

# SUPPORTUL FACTORILOR MOLECULARI ÎN DEZVOLTAREA GLANDEI MAMARE

\*Rudico L.<sup>1,2</sup>, Fulga V.<sup>1,2</sup>, Mazuru O.<sup>2</sup>, Mazuru V.<sup>2</sup>, David V.<sup>1,2</sup>, Șaptefrați L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Catedra histologie, citologie și embriologie, <sup>2</sup>Labortorul Morfologie  
Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova

\*Corresponding author: lucian.rudico@usmf.md

## Abstract

### SUPPORTING MOLECULAR FACTORS OF MAMMARY GLAND DEVELOPMENT

**Background:** The first distinctive feature in the development of mammary glands is the apparition of milk lines that is followed by the formation of 5 pairs of the placodes, which outgrowths to form mammary buds. Later, the buds give rise tubular branched structures. These structures represent the primordial of lactiferous ducts, which from 18<sup>th</sup> day of embryonic development stop to differentiate until the puberty. The major events that occur during the breast development are strongly connected to cyclic hormonal modifications in pregnancy, lactation and menopause.

At the puberty occurs the branching of ductal excretory system – a process controlled by a broad spectrum of molecular factors. These are the hormones, growth factors, matrix active substances, metalloproteinases (MMP), and the components of immune system. The aim was to highlight the molecular factors involved in the control of mammary gland development at different embryonic and post-natal stages.

**Conclusions:** Molecular factors, involved in mammary development have diverse pathways and origin. Sophisticated interactions of these factors determine step-like development and permanent rearrangement of the gland. Any disturbance within these signaling pathways may lead to appearance of different pathologies: from morphological abnormalities to malignancies. As a result, understanding of these mechanisms represents a theoretical basis necessary to elaborate a new strategy of diagnosis and therapeutic management of breast carcinoma.

**Key words:** Molecular factors, mammary development, growth factor, hormone.

## Dezvoltarea embrionară a glandei mamare

Prima trăsătură distinctă în aprecierea începutului diferențierii primordiilor mamare, este apariția caii lactee la nivelul ectodermului, care este urmată de formarea a cinci perechi de placode ce se invaginează pentru a forma muguri.

Ulterior la nivelul mugurilor, apar structuri tubulare ramificate. Aceste structuri reprezintă primordiile ducturilor lactifere, care începând cu ziua a 18 embrionară, își sistează diferențierea, până la pubertate. Liniile mamare sunt vizibile începând cu ziua a 10 embrionară (E10), la exonenții ambelor sexe. Acestea reprezintă două creste, formate ca rezultat al proliferării celulare mai intense în această zonă a ectodermului, urmată de protruzia celulelor spre versantul extern al acestuia. Ulterior urmează migrarea lor de-a lungul căii lactee, pentru a forma niște colecții celulare numite placode. În E11, la nivelul placodelor, se expresează PTHrP; sau PTHLH (Parathyroid hormone-related protein), factorul de creștere al fibroblastelor 10 (FGF10) și deasemenea *BMP4* (bone morphogenetic protein 4).

Recentele studii dedicate unor exponenți structurali ai primotorilor *BMP4*, cum ar fi proteina *lacZ*, au confirmat expresia *BMP4* la nivelul primordiilor epiteliale mamare, și a mezenchimului, între E11.5 și E14.5[1].

La E11.5, cinci perechi de placode mamare, poziționate simetric formează așa numita, zonă reproductivă. Necătfind la faptul apariției și poziționării lor simultane în acest loc, placodele nu sunt identic determinate spre o ulterioară dezvoltare. Pentru fiecare pereche de placode există semnale special predefinite, ce sunt capabile să controleze dezvoltarea lor, în funcție de specie.

