Marsh, and P. J. Fitzgerald. "Pancreas Acinar Cell Differentiation. I. Morphologic and Enzymatic Comparisons of Embryonic Rat Pancreas Anlage Grown in Organ Culture." *Am J Pathol* 57, no. 3 (1969): 457-87.
- Pennisi, E. "How a Growth Control Path Takes a Wrong Turn to Cancer." *Science* 281, no. 5382 (1998): 1438-9, 1441.
- Pereira, M. B., A. J. Dias, C. A. Reis, and F. C. Schmitt. "Immunohistochemical Study of the Expression of Muc5ac and Muc6 in Breast Carcinomas and Adjacent Breast Tissues." *J Clin Pathol* 54, no. 3 (2001): 210-3.

- Pérez, C.L. *Técnicas Estadísticas Con Spss*. 3^o Edition ed.: Prentice Hall, España, 2001.
- Pictet, R. L., W. R. Clark, R. H. Williams, and W. J. Rutter. "An Ultrastructural Analysis of the Developing Embryonic Pancreas." *Dev Biol* 29, no. 4 (1972): 436-67.
- Pinkus H, Mehregan AH. *A Guide to Dermohistopathology*: Appleton Century Crofts, New York, 1981.
- Porchet, N., and J. P. Aubert. "[Muc Genes: Mucin or Not Mucin? That Is the Question]." *Med Sci (Paris)* 20, no. 5 (2004): 569-74.
- Potter, J. D. "Development and the Environment: Clues to Carcinogenesis." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 20, no. 4 (2011): 574-7.
- Qi, B. Q., and S. W. Beasley. "Stages of Normal Tracheo-Bronchial Development in Rat Embryos: Resolution of a Controversy." *Dev Growth Differ* 42, no. 2 (2000): 145-53.
- Rahn, J. J., J. W. Chow, G. J. Horne, B. K. Mah, J. T. Emerman, P. Hoffman, and J. C. Hugh. "Muc1 Mediates Transendothelial Migration in Vitro by Ligating Endothelial Cell Icam-1." *Clin Exp Metastasis* 22, no. 6 (2005): 475-83.
- Raina, D., Y. Uchida, A. Kharbanda, H. Rajabi, G. Panchamoorthy, C. Jin, S. Kharbanda, M. Scaltriti, J. Baselga, and D. Kufe. "Targeting the Muc1-C Oncoprotein Downregulates Her2 Activation and Abrogates Trastuzumab Resistance in Breast Cancer Cells." *Oncogene*, (2013).
- Rakha, E. A., R. W. Boyce, D. Abd El-Rehim, T. Kurien, A. R. Green, E. C. Paish, J. F. Robertson, and I. O. Ellis. "Expression of Mucins (Muc1, Muc2, Muc3, Muc4, Muc5ac and Muc6) and Their Prognostic Significance in Human Breast Cancer." *Mod Pathol* 18, no. 10 (2005): 1295-304.

- Randell, S. H., T. Shimizu, W. Bakewell, F. C. Ramaekers, and P. Nettekheim. "Phenotypic Marker Expression During Fetal and Neonatal Differentiation of Rat Tracheal Epithelial Cells." *Am J Respir Cell Mol Biol* 8, no. 5 (1993): 546-55.
- Rastan, S., S. J. Thorpe, P. Scudder, S. Brown, H. C. Gooi, and T. Feizi. "Cell Interactions in Preimplantation Embryos: Evidence for Involvement of Saccharides of the Poly-N-Acetylactosamine Series." *J Embryol Exp Morphol* 87, (1985): 115-28.
- Regimbald, L. H., L. M. Pilarski, B. M. Longenecker, M. A. Reddish, G. Zimmermann, and J. C. Hugh. "The Breast Mucin Muci as a Novel Adhesion Ligand for Endothelial Intercellular Adhesion Molecule 1 in Breast Cancer." *Cancer Res* 56, no. 18 (1996): 4244-9.
- Reid, C. J., y A. Harris. "Developmental Expression of Mucin Genes in the Human Gastrointestinal System." *Gut* 42, no. 2 (1998): 220-6.
- Reid, C. J., y A. Harris. "Expression of the Muc 6 Mucin Gene in Development of the Human Kidney and Male Genital Ducts." *J Histochem Cytochem* 47, no. 6 (1999): 817-22.
- Reis, C. A., L. David, F. Carvalho, U. Mandel, C. de Bolos, E. Mirgorodskaya, H. Clausen, and M. Sobrinho-Simoes. "Immunohistochemical Study of the Expression of Muc6 Mucin and Co-Expression of Other Secreted Mucins (Muc5ac and Muc2) in Human Gastric Carcinomas." *J Histochem Cytochem* 48, no. 3 (2000): 377-88.
- Renkonen, J., T. Paavonen, and R. Renkonen. "Endothelial and Epithelial Expression of Sialyl Lewis(X) and Sialyl Lewis(a) in Lesions of Breast Carcinoma." *Int J Cancer* 74, no. 3 (1997): 296-300.
- Ridley, A. J., M. A. Schwartz, K. Burridge, R. A. Firtel, M. H. Ginsberg, G. Borisy, J. T. Parsons, and A. R. Horwitz. "Cell Migration: Integrating Signals from Front to Back." *Science* 302, no. 5651 (2003): 1704-9.

