

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

PAPEL REGULADOR DE LA ENZIMA XANTINA OXIDASA
EN EL PROCESO APOPTÓTICO. ESTUDIO EN GLÁNDULA
MAMARIA DE RATA

ARIANA DIANA RUS

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2005

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 22 de Setembre de 2005 davant un tribunal format per:

- D. Juan Viña Ribes
- D. Giuseppe Poli
- D. Antonio Pellín Pérez
- D. Máximo Vento Torres
- D. Juan Sastre Belloch

Va ser dirigida per:

D. Federico V. Pallardó Calatayud

D. José Viña Ribes

©Copyright: Servei de Publicacions
Ariana Diana Rus

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-6380-9

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115

VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA



**PAPEL REGULADOR DE LA ENZIMA XANTINA
OXIDASA EN EL PROCESO APOPTOTICO.
ESTUDIO EN GLANDULA MAMARIA DE RATA.**

TESIS DOCTORAL presentada para la obtención del
grado de Doctora en Medicina por
Dña. ARIANA DIANA RUS.

AÑO 2005



FACULTAD DE MEDICINA Y
ODONTOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

Prof. Dr. Federico V. Pallardó Calatayud, Catedrático del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

Prof. Dr. José Viña Ribes, Catedrático del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

CERTIFICAN:

Que Dña. Ariana Diana Rus, Licenciada en Medicina y Licenciada en Farmacia, por la Universidad "Iuliu Hatieganu" Cluj-Napoca (Rumania), ha realizado bajo su dirección la presente tesis titulada.

**“PAPEL REGULADOR DE LA ENZIMA XANTINA
OXIDASA EN EL PROCESO APOPTOTICO. ESTUDIO
EN GLANDULA MAMARIA DE RATA”**

para la obtención del título de Doctora en Medicina.

Y para que conste a los efectos oportunos, firman la presente certificación.

Valencia, a 13 de Junio de 2005

Fdo. Prof. D. Federico V. Pallardó Calatayud

Fdo. Prof. D. José Viña Ribes

A MI MADRE

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mis directores:

*Al **Prof. Federico Pallardó** por todo su apoyo durante estos años de trabajo.*

Sin ti, Fede, esta tesis no hubiera existido. Fuiste el primero que me aceptó en vuestro grupo de investigación. El que, con solo una tesis y un libro, has sabido abrirme el mundo magnífico de la investigación. Siempre has encontrado la clave de mis dificultades; me has entregado tu confianza enseñándome el camino que hay desde laboratorio hacia el mundo. He tenido la enorme suerte de tener un jefe como tú, tan querido por los demás: colaboradores, becarios y alumnos. Doy Gracias a Dios, por haber tenido siempre a mi lado, en todos momentos, a una GRAN PERSONA con un enorme corazón y con alma generosa por lo cual te estaré siempre agradecida.

*Al **Prof. José Viña** por toda su confianza y el ánimo que me ha transmitido durante estos años de investigación.*

Detrás de la exigencia y la rigurosidad en todos los trabajos han estado tus consejos, el cariño y tu apoyo. Ahora sé que el truco para seguir adelante, están la chispa, en saber organizar mis pensamientos y en el saber, de verdad, lo que quiero. Junto al respeto y la admiración que te profeso, recibe mi enorme agradecimiento.

Gracias a todos vosotros:

*A **Prof. Juan Sastre** por toda su amabilidad y sus consejos experimentales en todos los momentos.*

De ti he aprendido que, si de verdad crees y lo quieres, hay que luchar. La clave es el trabajo y la perseverancia. ¡Gracias Juan!

*A **Juan** por ser mi “enchufe” en este departamento. Fuiste el primero que me conociste y confiaste en mis fuerzas. Ha sido un verdadero placer continuar el trabajo de tu tesis y una enorme satisfacción encontrar en nuestro modelo una clave de la vida.*

*A **Javi** por ser mi primer profe en laboratorio. Gracias a ti han desaparecido de mi el miedo a las pipetas y a los tan complicados aparados de laboratorio. A tu lado he ganado experiencia y trucos del trabajo, pero, lo que para mi ha tenido un valor*

inestimable fue el hecho de que estuvieras a mi lado ante cualquier duda y para darme consejo. Entre los radicales libres que tanto estudiamos he descubierto uno, el de la amistad y que siempre nos va a unir: O₃.

*A **Mari Carmen** por ser un ejemplo y mi amiga. Los éxitos requieren horas y horas de entrenamiento y esfuerzo, pero la clave esta en nosotros mismos. ¡Gracias a una Gran Campeona por estar a mi lado en todos los momentos!*

*A **Rafa**. Empecé contigo los primeros experimentos de Xantina Oxidasa, y después el libro de gran valor fue tu tesis, pero lo que no tiene precio es tu confianza y tu amistad. ¡Gracias Rafa, por entenderme tantas veces!*

*A **Juanito** por aguantarme y animarme, por toda tu amistad. Gracias por compartir conmigo cada milímetro cuadrado de nuestra mesa, que siempre va a necesitar un arreglo. Gracias por todos los momentos de laboratorio en cuales tú presencia daba vida y mucha alegría (hasta tus mosquitos vivían más al ponerles la canción no.4). ¡Gracias, mi querido Juanito!*

*A **Pain** por ser como eres. Una gran persona y compañera, una gran profesional. Gracias por ayudarme en mis experimentos, por tu bondad y por tener tanta paciencia conmigo sin enfadarte ni “una” sola vez!*

*A **Juana Belloch** con cual empecé los primeros experimentos. Una persona a la cual la recordaré siempre con mucho respeto.*

*A **Marilyn** por los buenos consejos, por entenderme tantas veces, sea en inglés o en castellano.*

*A **Chelo** por tu apoyo y el cariño que me diste. Fue un placer trabajar a tu lado y me hizo gran ilusión ser la compañera de una futura ministra. ¡Gracias y te deseo lo mejor!*

*A **Ana** por tus consejos. Un enorme corazón dentro de una gran persona que sabe luchar en la vida. Esta será la imagen que me llevaré de ti para el resto de mi vida. ¡Gracias!*

*A **Lele** por tu animo sincero y tu sonrisa; por tu alegría que me ha contagiado muchas veces. ¡¡¡Animo!!!, dentro de nada serás la futura doctora!*

*A **Marco, Nancy y Alessandro** por todos los bonitos momentos compartidos en el laboratorio, por vuestro compañerismo. ¡Os deseo, mucha suerte!*

*A **JuanBa , Julián , Ángel y Juan** por sus presencias y ayuda incondicional. Por compartir tantos momentos agradables dentro y fuera de laboratorio.*

*A **Soraya y Luis** por la colaboración y los bonitos momentos compartidos en nuestra condición de profes durante la docencia.*

*A **Maria, Amparo, Carolina, Andrea, Laia, Alfonso, Salva, Jessica, Eduardo** por sus compañerismo.*