Este de specificat, că la om, primele încep să iasă în evidență perechile 1 și 5, după care urmează 3 și 4, ultimele fiind perechea a 2-a. Este interesant faptul, că cele din urmă, conțin populații de celule care expresează *WNT10b* (wingless gene). Se cunoaște deja, că absența placodelor ar fi provocată de pierderea unui fragment (*xt*), din gena *GLI3*(*Gli3xt/xt*), determinând apariția *amastiei* [2].

Absența genei *TBX3*, conduce spre dezvoltarea hipoplaziei glandelor mamare concomitent cu absența mamelonului [3]. Gena *SKA* (Scaramanga), este asociată cu fenomenul glandelor mamare supranumerare, sau deplasate, datorită poziționării aberante a mugurilor mamari [4].

Această genă, mai târziu a fost identificată, ca genă codificatoare a neuregulinei 3(NRG3), care re-

prezintă ligandul receptorului tirozin-kinazic ErbB4 (HER4) [5]. După cum am afirmat mai sus, inițierea procesului de formare a mugurilor mamari este controlat prin intermediul mai multor cai de semnalizare, cu participarea diferitor factori moleculari.

O nouă cale de semnalizare a fost recent acceptată în dezvoltarea embrionară timpurie a glandei mamare, și anume cea ce se desfășoară prin intermediul factorului GATA3 (factor de transcripție, care controlează diferențierea T-limfocitelor, în răspunsul inflamator). Aceasta s-a demonstrat prin eliminarea condiționată a GATA3 din placode, folosind promotorul cheratinei 14 (*Krt14*), ceea ce a dus la dispariția placodelor, și la un eșec al dezvoltării tecii mamelonului [6]. Interacțiunea dintre BMP4 și T-box3 (gena responsabilă de apariția sindromului ulnar-mamar, caracterizat prin defect de structură a oaselor ulnare asociat cu hipoplazia glandelor mamare), la nivelul limitei dintre partea dorsală și cea ventrală a embrionului, duc la inițierea formării mugurilor mamari [7].

Începând cu E13, mugurii epiteliali pot fi observați ca și structuri morfologice distincte, iar la E14 aceștia se invaginează în mezenchimul subiacent. Expresia dickkopf 1, ce reprezintă un inhibitor al semnalului WNT, sub controlul promotorului *Krt14*, poate abolii formarea mugurilor mamari [8], iar activarea receptorilor de androgen, duc la degenerarea și dispariția lor către E 15.

La aceasta vârsta embrionară, la exponenții de sex feminin, fiecare mugure începe să se elongheze pentru a forma *cordoane* epiteliale care invadează site-ul de localizare în viitor, al țesutului adipos, în limitele căruia va avea loc dezvoltarea cordoanelor epiteliale după naștere. Sub influența PTHrP, celulele mezenchimale din regiune, se condensează, căpătând un aspect morfologic specific [9], care este esențial pentru perspectivele dezvoltării ulterioare a țesutului epitelial. PTHrP este la fel de important și în formarea plăcii mamelonare, iar supraexpresia acestuia în cheratinocitele bazale, inhibă conversia cordonului epitelial în folicul pilos [9].

În jurul E16, cordoanele mamare încep să se ramifice într-un număr mic de ducturi, iar către E18 poate fi apreciat aspectul lor ramificat, format din 10-15 ramuri fine.

Materialul plastic și energetic necesar diferențierii și creșterii celulare se recrutează de la nivelul mezenchimului adiacent. Aceste fenomene sunt reglate în special de factorii moleculari, descriși mai sus, BMP4 și PTHrP, interacțiunea cărora este una de potențare reciprocă.

### **Factorii moleculari declanșatori ai remodelării structurii glandei mamare în perioada embrionară**

La pubertate are loc procesul de ramificare a ducturilor mamari, ce este controlat de o gamă largă de factori, care pot fi expresați atât în stromă, cât și în epiteliu. Aceștia sunt hormonii și factorii de creștere, factorii moleculari produși de elementele matricei extracelulare, metaloproteaze, elementele sistemului imun [10].