- Rittenhouse-Diakun, K., Z. Xia, D. Pickhardt, S. Morey, M. G. Baek, and R. Roy. "Development and Characterization of Monoclonal Antibody to T-Antigen: (Gal Beta1-3galnac-Alpha-O)." *Hybridoma* 17, no. 2 (1998): 165-73.
- Robbins. *Patología Humana*. 8° Edición ed.: Editorial Médica Panamericana, 2008.
- Robinson, G. W. "Cooperation of Signalling Pathways in Embryonic Mammary Gland Development." *Nat Rev Genet* 8, no. 12 (2007): 963-72.
- Rose, M. C. "Mucins: Structure, Function, and Role in Pulmonary Diseases." *Am J Physiol* 263, no. 4 Pt 1 (1992): L413-29.
- Rose, M. C., and J. A. Voynow. "Respiratory Tract Mucin Genes and Mucin Glycoproteins in Health and Disease." *Physiol Rev* 86, no. 1 (2006): 245-78.
- Roy, M. G., M. Rahmani, J. R. Hernandez, S. N. Alexander, C. Ehre, S. B. Ho, and C. M. Evans. "Mucin Production During Pre- and Post-Natal Mouse Lung Development." *Am J Respir Cell Mol Biol*, (2011).
- Rubinstein, D. B., M. Karmely, E. Pichinuk, R. Ziv, I. Benhar, N. Feng, N. I. Smorodinsky, and D. H. Wreschner. "The Muc1 Oncoprotein as a Functional Target: Immunotoxin Binding to Alpha/Beta Junction Mediates Cell Killing." *Int J Cancer* 124, no. 1 (2009): 46-54.
- Russo, I. H., P. Gimotty, M. Dupuis, and J. Russo. "Effect of Medroxyprogesterone Acetate on the Response of the Rat Mammary Gland to Carcinogenesis." *Br J Cancer* 59, no. 2 (1989): 210-6.
- Russo, I. H., and J. Russo. "Mammary Gland Neoplasia in Long-Term Rodent Studies." *Environ Health Perspect* 104, no. 9 (1996): 938-67.

- Russo, J., R. Moral, G. A. Balogh, D. Mailo, and I. H. Russo. "The Protective Role of Pregnancy in Breast Cancer." *Breast Cancer Res* 7, no. 3 (2005): 131-42.
- Russo, J., and I. H. Russo. "Biological and Molecular Bases of Mammary Carcinogenesis." *Lab Invest* 57, no. 2 (1987): 112-37.
- Saeed, M., and R. Mark. "A Novel Method for the Efficient Retrieval of Similar Multiparameter Physiologic Time Series Using Wavelet-Based Symbolic Representations." *AMIA Annu Symp Proc*, (2006): 679-83.
- Sagara, M., S. Yonezawa, K. Nagata, Y. Tezuka, S. Natsugoe, P. X. Xing, I. F. McKenzie, T. Aikou, and E. Sato. "Expression of Mucin 1 (Muc1) in Esophageal Squamous-Cell Carcinoma: Its Relationship with Prognosis." *Int J Cancer* 84, no. 3 (1999): 251-7.
- Sainio, K., and A. Raatikainen-Ahokas. "Mesonephric Kidney--a Stem Cell Factory?" *Int J Dev Biol* 43, no. 5 (1999): 435-9.
- Satoh, S., Y. Hinoda, T. Hayashi, M. D. Burdick, K. Imai, and M. A. Hollingsworth. "Enhancement of Metastatic Properties of Pancreatic Cancer Cells by Muc1 Gene Encoding an Anti-Adhesion Molecule." *Int J Cancer* 88, no. 4 (2000): 507-18.
- Schlessinger, J. "Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases." *Cell* 103, no. 2 (2000): 211-25.
- Schmittgen, T. D., and B. A. Zakrajsek. "Effect of Experimental Treatment on Housekeeping Gene Expression: Validation by Real-Time, Quantitative Rt-Pcr." *J Biochem Biophys Methods* 46, no. 1-2 (2000): 69-81.
- Schroeder, J. A., A. A. Masri, M. C. Adriance, J. C. Tessier, K. L. Kotlarczyk, M. C. Thompson, and S. J. Gendler. "Muc1 Overexpression Results in Mammary Gland Tumorigenesis and Prolonged Alveolar Differentiation." *Oncogene* 23, no. 34 (2004): 5739-47.