*A los miembros del Departamento de Bioquímica, y muy especialmente al **Prof. Juan Viña**, por haberme permitido trabajar en su laboratorio, por todo el ánimo y las bonitas palabras que ha tenido para mí durante todo este tiempo. A **Rosa** y **Concha**, con quienes he sufrido todos los resultados experimentales de las electroforesis. Por toda vuestra colaboración. ¡Muchas Gracias!*

*Al **Prof. Guillermo Sáez** y al **Prof. Enrique O'Connor** y sus colaboradores, por su amable colaboración.*

*Al **Prof. Antonio Pellin** por su amabilidad conmigo al aceptar que realizara en el Departamento de Patología la parte de microscopía de mi tesis.*

*Al **Prof. Miquel Pérez** y a **José** por enseñarme y por sufrir a mi lado a la hora de contar todas las células apoptóticas.*

*A **Prof. Esperanza Martín de Aquilera** y al **Prof. Andrés Iruzun** por vuestro apoyo en preparar mis clases durante los años de docencia. Gracias por todo vuestro cariño y por ser unas maravillosas personas.*

*Al **Prof. Luis Such** y **Prof. Antonio Alberola**, a **Luis** e **Isabel** por todo el afecto demostrado.*

*A **Asun, Consuelo, Ruth** y **Vicente** por vuestra ayuda. Todos los resultados de esta tesis tienen como base de la pirámide las horas y el devotamente de vuestro trabajo diario. ¡Gracias!*

*A **Elenita**. Hay muchos espejos que tenemos que cambiar en el departamento, pero yo voy a cuidar con mucho cariño el que refleja todo el cariño y la belleza de tu alma. ¡Gracias por toda la ayuda durante estos años de papeleos!*

*A **Eva**. ¿Como voy a ganar el sorteo de EE.UU. si la suerte me “redondea” todos los días, por tenerte al lado, con toda tu paciencia y tu enorme amabilidad? ¡Gracias por aguantarme!*

*A **Elena**. Un ejemplo de organización y perfección. ¡Gracias!*

*A **Inma** por la sonrisa de cada mañana.*

Al resto de miembros del Departamento de Fisiología.

*Al **Prof. Giuseppe Poli** por su nobleza y su gentileza, por permitir mi estancia en su grupo de investigación en el Dipartimento Di Scienze Cliniche e Biologiche, de la Universidad de Torino. Italia. Una estancia con la que se ha cumplido un sueño que*

tenía desde pequeña. Allí he encontrado una nueva casa, con el cariño y con la amistad de toda la gente: **Gabriela, Barbara, Cinzia, Maria, Paola, Teresa, Giulia, Laura, Barbara, Fany y Marco**. Pero “El Sol” que me ha cuidado y me ha iluminado todo mi trabajo fue la **Prof. Fiorella Biasi**. ¡Grazie mille a tutti!

A **Gaetano** por hacerme entender que siempre hay un “el porqué”, con el cual, mis experimentos han seguido adelante. ¡Grazie Dottore!

A mis amigos: **Mihaela, Marie-Denise, Calin, Lumi, Radu, Lorena, Teo, Helene y Quique**, que habéis compartido conmigo de cerca o de lejos, los momentos de mi vida durante todo este tiempo.

A **Isabel y Alfredo** que siempre habéis tenido una palabra de cariño y apoyo, una puerta siempre abierta a toda mi familia. ¡Gracias!

A **Felicia** por ser una fantástica persona y una gran amiga.

A **Mario** por su profesionalidad, por todo el apoyo y su gran disponibilidad en los momentos más difíciles. ¡GRACIAS DE TODO EL CORAZÓN!

A **Vicente**. A mis reiterados agradecimientos, ahora al final, uno más: ¡GRACIAS POR TODO!

A **Esperanza y Juan** por todo que habéis hecho y estáis haciendo por mí. Por todo vuestro cariño, por sentirme siempre un miembro de vuestra familia. Durante todos estos años me habéis animado y levantado la cabeza; me habéis hecho mirar adelante con toda la esperanza y la alegría; me habéis convencido que el sol sale también para mí, en esta bonita Valencia. ¡MUCHISIMAS GRACIAS!

A mi familia

A mi hermano **Ovidiu** por ser como es, un enorme corazón y un gran luchador. ¡MIL GRACIAS por estar siempre a mi lado!

A **mi padre** por sentirlo en todos los momentos a mi lado. Seguro hubiera estado muy orgulloso en estos momentos. El siempre está en mi alma y todo lo hago en su memoria.

*A **mi madre** por ser la madre más maravillosa del mundo. Con esta tesis se cumple otro sueño...el tuyo, por eso te la dedico a tí. Todo el mérito es tuyo, por cuidarme, educarme y estar siempre a mi lado, por ser una fuente inestimable de cariño y fuerza.
¡GRACIAS POR EXISTIR!*

*El último AGRADECIMIENTO es para mi hijo **Andrei**. El que ha entendido siempre que tenía que estudiar, y así, a la vez, su tiempo se reducía. El que ha estado conmigo horas y horas en laboratorio tantos fines de semana; el que, llenando cajas de puntas por la noche me preguntaba: “¿Mamá quién ha inventado la mitocondria?; ¿Y tú, por qué estás buscando algo que no existe?”*

Sin él, sin su sonrisa y sin sus caricias, mi vida hubiera sido un infierno durante todo este tiempo. ¡GRACIAS MI ALMA!

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	1-134
---------------------	--------------

I. APOPTOSIS

1. Generalidades.....	1-10
1.1. Definición.....	1
1.2. Historia.....	1
1.3. Diferencias entre apoptosis y necrosis.....	3
1.4. Aspectos morfológicos y bioquímicos de la apoptosis...4	
1.4.1. Fase de iniciación.....	4
1.4.1.1 Mecanismo extrínseco.....	5
1.4.1.2 Mecanismo intrínseco.....	8
1.4.2. Fase efectora.....	8
1.4.3. Fase de degradación.....	10
2. Regulación de la apoptosis.....	14
2.1. Caspasas.....	15-20
2.1.1. Generalidades.....	15
2.1.2. Estructura de las caspasas.....	15
2.1.3. Clasificación de las caspasas.....	17
2.1.4. Síntesis y activación de las caspasas.....	17
2.1.5. Sustratos de acción de las caspasas.....	20
2.2. Familia Bcl-2.....	21
2.3. MAPK-asas.....	25-34
2.3.1. Generalidades.....	25
2.3.2. Regulación y funcionamiento de las MAPK-asas.....	27
2.3.3. Respuesta celular mediada por las MAPK-asas.....	29
2.3.4. JNK.....	30
2.3.5. p38.....	32