În prima săptămână după naștere, creșterea arborelui mamar, este comensurabilă cu, creșterea corpului (creștere alometrică). Mugurii terminali, care sunt formați dintr-un strat de celule extern și un miez intern stratificat numit corporal, invadează hipodermul subareolar.

Creșterea alometrică a glandei mamare are loc atâta timp, până crește nivelul seric de estrogeni. Ca și consecință a acțiunii estrogenilor este proliferarea, la nivelul mugurilor terminali și elongarea tubilor. Din proliferarea celulelor la nivelul mugurilor terminali rezultă despicarea lor și generarea ramificațiilor, iar formarea lumenului tubular, se datorează apoptozei celulare [11].

De la vârsta de 10-12 săptămâni de viață, mugurii terminali încep să dispară, limita inferioară a hipodermului este atinsă și creșterea încetează. De menționat faptul că elongarea ductală și ramificarea postnatală a acestora, în mare măsură se explică prin exprimarea la acest nivel a GATA3. Eliminarea acestui factor din domeniul activității lui, duce la stoparea dezvoltării post natale a glandei mamare [12].

Mai mult, gradul de expresie a acestui factor, este direct proporțional cu exprimarea  $\alpha$ - receptorilor de estrogeni ( $\alpha$ -ER, cunoscut și sub denumirea de ESR1), din celulele  $\alpha$ -ER- pozitive, ceea ce ne sugerează implicarea GATA3 în mecanismele moleculare ER dependente din celulele epitelului tubular.

Ultimele studii [13] au identificat implicarea FOXA1 (factor molecular ce asigură legarea ER de site-ul specific de cromatină), ca și un component al rețelei de reglare a GATA3. Este vorba despre prezența unui site de legare pe FOXA1 pentru GATA3 și interacțiunea complexului FOXA1-  $\alpha$ -ER cu cromatina. Deci, FOXA1 reprezintă un factor ce mediază *Cross-talk*, interacțiunea dintre GATA3 și  $\alpha$ -ER.

Estrogenul posedă doi receptori ESR1(ER- $\alpha$ ) și ESR2(ER- $\beta$ ). ESR1 reprezintă un receptor specific glandei mamare fiind implicat activ în dezvoltarea ei, pe când omologul său este mai bine exprimat în alte organe (colon, uter, prostată) și impact foarte modest asupra metabolismului mamar [15] Respectiv, expresia ESR1, la diferite etape de dezvoltare a glandei mamare, demonstrează implicarea indubitabilă a estrogenului în toate perioadele dezvoltării parenchimului glandular, după cum urmează: prepubertară, pubertară, sarcina, lactația. În perioada copilăriei ducturile sunt reprezentate de niște cordoane epiteliale fără lumen, (dormande) care odată cu pubertatea, sub influența estrogenului și progesteronului, încep să-și modifice aspectul morfologic.

Unul din aspecte îl reprezintă formarea lumenului ductal. În cazul ductelor mamare, formarea lumenului este o îmbinare armonioasă dintre proliferarea și apoptoza celulară. Celulele situate în centrul cordonului sunt comitate spre apoptoza și eliminate, astfel constituindu-se un spațiu limitat de un bistrat de celule: bazal, cu celule B și celule mioepiteliale și cel luminal, cu celule A.

Apoptoza este controlată de factori celulari endogeni, cum ar fi proteina BCL2, ce reprezintă un factor anti-apoptotic.

Acțiunea BCL2, se desfășoară în citoplasma prin disocierea complexului casapaza9 milk-fat-globulune-EGFR8, ce preîntâmpină activarea caspazei3, și respectiv induce apoptoza celulară. S-a demonstrat că pe perioada procesului de lumenogeneză, expresia BCL2 în celulele cu sediul în centrul cordoanelor epiteliale, este minimă.