- Schroeder, J. A., M. C. Thompson, M. M. Gardner, and S. J. Gendler. "Transgenic Muc1 Interacts with Epidermal Growth Factor Receptor and Correlates with Mitogen-Activated Protein Kinase Activation in the Mouse Mammary Gland." *J Biol Chem* 276, no. 16 (2001): 13057-64.
- Schultz, J., R. R. Copley, T. Doerks, C. P. Ponting, and P. Bork. "Smart: A Web-Based Tool for the Study of Genetically Mobile Domains." *Nucleic Acids Res* 28, no. 1 (2000): 231-4.
- Schwientek, T., E. P. Bennett, C. Flores, J. Thacker, M. Hollmann, C. A. Reis, J. Behrens, U. Mandel, B. Keck, M. A. Schafer, K. Haselmann, R. Zubarev, P. Roepstorff, J. M. Burchell, J. Taylor-Papadimitriou, M. A. Hollingsworth, and H. Clausen. "Functional Conservation of Subfamilies of Putative Udp-N-Acetylgalactosamine:Polypeptide N-Acetylgalactosaminyltransferases in *Drosophila*, *Caenorhabditis Elegans*, and Mammals. One Subfamily Composed of L(2)35aa Is Essential in *Drosophila*." *J Biol Chem* 277, no. 25 (2002): 22623-38.
- Seregini, E., C. Botti, S. Massaron, C. Lombardo, A. Capobianco, A. Bogni, and E. Bombardieri. "Structure, Function and Gene Expression of Epithelial Mucins." *Tumori* 83, no. 3 (1997): 625-32.
- Sharma, RP. "Wingless to Wnt: Discovery of Conserved Cell Signalling Gene Family in the Animal Kingdom." *CURRENT SCIENCE* 104, no. 9 (2013): 1140-1141.
- Shen, Q., J. J. Rahn, J. Zhang, N. Gunasekera, X. Sun, A. R. Shaw, M. J. Hendzel, P. Hoffman, A. Bernier, and J. C. Hugh. "Muc1 Initiates Src-Crk1-Rac1/Cdc42-Mediated Actin Cytoskeletal Protrusive Motility after Ligating Intercellular Adhesion Molecule-1." *Mol Cancer Res* 6, no. 4 (2008): 555-67.
- Simon, S. I., Y. Hu, D. Vestweber, and C. W. Smith. "Neutrophil Tethering on E-Selectin Activates Beta 2 Integrin Binding to Icam-1 through a Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Transduction Pathway." *J Immunol* 164, no. 8 (2000): 4348-58.