2.4. NFκB.....	34-55
2.4.1. Generalidades.....	35
2.4.2. Componentes del NF-κB.....	35
2.4.3. Activación del NF-κB.....	39-43
2.4.3.1. Agentes inductores del NF-κB.....	39
2.4.3.2. Inhibición del NF-κB.....	42
2.4.4. Genes regulados por el NF-κB.....	43-48
2.4.5. NF-κB apoptosis.....	49-55
2.4.5.1. Efecto antiapoptotico del NF-κB	51
• NF-κB y JNK.....	51
• NF-κB y p38.....	51
• NF-κB y TRAIL.....	52
• NF-κB y daño DNA.....	52
• NFκB y TNFα.....	53
• NFκB y caspasas.....	53
• NFκB y ceramidas.....	54
2.4.5.2. Efecto proapoptótico.....	54
2.5. P53.....	55-65
2.5.1. Definición.....	55
2.5.2. Estructura.....	55
2.5.3. Regulación.....	57
2.5.3.1. Estabilización del p53.....	57
2.5.3.2. Activación del p53.....	57
2.5.4. Estímulos.....	59
2.5.4.1. Factores genotóxicos de estrés.....	59
2.5.4.2. Factores no genotóxicos de estrés.....	60
2.5.5. Funciones.....	61
2.5.6. p53-apoptosis.....	61
2.5.6.1. p53-vía extrínseca apoptótica.....	61
2.5.6.2. p53-vía intrínseca apoptótica.....	63
2.5.6.3. p53 inhibe las vías de supervivencia.....	63

II. APOPTOSIS EN LA GLÁNDULA MAMARIA

1. Generalidades.....	65
1.1. Definición.....	65
1.2. Anatomía.....	65
1.3. El desarrollo de la glándula mamaria.....	69
2. Involución de la glándula mamaria.....	71
3. Regulación del desarrollo e involución de la glándula mamaria	
3.1. Regulación del desarrollo.....	72
3.2. Regulación de la involución.....	74
3.2.1. Estadio apoptótico de la involución.....	76
3.2.2. Fase de remodelación en la involución de la glándula mamaria.....	81

III. XANTINA OXIDOREDUCTASA (XOR) FUENTE DE RADICALES LIBRES

1. Concepto de estrés oxidativo y radicales libres.....	85
1.1. Concepto de radicales libres.....	86
1.2. Mecanismos generadores de radicales libres.....	86
1.3. Tipos de radicales libres.....	87
1.3.1. Radicales libres de oxígeno (ROS)	87
1.3.1.1. Radical superóxido.....	87
1.3.1.2. Peroxido de hidrógeno.....	88
1.3.1.3. Radical hidroxilo.....	89
1.3.1.4. Oxígeno singlete.....	89
1.3.1.5. Radical alcóxido.....	90
1.3.1.6. Radical peróxido.....	90
1.3.1.7. Ozono.....	90
1.3.2. Radicales libres de nitrógeno (RNS).....	90
1.3.2.1. Óxido nítrico.....	91
1.3.2.2. Peroxinitrito.....	92
1.3.2.3. Dioxido de nitrógeno.....	93
2. Fuentes de radicales libres.....	93

2.1. Fuentes exógenas.....	93
2.1.1. Agentes antineoplásicos, antibióticos.....	93
2.1.2. Irradiaciones.....	93
2.1.3. Factores ambientales.....	93
2.2. Fuentes endógenas.....	94
2.2.1. La cadena de transporte electrónico mitocondrial.....	94
2.2.1.1. Producción de radicales libres en los distintos estados mitocondriales.....	94
2.2.2. Autooxidación de pequeñas moléculas.....	95
2.2.3. Reacción de Fenton-Haber-Weiss.....	96
2.2.4. Sistemas de transporte electrónico del retículo endoplásmico y membrana nuclear.....	97
2.2.5. Peroxisomas.....	97
2.2.6. Membrana plasmática.....	97
2.2.7. Enzimas solubles y proteínas.....	98
2.2.8. Fagocitos activados.....	98
2.2.9. Otras enzimas.....	98
3. Daño biomolecular como consecuencia del estrés oxidativo.....	99
3.1. Daño oxidativo a las proteínas.....	99
3.2. Daño oxidativo a los lípidos.....	101
3.3. Daño oxidativo a los glúcidos.....	102
3.4. Daño oxidativo al DNA.....	103
3.5. Indicadores de estrés oxidativo.....	104
3.5.1. Indicadores de daño oxidativo en el citosol.....	104
3.5.1.1 Cociente GSSG/GSH.....	104
3.5.2. Indicadores de daño oxidativo a proteínas.....	105
3.5.2.1. Grupos carbonilos en proteínas.....	105
3.5.2.2. 2-oxohistidina.....	105
3.5.3. Indicadores de daño oxidativo a lípidos.....	105
3.5.3.1. Malondialdehído e hidroxinonenal.....	105
3.5.3.2. Pentano y etano.....	106
3.5.4. Indicadores de daño oxidativo al DNA.....	106
3.5.4.1 8-hidroxi 2-desoxiguanosina.....	106

4. Antioxidantes.....	107
5. Xantina Oxidoreductasa (XOR) fuente de radicales libres.....	108
5.1. Familia estructural de la XOR.....	109
5.2. Estructura de la XOR.....	112
5.3. Genética y evolución de la XOR.....	116
5.4. Síntesis de la XOR.....	116
5.5. Distribución de la XOR.....	121
5.6. Actividad catalítica de la XOR.....	123
5.7. Regulación de la actividad enzimática de la XOR.....	126
5.8. Importancia e implicaciones de la XOR.....	130
5.8.1. Papel fisiológico de la XOR.....	131
5.8.2. Papel de la XO en fisiopatología.....	131
5.9. Deficiencia de la XOR.....	133
5.10. XO en la glándula mamaria.....	134
 OBJETIVOS.....	 135-136
 MATERIAL Y MÉTODO.....	 137-188
 1. Animales de experimentación.....	 137
2. Aparatos.....	 138-141
2.1. Agitador magnético	
2.2. Agitador orbitales	
2.3. Autoclave	
2.4. Balanzas	
2.5. Baños	
2.6. Cámara fotográfica	
2.7. Centrífugas	
2.8. Cubeta de electroforesis	
2.9. Cubeta de electrotransferencia	

2.10. Espectrofotómetro	
2.11. Espectrofotómetro capilar	
2.12. Equipo de H. P. L. C. (cromatógrafo líquido de alta eficacia)	
2.13. Fluorímetro	
2.14. Fuentes de alimentación de electroforesis	
2.15. Fuente de alimentación de electrotransferencia	
2.16. Homogenizador	
2.17. Microscopio	
2.18. pHmetro	
2.19. Cajas de relevado	
2.20. Sistema de purificación de agua	
2.21. Ultramicrotomo	
2.22. Transiluminador	
3. Reactivos.....	141-144
3.1. Determinación del NFκBp65	
3.2. Detección de células apoptóticas	
3.3. Determinación del DNA marcado con la sonda biotinilada	
3.4. Determinación de proteínas por quimioluminiscencia aplicando el método de Western blottings	
3.5. Striping restore Western blot stripping buffer	
3.6. Anticuerpos	
3.7. Enzimas	
3.8. Coenzimas	
3.9. Determinación de proteínas	
4. Métodos.....	144-
4.1. Extracción de muestras biológicas de glándula mamaria y de sangre.....	144
4.2. Detección y cuantificación de la apoptosis.....	146
4.2.1. Aislamiento y cuantificación de DNA genómico.....	146
4.2.1.1. Principio del método.....	146