### **Profilul molecular al glandei mamare în perioada reproductivă**

În sarcină glanda mamară trebuie să capete un nou aspect morfologic, care ar asigura lactația. De aceea apar celule secretorii, capabile să producă și secrete cantități mari de lapte, sub influența progesteronului ( induce intensiv tubulo-alveologeneza), în combinație cu PRL (prolactina). Absența PGR (receptorul pentru progesteron) este echivalentă cu absența tubulo-alveologenezei [15].

Celulele alveolare luminale pot sau nu exprima ER, dar e de specificat că în mod normal celulele ER+, au o rată de proliferare minimă, ceea ce este cu desăvârșire invers în carcinoamele mamare. Funcția progesteronului, deasemenea este mediată de diferiți factori moleculari, cum ar fi calea semnalizării WNT. De obicei această cale necesită prezența  $\beta$ -cateninei, iar supresia acesteia, duce la afectarea dezvoltării alveolare, ceea ce confirmă o dată în plus importanța lor (Cross-talk) pe parcursul sarcinii [15].

La această concluzie s-a ajuns folosind modelele animale, și anume s-a studiat funcția  $\beta$ -cateninei pe fonul deficienței PR[15]. Studiul receptorilor de progesteron a scos în lumină doi izomeri (PGR1A and PGR1B) codificați de o singură genă, fapt ce a complicat pentru un timp maniera de înțelegere și interpretare a funcției lor. Ulterior s-a constatat similaritatea acestora, cu excepția restului adițional 164 n-terminal pe PGR1B, astfel stabilindu-se heterogenitatea moleculelor, precum și distribuția lor neuniformă la nivelul organelor reproductivă. Pentru a scoate în evidență importanța funcțională a fiecărui receptor, s-a recurs la *knock out*-ul succesiv a fiecăruia din ei (pe modele experimentale de șoareci).

S-a determinat că pierderea PGR1A în glanda mamară, nu are repercusiuni fenotipice, pe când *knock out*-ul PGR1B se exprimă prin reducerea semnificativă a ramificării laterale în alveologeneză pe parcursul sarcinii. Aceste date delimitează importanța unilaterală a PGR1B în asigurarea controlului hormonal al glandei mamare pe parcursul perioadei reproductivă. Mai mult, celulele de la capetele distale ale ductelor lactifere, răspund diferit la stimularea progesteronică, comparativ cu cele de pe traiectul lor. Dezvoltarea precoce ale alveolelor la capetele ductelor, a fost observată ca răspuns a expresiei  $\beta$ -cateninei, în absența PR.

Astfel s-a ajuns la concluzia că deși expresia  $\beta$ -cateninei este dependentă de cantitatea PR pe parcursul ductelor lactifere, la joncțiunea ducto-alveolară, ultimul nu este necesar. Paradigma dominantă conform căreia, hormonii steroizi și PRL sunt principalii factori de reglare temporară a diferențierii glandei mamare [16], a oferit posibilitatea de a se demonstra existența căilor alternative de semnalizare moleculară asociate limfocitelor Th, [12, 13, 17] precum și aportul acestor factori la constituirea arhitecturii mamare.

## Concluzii

Factorii moleculari ce determină dezvoltarea glandei mamare sunt diverși ca și mecanism de acțiune dar și ca proveniență. Impactul lor asupra dezvoltării, și reorganizării permanente a glandei mamare, se exteriorizează fenotipic prin stricta delimitare stadiată.

Fiecare etapă este ghidată și monitorizată de interacțiunea armonioasă a căilor de control molecular. Apariția expresiei suprapuse a receptorilor hormonală este un fenomen specific tumorigenezei mamare, iar raportul cantitativ al acestora determină apariția diferitor fenotipuri moleculare de carcinom mamar.

Este cert și faptul că expresia receptorilor hormonală este mediată pe căi paracrine, prin intermediul unor liganzi, mecanismele de stimulare ale cărora depășesc căile de semnalizare moleculară obișnuite.