- Singh, P. K., and M. A. Hollingsworth. "Cell Surface-Associated Mucins in Signal Transduction." *Trends Cell Biol* 16, no. 9 (2006): 467-76.
- Slomiany, B. L., and A. Slomiany. "Cytosolic Phospholipase A2 Activation in Helicobacter Pylori Lipopolysaccharide-Induced Interference with Gastric Mucin Synthesis." *IUBMB Life* 58, no. 4 (2006): 217-23.
- Smith, R. F., B. H. Stern, and A. A. Smith. "Mucin Immunohistochemistry in the Diagnosis and Mapping of Extramammary Paget's Disease." *J Cell Mol Med* 12, no. 5A (2008): 1605-10.
- Smolarek, D., A. Krop-Watorek, K. Wasniowska, and M. Czerwinski. "[Molecular Background of the Abo Blood Group System]." *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 62, (2008): 4-17.
- Sorensen, A. L., C. A. Reis, M. A. Tarp, U. Mandel, K. Ramachandran, V. Sankaranarayanan, T. Schwientek, R. Graham, J. Taylor-Papadimitriou, M. A. Hollingsworth, J. Burchell, and H. Clausen. "Chemoenzymatically Synthesized Multimeric Tn/Stn Muc1 Glycopeptides Elicit Cancer-Specific Anti-Muc1 Antibody Responses and Override Tolerance." *Glycobiology* 16, no. 2 (2006): 96-107.
- Spano, J. P., G. Milano, S. Vignot, and D. Khayat. "Potential Predictive Markers of Response to Egfr-Targeted Therapies in Colorectal Cancer." *Crit Rev Oncol Hematol* 66, no. 1 (2008): 21-30.
- Spicer, A. P., T. Duhig, B. S. Chilton, and S. J. Gendler. "Analysis of Mammalian Muc1 Genes Reveals Potential Functionally Important Domains." *Mamm Genome* 6, no. 12 (1995): 885-8.
- Spicer, A. P., G. Parry, S. Patton, and S. J. Gendler. "Molecular Cloning and Analysis of the Mouse Homologue of the Tumor-Associated Mucin, Muc1, Reveals Conservation of Potential O-Glycosylation Sites, Transmembrane, and Cytoplasmic Domains and a Loss of Minisatellite-Like Polymorphism." *J Biol Chem* 266, no. 23 (1991): 15099-109.

- Springer, G. F. "T and Tn, General Carcinoma Autoantigens." *Science* 224, no. 4654 (1984): 1198-206.
- Srinivasan, R., and W. W. Chang. "The Postnatal Development of the Submandibular Gland of the Mouse." *Cell Tissue Res* 198, no. 2 (1979): 363-71.
- St-Pierre, M. V., T. Stallmach, A. Freimoser Grundschober, J. F. Dufour, M. A. Serrano, J. J. Marin, Y. Sugiyama, and P. J. Meier. "Temporal Expression Profiles of Organic Anion Transport Proteins in Placenta and Fetal Liver of the Rat." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287, no. 6 (2004): R1505-16.
- Stanley, P., and C. J. Guidos. "Regulation of Notch Signaling During T- and B-Cell Development by O-Fucose Glycans." *Immunol Rev* 230, no. 1 (2009): 201-15.
- Strausberg, R. L., E. A. Feingold, L. H. Grouse, J. G. Derge, R. D. Klausner, F. S. Collins, L. Wagner, C. M. Shenmen, G. D. Schuler, S. F. Altschul, B. Zeeberg, K. H. Buetow, C. F. Schaefer, N. K. Bhat, R. F. Hopkins, H. Jordan, T. Moore, S. I. Max, J. Wang, F. Hsieh, L. Diatchenko, K. Marusina, A. A. Farmer, G. M. Rubin, L. Hong, M. Stapleton, M. B. Soares, M. F. Bonaldo, T. L. Casavant, T. E. Scheetz, M. J. Brownstein, T. B. Usdin, S. Toshiyuki, P. Carninci, C. Prange, S. S. Raha, N. A. Loquellano, G. J. Peters, R. D. Abramson, S. J. Mullahy, S. A. Bosak, P. J. McEwan, K. J. McKernan, J. A. Malek, P. H. Gunaratne, S. Richards, K. C. Worley, S. Hale, A. M. Garcia, L. J. Gay, S. W. Hulyk, D. K. Villalon, D. M. Muzny, E. J. Sodergren, X. Lu, R. A. Gibbs, J. Fahey, E. Helton, M. Kettelman, A. Madan, S. Rodrigues, A. Sanchez, M. Whiting, A. C. Young, Y. Shevchenko, G. G. Bouffard, R. W. Blakesley, J. W. Touchman, E. D. Green, M. C. Dickson, A. C. Rodriguez, J. Grimwood, J. Schmutz, R. M. Myers, Y. S. Butterfield, M. I. Krzywinski, U. Skalska, D. E. Smailus, A. Schnerch, J. E. Schein, S. J. Jones, and M. A. Marra. "Generation and Initial Analysis of More Than 15,000 Full-Length Human and Mouse Cdna Sequences." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, no. 26 (2002): 16899-903.
- Sun, A. P., Y. Ohtsuki, J. Fujita, T. Ishida, T. Yoshinouchi, and N. Kohno. "KI-6, a Human Muc1 Mucin, Is Expressed Early in Premature Lung." *Respir Med* 97, no. 8 (2003): 964-9.