4.2.1.2. Reactivos.....	147
4.2.1.3 Procedimiento.....	147
4.2.1.4. Cálculos.....	148
4.2.2. Electroforesis de DNA.....	148
4.2.2.1. Reactivos.....	148
4.2.2.2. Procedimiento.....	149
4.2.3. Detección de la fragmentación del DNA por el método TUNEL.....	149
4.2.3.1. Reactivos.....	151
4.2.3.2. Procedimiento.....	152
4.3. Determinación de la concentración de proteínas.....	154
4.3.1. Reactivos.....	154
4.3.2. Procedimiento.....	154
4.3.3. Cálculos.....	155
4.4. Determinación de la actividad de Xantina Oxidasa, Xantina Deshidrogenasa	155
4.4.1. Determinación de la actividad de Xantina Oxidasa, Xantina Deshidrogenasa en homogenados de glándula mamaria.....	155
4.4.1.1. Protocolo para realizar homogenados de glándula mamaria.....	155
4.4.1.2. Principio del método.....	156
4.4.1.3. Reactivos.....	156
4.4.1.4. Procedimiento.....	157
4.4.1.5. Cálculos.....	158
4.4.2. Determinación de la actividad de la Xantina Oxidasa en plasma	159
4.5. Determinación de la expresión de la Xantina Oxidasa en homogenados de glándula mamaria.....	159
4.5.1. Procedimiento.....	159
4.5.2. Protocolo para realizar homogenados de glándula mamaria para Western blot.....	159
4.5.3. Preparar los geles.....	160
4.5.4. Preparar las muestras.....	160

4.5.5. Electroforesis vertical.....	161
4.5.6. Electrotransferencia.....	161
4.5.7. Immunoblot assay.....	162
4.5.8. Detección de proteínas.....	162
4.5.9. Striping.....	163
4.5.10. Western blot con el anticuerpo alfa-tubulina.....	163
4.5.11. Cálculos.....	163
4.6. Determinación de la expresión génica de fosfo-p53.....	164
4.6.1. Reactivos.....	164
4.6.2. Procedimiento.....	164
4.7. Determinar la expresión génica de MAPK-inasas implicadas en apoptosis.....	165
4.7.1. Determinar SAPK/JNK en homogenados de glándula mamaria.....	165
4.7.1.1. Principio del método.....	165
4.7.1.2. Reactivos.....	165
4.7.1.3. Procedimiento.....	165
4.7.2. Determinar fosfo-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) en homogenados de glándula mamaria.....	165
4.7.2.1. Principio del método.....	166
4.7.2.2. Reactivos.....	166
4.7.2.3. Procedimiento.....	166
4.7.3. Determinar p38 MAPK-asa en homogenados de glándula mamaria.....	166
4.7.3.1. Principio del método.....	166
4.7.3.2. Reactivos.....	166
4.7.3.3. Procedimiento.....	167
4.7.4. Determinar fosfo-p38 MAPK-asa (Thr180/Tyr182) en homogenados de glándula mamaria.....	167
4.7.4.1. Principio del método.....	167
4.7.4.2. Reactivos.....	167
4.7.4.3. Procedimiento.....	167
4.8. Determinar la expresión génica de proteínas nitradas (3- nitrotirosina) en homogenados de glándula mamaria	

4.8.1. Principio del método.....	167
4.8.2. Reactivos.....	168
4.8.3. Procedimiento.....	168
4.9. Cuantificación de los niveles de glutatión.....	168
4.9.1. En sangre.....	168
4.9.1.1. Determinación de glutatión total.....	168
4.9.1.1.1. Principio del método.....	168
4.9.1.1.2. Reactivos.....	169
4.9.1.1.3. Preparar las muestras.....	169
4.9.1.1.4. Derivatización de las muestras.....	169
4.9.1.1.5. Técnica cromatográfica.....	169
4.9.1.1.6. Cálculos.....	170
A.Cálculo de la concentración de los patrones de glutatión reducido por medio de la reacción de la glutatión transferasa.....	170
A1.Principio del método.....	171
A2.Reactivos.....	171
A3.Procedimiento.....	171
A4.Cálculos.....	172
B. Cálculo de la concentración de los patrones de glutatión oxidado por medio de la glutatión reductasa.....	173
B1.Principio del método.....	173
B2.Reactivos.....	173
B3.Procedimiento.....	173
B4.Cálculos.....	173
4.9.1.2. Determinación del glutatión oxidado (GSSG)	
4.9.1.2.1. Principio del método.....	174
4.9.1.2.2. Reactivos.....	174
4.9.1.2.3. Preparar las muestras.....	175
4.9.1.2.4. Derivatización de las muestras.....	175
4.9.1.2.5. Técnica cromatográfica.....	175
4.9.1.2.6. Cálculos.....	175
4.9.1.3. Determinación de glutatión reducido (GSH)	

4.9.2. En homogenados de glándula mamaria.....	176
4.9.2.1. Determinación del GSH.....	176
4.9.2.2. Determinación de GSSG.....	176
4.10. Determinación de los niveles de lactosa en glándula mamaria	
4.10.1. Principio del método.....	177
4.10.2. Reactivos.....	177
4.10.3. Procedimiento.....	178
4.10.4. Cálculos.....	179
4.11. Aislamiento de mitocondrias de glándula mamaria.....	179
4.11.1. Reactivos.....	179
4.11.2. Procedimiento.....	179
4.12. Determinación de la tasa de producción de peróxido de hidrógeno.....	180
4.12.1. Principio.....	180
4.12.2. Reactivos.....	181
4.12.3. Procedimiento.....	181
4.12.3.1. Producción de peróxido de hidrogeno utilizando como dador de equivalentes reductores succinato.....	181
4.12.3.2. Producción de peróxido de hidrogeno utilizando como dador de equivalentes reductores piruvato y malato.....	182
4.12.4. Cálculos.....	183
4.13. Extracción de proteínas nucleares a partir de la glándula mamaria.....	184
4.13.1. Principio.....	184
4.13.2. Procedimiento.....	184
4.13.3. Cuantificación.....	185
4.14. Medir actividad del factor de transcripcion NF-κB (subunidad p65).....	185
4.14.1. Principio.....	185
4.14.2. Procedimiento.....	185
4.15. Determinación de la expresión génica del citocromo c	

4.15.1. Principio del método.....	187
4.15.2. Reactivos.....	187
4.15.3. Procedimiento.....	187
4.16. Análisis estadístico de los resultados.....	187