Cunoașterea acestor aspecte reprezintă suportul teoretic necesar conturării unor noi strategii în diagnosticul, pronosticul și managementul terapiei carcinomului mamar.

## Bibliografie

1. Hens, J. R., Dann, P., Zhang, J. P., et.al. (2007). BMP4 and PTHrP interact to stimulate ductal outgrowth during embryonic mammary development and to inhibit hair follicle induction. *Development* 134, 1221-1230.
2. Veltmaat, J. M., Maillieu, A. A., Thiery, et.al. (2003). Mouse embryonic mammary development as a model for the molecular regulation of pattern formation. *Differentiation* 71, 1-17.
3. Eblaghie, M. C., Song, S. J., Kim, J. Y., et.al. (2004). Interactions between FGF and Wnt signals and Tbx3 gene expression in mammary gland initiation in mouse embryos. *J. Anat.* 205, 1-13.
4. Howard, B. A. and Gusterson, B. (2000). The characterization of a mouse mutant that displays abnormal mammary gland development. *Mamm. Genome* 11, 234-237
5. Howard, B., Panchal, H., McCarthy, et.al. (2005). Identification of the scaramanga gene implicates Neuregulin3 in mammary gland specification. *Genes Dev.* 19, 2078-2090.
6. M., Forrest, N. C., Hartley, L., Robb, et al. (2007). Gata-3 is an essential regulator of mammary-gland morphogenesis and luminal-cell differentiation. *Nat. Cell Biol.* 9, 201-209.
7. Cho, K. W., Kim, J.-Y., Song, S.-J., Farrell, et.al. (2006). Molecular interactions between Tbx3 and Bmp4 and a model for dorsoventral positioning of mammary gland development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 16788-16793.
8. Chu, E. Y., Hens, J., Andl, T., Kairo, et.al. (2004). Canonical WNT signaling promotes mammary placode development and is essential for the initiation of mammary gland morphogenesis. *Development* 131, 4819-4829.
9. Foley, J., Dann, P., Hong, J., Cosgrove, J., et.al. (2001). Parathyroid hormone-related protein maintains mammary epithelial fate and triggers nipple skin differentiation during embryonic breast development. *Development* 128, 513-525.
10. Sternlicht, M. D., Kouros-Mehr, Werb Z. et.al. (2006). Hormonal and local control of mammary branching morphogenesis. *Differentiation* 74, 365-381.
11. Humphreys, R. C., Krajewska, M., Krnacik, et.al. (1996). Apoptosis in the terminal endbud of the murine mammary gland: a mechanism of ductal morphogenesis. *Development* 122, 4013-4022.
12. Asselin-Labat, Sutherland K. D., Thomas R., et al. (2007). Gata-3 is an essential regulator of mammary-gland morphogenesis and luminal-cell differentiation. *Nat. Cell Biol.* 9, 201-209.
13. Kouros-Mehr H., Slorach E. M., Sternlicht., et.al. (2006). GATA-3 maintains the differentiation of the luminal cell fate in the mammary gland. *Cell* 127, 1041-1055.
14. Bocchinfuso W. P., Lindzey J. K., Hewitt, S. C., et.al. (2000). Induction of mammary gland development in estrogen receptor- knockout mice. *Endocrinology* 141, 2982-2994.
15. Brisken C., Park S., Vass, T., et.al. (1998). A paracrine role for the epithelial progesterone receptor in mammary gland development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 5076-5081.
16. Hiremath M., Lydon, J. P., Cowin, P. et.al. (2007). The pattern of catenin responsiveness within the mammary gland is regulated by progesterone receptor. *Development* 134, 3703-3712.
17. Hennighausen L. and Robinson, G. W. (2005). Information networks in the mammary gland. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 715-725.
18. Khaled W. T., Read E. K. C., Nicholson S. E., et.al. (2007). The IL-4/IL-13/Stat6 signalling pathway promotes luminal mammary epithelial cell development. *Development* 134, 2739-2750.