- Taylor-Papadimitriou, J., J. Burchell, D. W. Miles, and M. Dalziel. "Muc1 and Cancer." *Biochim Biophys Acta* 1455, no. 2-3 (1999): 301-13.
- Temann, U. A., B. Prasad, M. W. Gallup, C. Basbaum, S. B. Ho, R. A. Flavell, and J. A. Rankin. "A Novel Role for Murine Il-4 in Vivo: Induction of Muc5ac Gene Expression and Mucin Hypersecretion." *Am J Respir Cell Mol Biol* 16, no. 4 (1997): 471-8.
- Ten Hagen, K. G., T. A. Fritz, and L. A. Tabak. "All in the Family: The Udp-Galnac:Polypeptide N-Acetylgalactosaminyltransferases." *Glycobiology* 13, no. 1 (2003): 1R-16R.
- Tenno, M., K. Ohtsubo, F. K. Hagen, D. Ditto, A. Zarbock, P. Schaerli, U. H. von Andrian, K. Ley, D. Le, L. A. Tabak, and J. D. Marth. "Initiation of Protein O Glycosylation by the Polypeptide Galnact-1 in Vascular Biology and Humoral Immunity." *Mol Cell Biol* 27, no. 24 (2007): 8783-96.
- Thathiah, A., and D. D. Carson. "Mt1-Mmp Mediates Muc1 Shedding Independent of Tace/Adam17." *Biochem J* 382, no. Pt 1 (2004): 363-73.
- Theiler, K. *The House Mouse: Atlas of Embryonic Development*. 8^o Edición ed.: Springer Verlag, New York, USA, 1989.
- Tian, E., M. P. Hoffman, and K. G. Ten Hagen. "O-Glycosylation Modulates Integrin and Fgf Signalling by Influencing the Secretion of Basement Membrane Components." *Nat Commun* 3, (2012): 869.
- Tian, E., and K. G. Ten Hagen. "Expression of the Udp-Galnac: Polypeptide N-Acetylgalactosaminyltransferase Family Is Spatially and Temporally Regulated During *Drosophila* Development." *Glycobiology* 16, no. 2 (2006): 83-95.

- Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. "Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications." *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, no. 9 (1979): 4350-4.
- Tran, D. T., and K. G. Ten Hagen. "Mucin-Type O-Glycosylation During Development." *J Biol Chem* 288, no. 10 (2013): 6921-9.
- Urban, S., J. R. Lee, and M. Freeman. "*Drosophila* Rhomboid-1 Defines a Family of Putative Intramembrane Serine Proteases." *Cell* 107, no. 2 (2001): 173-82.
- Van Klinken, BJ; Dekker, J; Büller, HA; Einerhand, AW. "Mucin Gene Structure and Expression: Protection Vs. Adhesion." *Am J Physiol* 269, no. 5 Pt 1 (1995): G613-27.
- Velcich, A., W. Yang, J. Heyer, A. Fragale, C. Nicholas, S. Viani, R. Kucherlapati, M. Lipkin, K. Yang, and L. Augenlicht. "Colorectal Cancer in Mice Genetically Deficient in the Mucin Muc2." *Science* 295, no. 5560 (2002): 1726-9.
- Vos, H. L., Y. de Vries, and J. Hilkens. "The Mouse Episialin (Muc1) Gene and Its Promoter: Rapid Evolution of the Repetitive Domain in the Protein." *Biochem Biophys Res Commun* 181, no. 1 (1991): 121-30.
- Walsh, M. D., M. A. McGuckin, P. L. Devine, B. G. Hohn, and R. G. Wright. "Expression of Muc2 Epithelial Mucin in Breast Carcinoma." *J Clin Pathol* 46, no. 10 (1993): 922-5.
- Wang, C., C. Huang, Y. Gu, Y. Zhou, Z. Zhu, and Y. Zhang. "Biosynthesis and Distribution of Lewis X- and Lewis Y-Containing Glycoproteins in the Murine Male Reproductive System." *Glycobiology* 21, no. 2 (2011): 225-34.
- Wang, S. T., J. J. Liu, C. Z. Wang, B. Lin, Y. Y. Hao, Y. F. Wang, S. Gao, Y. Qi, S. L. Zhang, and M. Iwamori. "Expression and Correlation of Lewis Y Antigen and Tgf-Beta1 in Ovarian Epithelial Carcinoma." *Oncol Rep* 27, no. 4 (2012): 1065-71.