RESULTADOS

188-229

I. XANTINA OXIDASA Y APOPTOSIS

1. XOR fuente de radicales libres en la glándula mamaria de rata...	188
1.1. Presencia de la XOR en la glándula mamaria.....	188
1.2. Actividad de la XOR en la glándula mamaria.....	190
2. Concentración de lactosa tras el destete en la glándula mamaria	
3. Proteínas nitradas tras el destete en la glándula mamaria.....	192
4. Marcadores del estrés oxidativo en la glándula mamaria.....	194
5. Estudio del efecto de la administración del Alopurinol sobre la XOR y al estado redox en la glándula mamaria de rata.....	197
5.1. Efecto del alopurinol sobre la actividad de la XOR.....	198
5.2. Efecto del alopurinol sobre la expresión de la XO.....	200
5.3. Efecto del alopurinol sobre el estado redox en la glándula mamaria.....	202
6. El efecto de la XOR sobre la apoptosis en la glándula mamaria de rata.....	205
6.1. Efecto del alopurinol sobre el aspecto morfológico de la glándula mamaria en destete.....	206
6.2. Efecto del alopurinol sobre la fragmentación del DNA nuclear en la glándula mamaria en destete.....	207
7. Mecanismo de acción de la XOR sobre la apoptosis en la glándula mamaria de rata.....	208
7.1. Efecto de la XO sobre la expresión de las kinasas JNK y p38 en el proceso apoptótico en la glándula mamaria de	

rata tras el destete.....	208
7.2. Efecto de la XO sobre la expresión del factor nuclear NFκB en el proceso apoptótico de la glándula mamaria de rata tras el destete.....	212
7.3. Efecto de la XO sobre la expresión del factor p53 en el proceso apoptótico de la glándula mamaria de rata tras el destete.....	213

II. XANTINA OXIDASA Y MITOCONDRIA

1. Presencia de la XO en la mitocondria.....	215
2. Efecto del alopurinol sobre la expresión de la XO en la mitocondria de la glándula mamaria.....	216
3. Actividad de la XO en la mitocondria de la glándula mamaria..	217
4. Parámetros de estrés oxidativo dentro de la mitocondria de glándula mamaria.....	218
4.1. Proteínas nitradas en mitocondrias de glándula mamaria	
5. Correlación entre la actividad de la XO y la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial en la glándula mamaria.....	220
5.1. Efecto del alopurinol sobre la actividad de la XO en mitocondrias de glándula mamaria.....	220
5.2. Efecto del alopurinol sobre la producción de peróxidos al nivel de la cadena respiratoria mitocondrial.....	222
5.3. La XO fuente de peróxidos en las mitocondrias de glándula mamaria.....	225
6. Liberación del citocromo c de la mitocondria durante el destete en la glándula mamaria.....	227
7. Efecto de la actividad de la enzima XO sobre la liberación del citocromo c en mitocondrias de glándula mamaria durante su involución.....	227

DISCUSIÓN **229-248**

I. XOR Y APOPTOSIS

1. Inducción de la actividad Xantina OxidoReductasa (XOR) en la involución fisiológica de la glándula mamaria de rata.....229
 - 1.1. Presencia y actividad de la XOR en la glándula mamaria
2. La actividad de la enzima XO como fuente importante de estrés oxidativo durante el destete.....232
3. Implicación de la enzima XO en el proceso de muerte celular por apoptosis en la glándula mamaria de rata tras el destete.....236
4. Vías de señalización del proceso apoptótico mediadas por la actividad de la enzima XO.....237

II. XOR Y MITOCONDRIA

1. Presencia y actividad de la XO en las mitocondrias de glándula mamaria de rata.....243
2. Efecto del alopurinol sobre la actividad de la XO en mitocondrias de glándula mamaria.....245
3. Parámetros de estrés oxidativo dentro de la mitocondria de glándula mamaria.....246
 - 3.1. Proteínas nitradas en mitocondrias de glándula mamaria
 - 3.2. Efecto del alopurinol sobre la producción de peróxidos al nivel de la cadena respiratoria mitocondrial.....246
 - 3.3. La enzima XO fuente de peróxidos al nivel mitocondrial248
4. Efecto del alopurinol sobre la producción de peróxidos al nivel de la cadena respiratoria mitocondrial.....248

SUMMARY OF RESULTS AND DISCUSSION

Role of Xanthine Oxidase as a regulator of apoptosis: a study in the rat mammary gland	249-266
---	----------------

I. ROLE OF XOR IN APOPTOSIS IN THE MAMMARY GLAND TISSUE OF THE RAT AFTER WEANING

1. Induction of the Xantina Oxidase-Reductasa (XOR) activity in the physiological involution of the mammary gland of rat.....	250
1.1. Presence and activity of the XOR in the mammary gland	
2. The activity of the XO enzyme as a considerable source of oxidative stress during weaning.....	253
3. Involvement of XO in the process of cell death by apoptosis in the mammary gland of the rat after weaning.....	255
4. Signalling pathways in the apoptotic process mediated by XO	
4.1. XO activity and MAPKs pathways.....	256
4.2. XO activity and NF- κ B	257
4.3. XO activity and p53.....	258

II. XOR AND MITOCHONDRIA

1. Presence and activity of XO in the mitochondria of the mammary gland of the rat.....	260
2. Effect of allopurinol on the activity of XO in mitochondria mammary gland.....	263
3. Parameters of oxidative stress inside mitochondria from the mammary gland.....	263
3.1. Nitrate proteins in mitochondria of the mammary gland	
3.2. Effect of allopurinol on the production of peroxides at the level of the mitochondrial respiratory chain.....	264

3.3. XO source of peroxides at mitochondrial level.....	265
4. Effect of the activity of XO on the release of the cytochrome c from the mammary gland mitochondria during involution.....	265
CONCLUSIONES	267
BIBLIOGRAFÍA	268-302

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE TABLAS

INTRODUCCIÓN

Tabla I.1.	Miembros de la familia MAPK-asas.....	26
Tabla I.2.	Selección de agentes inductores de la activación de NF- κ B.....	40
Tabla I.3.	Compuestos inhibidores de la activación de NF- κ B.....	42
Tabla I.4.	Selección de genes regulados por NF- κ B.....	43
Tabla I.5.	Genes pro y antiapoptóticos inducidos por el NF- κ B.....	50
Tabla I.6.	Genes que se expresan durante la involución de la glándula mamaria	75
Tabla I.7.	Principales clases de ROS.....	87
Tabla I.8.	Principales especies de RNS.....	91
Tabla I.9.	Sistemas más importantes que generan la oxidación de proteínas...	100
Tabla I.10.	Sistemas antioxidantes.....	108
Tabla I.11.	Molybdopterincontaining proteins by molybdopterin centre type.....	109
Tabla I.12.	Molybdopterincontaining proteins by type and number of prosthetic centres.....	110
Tabla I.13.	Description to molybdopterin family.....	111
Tabla I.14.	Grupos prostéticos en la estructura de la XOR.....	113
Tabla I.15.	Factores transcripcionales en la expresión de XOR en humanos.....	127
Tabla I.16.	Inhibidores de la XOR.....	130

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla M.1.	Composición del tampón para el aislamiento de mitocondrias.....	179
Tabla M.2.	Composición del tampón peróxidos.....	181
Tabla M.3.	Composición de la solución glicina-EDTA para detener reacción.....	182
Tabla M.4.	Reactivos utilizados para la realización de la recta patrón del nivel de peróxido.....	183

RESULTADOS

Tabla R.1.	Comparación de los niveles de GSSG (nmol/g tejido), GSH (nmol/g	
-------------------	---	--

tejido) y del cociente GSSG/GSH x100 entre las muestras de glándula mamaria controles, 24 y 48 horas tras el destete.....**194**

Tabla R.2. Actividad de la XO en mitocondrias aisladas controles y destetadas 24h de glándula mamaria.....**221**

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura I.1.	Apoptosis durante la embriogenesis (A) y sindactilia por falta del proceso apoptótico (B).....	2
Figura I.2.	Cambios morfológicos durante la necrosis (A) y apoptosis (B).....	4
Figura I.3.	Mecanismo apoptótico extrínseco y intrínseco.....	5
Figura I.4.	Receptor Fas y su vía de señalización.....	7
Figura I.5.	Receptor TNF-R1 y su vía de señalización.....	7
Figura I.6.	La formación del apoptosoma.....	9
Figura I.7.	Cambios morfológicos durante apoptosis.....	10
Figura I.8.	Cambios nucleares durante la degradación apoptótica.....	11
Figura I.9.	Cambios de la membrana plasmática durante apoptosis.....	12
Figura I.10.	Fragmentación del DNA nuclear durante apoptosis.....	13
Figura I.11.	Fagocitosis de los cuerpos apoptóticos.....	14
Figura I.12.	Subunidades estructurales de las caspasas.....	15
Figura I.13.	Familia de caspasas.....	16
Figura I.14.	Activación de la caspasas 8 por vía receptores de superficie.....	18
Figura I.15.	La mitocondria active las caspasas por intermedio del apoptosoma..	19
Figura I.16.	Clasificación de las proteínas Bcl-2	21
Figura I.17.	Control de la liberación del citocromo c por la familia Bcl-2.....	23
Figura I.18.	Mecanismo de fosforilación, ruptura proteolítica y la vía caspasa independiente en la liberación del citocromo c de la mitocondria.....	23
Figura I.19.	Estructura tridimensional de las MAPKs.....	25
Figura I.20.	Cascada de señalización MAPK.....	26
Figura I.21.	Cascada de señalización MAPKasas.....	28
Figura I.22.	Esquema general de activación de las MAPKs.....	28
Figura I.23.	La fosforilación doble determina la activación de las enzimas MAPKs.....	29
Figura I.24.	Cascada de señalización del SAPK/JNK.....	31
Figura I.25.	Vía de señalización del p38.....	33
Figura I.26.	Estructura del homodímero p50/p50 NF- κ	35
Figura I.27.	Generación y dimerización del complejo NF- κ B/Rel/ I κ B en el citoplasma celular.....	36

Figura I.28. Interacción de NF- κ B con su proteína inhibidora I κ B.....	37
Figura I.29. Familia NF- κ B e proteínas inhibidoras κ B (I κ B).....	38
Figura I.30. Factores inductores del NF- κ B.....	39
Figura I.31. Clases de genes regulados por NF- κ B.....	43
Figura I.32. Estructura de la proteína p53.....	55
Figura I.33. p53 se fija del DNA por su dominio central.....	56
Figura I.34. Activación del p53.....	58
Figura I.35. Activación del p53 por acetilación y fosforilación.....	58
Figura I.36. Modelo de activación del p53 que implica la presencia del HAT con su coactivadores y supresores.....	59
Figura I.37. Vía extrínseca e intrínseca del p53 en apoptosis.....	62
Figura I.38. p53 inhibe la vía de supervivencia del Akt.....	64
Figura I.39. Estructura alveolar de la glándula mamaria en el día 8 de gestación.....	65
Figura I.40a Ductos alveolares en la glándula mamaria (día 10 de vida).....	66
Figura I.40b Ducto alveolar terminal con alveolo en “dedo de guante”.....	66
Figura I.41a Lumen de un ducto galactóforo.....	66
Figura I.41b Lumen de alvéolos secretorios.....	66
Figura I.42. Capa epitelial en un alveolo de glándula mamaria.....	67
Figura I.43. Componentes del mesenquima glandular mamar.....	68
Figura I.44. Vascularización linfática y sanguínea en un lóbulo mamar.....	68
Figura I.45a Glándula mamaria en un neonato.....	69
Figura I.45b Glándula mamaria en el día 24 de vida	69
Figura I.45c Glándula mamaria en el día 42.....	70
Figura I.45d Glándula mamaria en el día 70.....	70
Figura I.45e Aspecto de la glándula mamaria en el día 9 de gestación.....	70
Figura I.45f Aspecto de la glándula mamaria en el día 16 de gestación.....	70
Figura I.46. Estructura alveolar de la glándula mamaria durante la lactancia y al final de la involución.....	72
Figura I.47. El proceso de involución en la glándula mamaria esta regulado por la expresión de señales proapoptóticas con la disminución de factor de supervivencia.....	76
Figura I.48. La estasis de la leche representa un factor de estrés, determinando la activación de la p53 y a la STAT3.....	79
Figura I.49. Cambios en la expresión génica durante la involución de la glándula Mamaria.....	84

Figura I.50.	Esquema de la cadena de transporte electrónico mitocondrial.....	94
Figura I.51.	Mecanismo de peroxidación lipídica.....	101
Figura I.52A.	Estructura tridimensional de la XOR. Los colores representan los dominios: en marrón Fe ₂ S ₂ , en verde FAD y en azul el Mo.....	113
Figura I.52B.	Orientación relativa de los dominios. El código de colores para los átomos es: C-blanco, N- azul, O-rojo, S-amarillo, Fe-verde, P- morado, Mo-marrón.....	113
Figura I.53.	Representación gráfica de los enlaces del átomo de molibdeno...	115
Figura I.54.	Modelo de la biosíntesis del Mo-Co y XOR en las células humanas.....	117
Figura I.55.	Formas reducidas y oxidadas de la XOR.....	118
Figura I.56.	Representación del cambio conformacional en el sitio FAD en la XDH cuando se convierte en XO.....	119
Figura I.57.	Representación esquemática de los dominios cuando se cortan por proteolisis.....	120
Figura I.58.	Vías de conversión de la XDH en XO.....	120
Figura I.59.	Vía de degradación purínica.....	124
Figura I.60.	Mecanismo de reacción de la XOR con la xantina.....	124
Figura I.61.	La XOR cataliza la producción de NO y peroxinitrito.....	125
Figura I.62.	Esquema simplificado de la producción de radicales libres durante el proceso de isquemia- reperfusión.....	129
Figura I.63.	Estructura comparativa del Alopurinol (A) y Hipoxantina (B).....	130