- Wang, Y., X. Guan, K. L. Fok, S. Li, X. Zhang, S. Miao, S. Zong, S. S. Koide, H. C. Chan, and L. Wang. "A Novel Member of the Rhomboid Family, Rhbdd1, Regulates Bik-Mediated Apoptosis." *Cell Mol Life Sci* 65, no. 23 (2008): 3822-9.
- Warburton, D., M. Schwarz, D. Tefft, G. Flores-Delgado, K. D. Anderson, and W. V. Cardoso. "The Molecular Basis of Lung Morphogenesis." *Mech Dev* 92, no. 1 (2000): 55-81.
- Weiss, A. A., M. W. Babyatsky, S. Ogata, A. Chen, and S. H. Itzkowitz. "Expression of Muc2 and Muc3 Mrna in Human Normal, Malignant, and Inflammatory Intestinal Tissues." *J Histochem Cytochem* 44, no. 10 (1996): 1161-6.
- Weisstein, E. W., "Correlation Coefficient" <http://mathworld.wolfram.com>.
- Wen, Y., T. C. Caffrey, M. J. Wheelock, K. R. Johnson, and M. A. Hollingsworth. "Nuclear Association of the Cytoplasmic Tail of Muc1 and Beta-Catenin." *J Biol Chem* 278, no. 39 (2003): 38029-39.
- Witschi, E. "Development: Rat." In *Growth Including Reproduction and Morphological Development*, 304-314: ed. Fed. Am. Soc. Exp. Biol., Washington DC, 1962.
- Yamamoto, M., A. Bharti, Y. Li, and D. Kufe. "Interaction of the Df3/Muc1 Breast Carcinoma-Associated Antigen and Beta-Catenin in Cell Adhesion." *J Biol Chem* 272, no. 19 (1997): 12492-4.
- Yoshii, N., S. Kitajima, S. Yonezawa, S. Matsukita, M. Setoyama, and T. Kanzaki. "Expression of Mucin Core Proteins in Extramammary Paget's Disease." *Pathol Int* 52, no. 5-6 (2002): 390-9.
- Yu, L. G. "The Oncofetal Thomsen-Friedenreich Carbohydrate Antigen in Cancer Progression." *Glycoconj J* 24, no. 8 (2007): 411-20.

- Zeder-Lutz, G., N. Cherouati, C. Reinhart, F. Pattus, and R. Wagner. "Dot-Blot Immunodetection as a Versatile and High-Throughput Assay to Evaluate Recombinant Gpcrs Produced in the Yeast *Pichia Pastoris*." *Protein Expr Purif* 50, no. 1 (2006): 118-27.
- Zhang, J., M. Yasin, C. A. Carraway, and K. L. Carraway. "Muc4 Expression and Localization in Gastrointestinal Tract and Skin of Human Embryos." *Tissue Cell* 38, no. 4 (2006): 271-5.
- Zotter, S., P. C. Hageman, A. Lossnitzer, J. van den Tweel, J. Hilkens, W. J. Mooi, and J. Hilgers. "Monoclonal Antibodies to Epithelial Sialomucins Recognize Epitopes at Different Cellular Sites in Adenolymphomas of the Parotid Gland." *Int J Cancer Suppl* 3, (1988): 38-44.
- Zou, H., S. M. Thomas, Z. W. Yan, J. R. Grandis, A. Vogt, and L. Y. Li. "Human Rhomboid Family-1 Gene *Rhbdf1* Participates in Gpcr-Mediated Transactivation of Egfr Growth Signals in Head and Neck Squamous Cancer Cells." *FASEB J* 23, no. 2 (2009): 425-32.