MATERIALES Y MÉTODOS

Figura M.1.	Esquema de la técnica TUNEL.....	150
--------------------	----------------------------------	------------

RESULTADOS

Figura R.1.	Western blot de Xantina Oxidasa en homogenados de glándula mamaria.....	189
Figura R.2.	Densitometría del Western blot de Xantina Oxidasa en homogenados de glándula mamaria.....	189
Figura R.3.	Actividad de la Xantina Dehidrogenasa (XDH) en homogenados de glándula mamaria.....	190

Figura R.4. Actividad de la Xantina Oxidasa (XO) en homogenados de glándula mamaria.....	191
Figura R.5. Concentración de lactosa en homogenados de glándula mamaria.....	192
Figura R.6. Western blot de proteínas nitradas en homogenados de glándula mamaria.....	193
Figura R.7. Densitometría del Western blot de proteínas nitradas en homogenados de glándula mamaria.....	194
Figura R.8A Niveles de GSH en homogenados de glándula mamaria.....	195
Figura R.8B Niveles de GSSG en homogenados de glándula mamaria.....	196
Figura R.8C Cociente GSSG/GSH*100 en homogenados de glándula mamaria.....	197
Figura R.9A Actividad de la Xantina Dehidrogenasa (XDH) en homogenados de glándula mamaria con y sin alopurinol.....	198
Figura R.9B Actividad de la Xantina Oxidasa (XO) en homogenados de glándula mamaria con y sin alopurinol.....	199
Figura R.10. Actividad de la Xantina Oxidasa (XO) en plasma de ratas, antes y después de la administración del alopurinol.....	200
Figura R.11 Western blot de Xantina Oxidasa en homogenados de glándula mamaria con y sin alopurinol.....	201
Figura R.12. Densitometría del Western blot de Xantina Oxidasa en homogenados de glándula mamaria sin y con alopurinol.....	202
Figura R.13A Niveles de GSH en homogenados de glándula mamaria con y sin alopurinol.....	203
Figura R.13B Niveles de GSSG en homogenados de glándula mamaria con y sin alopurinol.....	204
Figura R.13C Cociente GSSG/GSH*100 en homogenados de glándula mamaria con y sin alopurinol.....	205
Figura R.14A Imágenes microscópicas de glándula mamaria a las 24 horas tras el destete.....	206
Figura R.14B Imágenes microscópicas de glándula mamaria a las 48horas tras el destete.....	206
Figura R.15. Electroforesis del DNA glándula mamaria en gel de agarosa.....	207
Figura R.16A Western blot de JNK en homogenados de glándula mamaria con y sin alopurinol.....	209
Figura R.16B Densitometría de la banda 54kDa de JNK en homogenados de	

	glándula mamaria con y sin alopurinol.....	209
Figura R.17A	Western blot de P-JNK en homogenados de glándula mamaria con y sin alopurinol.....	210
Figura R.17B	Densitometría de la banda 54kDa del P-JNK en homogenados de glándula mamaria con y sin alopurinol.....	211
Figura R.18.	Western blot (A) y densitometría (B) de P-p38 en homogenados de glándula mamaria con y sin alopurinol.....	212
Figura R.19.	Efecto de la XO sobre la expresión de la subunidad p65 del factor nuclear NFκB en homogenados de glándula mamaria con y sin alopurinol.....	213
Figura R.20.	Western blot (A) y densitometría (B) de P-p53 en homogenados de glándula mamaria con y sin alopurinol.....	214
Figura R.21.	Western blot de Xantina Oxidasa en mitocondrias aisladas de glándula mamaria.....	215
Figura R.22.	Densitometria del Western blot de Xantina Oxidasa en mitocondrias aisladas de glándula mamaria.....	215
Figura R.23.	Western blot de Xantina Oxidasa en mitocondrias aisladas de glándula mamaria.....	216
Figura R.24.	Densitometría del Western blot de Xantina Oxidasa en mitocondrias aisladas de glándula mamaria.....	216
Figura R.25.	Actividad de la Xantina Oxidasa (XO) en mitocondrias de glándula mamaria.....	217
Figura R.26.	Western blot de α-tubulina (54kDa) en mitocondrias aisladas(A) y citosol (B) en la glándula mamaria de rata.....	218
Figura R.27.	Western blot de proteínas nitradas en mitocondrias aisladas de glándula mamaria.....	219
Figura R.28A	Densitometría de proteínas nitradas de bajo peso molecular entre 10-20kDa, en mitocondrias aisladas de glándula mamaria.....	219
Figura R.28B	Densitometría de proteínas nitradas de bajo peso molecular entre 20-30kDa, en mitocondrias aisladas de glándula mamaria.....	220
Figura R.29.	Actividad de la XO en mitocondrias aisladas de glándula mamaria incubadas o no con alopurinol a una concentración de 50μM y 100μM.....	222
Figura R.30A	Velocidad de generación de peróxidos por mitocondrias controles de glándula mamaria, incubadas con o sin alopurinol (de 50μM y 100μM), utilizando como sustrato para el complejo I el piruvato 5mM	

y malato 2.5 mM de 50µM y 100µM.....	223
Figura R.30B Velocidad de generación de peróxidos por mitocondrias destetes 24 horas de glándula mamaria incubadas con o sin alopurinol (de 50µM y 100µM), utilizando como sustrato para el complejo I el piruvato 5mM y malato 2.5 mM de 50µM y 100µM.....	223
Figura R.31A Velocidad de generación de peróxidos por mitocondrias controles de glándula mamaria, incubadas con o sin alopurinol (de 50µM y 100µM), utilizando como sustrato para el complejo III el succinato 10mM.....	224
Figura R.31B Velocidad de generación de peróxidos por mitocondrias destetes 24 horas de glándula mamaria, incubadas con o sin alopurinol (de 50µM y 100µM), utilizando como sustrato para el complejo III el succinato 10mM.....	225
Figura R.32. Velocidad de generación de peróxidos por la XO en mitocondrias controles (A) y destetadas 24horas (B) en la glándula mamaria, incubadas con xantina y xantina-alopurinol.....	226
Figura R.33. Western blot de citocromo c en mitocondrias aisladas de glándula mamaria.....	227
Figura R.34. Western blot de citocromo c en mitocondrias aisladas de glándula mamaria.....	228
100µM	

DISCUSIÓN

Figura D.1. Correlación entre la actividad de la XO y la concentración de lactosa en los homogenados de glándula mamaria	231
Figura D.2. Correlación entre la actividad XO y densitometría del Western blot de proteínas nitradas de bajo peso molecular en los homogenados de glándula mamaria de rata.....	233
Figura D.3. Correlación entre los niveles de GSH y GSSH en los homogenados de glándula mamaria de rata.....	235
Figura D.4. Efecto del alopurinol sobre el número de células apoptóticas en la glándula mamaria en involución fisiológica tras el destete.....	237
Figura D.5. Esquema de las vías activadas durante el destete y el mecanismo de control por la XO en el modelo de glándula mamaria de rata.....	242
Figura D.6. Correlación entre la actividad XO y el cociente GSSG/GSH *100	

en las mitocondrias de glándula mamaria de rata.....244

Figura D.7. Correlación entre la expresión de proteínas nitradas de bajo peso molecular (10-30kDa) y la actividad de la enzima XO en mitocondrias aisladas de glándula mamaria de rata.....247

SUMMARY OF RESULTS AND DISCUSSION

Figure S.1. Correlation between the activity of the XO and the concentration of lactose in the mammary gland homogenates.....252

Figure S.2. Correlation between XO activity and densitometry of the Western blot of nitrate proteins of low molecular weight in the homogenates of the mammary gland in the rat.....253

Figure S.3. Correlation between the levels of GSH and GSSH in the mammary gland homogenate in the rat.....254

Figure S.4. Pathways activated during weaning and the mechanism by which XO controls the apoptotic process in the mammary gland of the rat.....260

Figure S.5. Correlation between XO activity and the GSSG/GSH quotient in mitochondria in the mammary gland of the rat.....261

Figure S.6. Correlation between XO activity and Nitrate Protein expression (10-30kDa) in mitochondria in the mammary gland of the rat.....264

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

Ac-DEVD	Caspase-3 inhibitor
ACTH	Adrenocorticotropa
Ac-YVAD	Caspase-1 Inhibitor
ADC	AIDS-Dementia-Complex
AIF	Apoptotic inducer factor
Akt	Protein kinase B (serine/threonine kinases)
Alopurinol	4-hidroxipirazolo(3,4-d) pirimidina
AMP	Adenosín-5'-monofosfato
ANT	Adenine nucleotide translocator
AP-1	Activator protein 1
Apaf-1	Apoptosis activating factor 1
Apo2L	o TRAIL: Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
AR	Amphyregulin
ASK1	Apoptosis signal-regulating kinase 1
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP	Adenosín-5'-trifosfato.
ATR	A-T and Rad3-related
Bad	Bcl2-antagonist of cell death
Bax	Bcl2-associated X protein
BBC3	Bcl2 binding component 3
Bcl2	B-cell CLL/lymphoma 2
Bcl-XL	Antiapoptotic protein from Bcl2 family
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
bFGF	Basic Fibroblast Factor
BH_{1,2,3,4}	Bcl-2 homology 1,2,3,4
Bid	Bcl2 Interacting Domain
BMK1/ERK5	Big MAP kinase-1/ extracellular signal-regulated kinase 5
BTC	Betacellulin
C/EBP	CAAT/enhancer binding proteins
CAD/ICAD	Caspase Activated DNase/Inhibidor Caspase Activated DNase

CARD	Caspase Recruitment Domains
CBP	CREB binding protein
CDNB	1-Cloro 2,4-dinitrobenceno
Cisplatino	cis-Diamino dicloroplatino
CK	Creatin Kinasa
CK2	Caseín kinasa II
c-myc	Transcription factor
COX	Citocromo oxidasa
CPP32	Caspasa 3
DAB	Diaminobenzidina
DD	Death Domain
DED	Death Effector Domain
DFF 45/ICAD	DNA Fragmentation Factor (45 kDa), human homolog to ICAD (from mouse)
DISC	Death Inducing Signal Complex
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA-PK	DNA dependent Proteine Kinase
DOC	Deoxicolato
DRB	5,6-dicloro-1-beta-Dribofuranosilbensimidazol
DTT	Dithiothreitol
E2F-1	Factor de transcripción de la vía proteica del retinoblastoma Rb
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF	Epidermal growth factor
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase
FAD	Flavín adenín dinocluótido
FADD	Fas Associated Death Domain protein
FADD	Fas-associated protein with death domain
Fak	Focal adhesion kinase
FAK	Focal Adhesión Kinase
Fas	Cell-surface receptor
FasL	Fas death ligand
FDNB	1-fluor-2,4dinitrobenceno
FLIP	FLICE-inhibitory protein
GADD45	Growth Arrest and DNA Damage inducible 45
Gas2	Growth-arrest-specific protein 2

GCK	Germinal Center Kinase
GEF	Guanine Exchange Factor
GPCR	G Protein Coupled Receptors
GPT	Guanosil trifosfato
GSH	Glutati3n reducido
GSSG	Glutati3n oxidado
GST	Glutati3n-S-transferasa
H₂O₂	Per3xido de hidr3geno
HAT	Histone acetyl transferase
HB-EGF	Heparin Binding Epidermal Growth Factor
HDAC	Histone deacetylase
HEPES	N-(2-hidroxi3til)piperacina-N'-(2-3cido etanosulf3nico).
HIF-1	Hypoxia-inducible factor-1
HNN	4-hidroxinonenal
HOCl	3cido hipocloroso
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Hsp	Heat Shock Protein
IAP-1	Inhibitor of apoptosis proteins 1
IAP-2	Inhibitor of apoptosis proteins 2
ICE	Interleukin-1 β -Converting Enzyme
IFN-γ	Interfer3n- γ
IGF-1	Insuline-like Grow Factor 1
IGFBP	Insulin-like Growth Factor Binding Proteins
IKK	I κ B kinasa
IL-1	Interleukine-1
IL-2	Interleukine 2
IL-6	Interleukine-6
Jak2	Tyrosine kinase
JNK	c-Jun N-terminal kinase
L-NAME	N ^{ω} -nitro-L-arginina metil 3ster
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAPKK	MAPK Kinasas
MAPKKK	MAPKK Kinasas
MDA	Malondialdeh3do
MDM2	Murine Double Minute2

MEKK	MAPK/ERK kinasa
MFGM	Milk fat globule membrane
MKK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MLK	Mixed lineage kinases
MMP	Metaloproteinasas de la matriz celular
Mn-SOD	Superóxido dismutasa dependiente de
MOCS1A	Molybdenum cofactor biosynthesis protein 1 A
MOCS1B	Molybdenum cofactor biosynthesis protein 1 B
MPT	Molibdopterina
NAC	N-acetilcisteína
NAD	Nicotinamida adenin dinucleótido
NEM	N-etilmaleimida
NEMO	NF- κ B Essential Modifier
NF-1	Nuclear Factor 1
NF-κB	Nuclear Factor kappa B
NGF	Nerve growth factor
NIK	NF- κ B induced kinase
NK	Natural killer
NLS	Nuclear location sequence
NO\cdot	Óxido nítrico
NO$_2$$\cdot$	Radical nitrógeno dióxido
NO$_2$Cl	Cloro nitrilo
NOS	Óxido nítrico sintasa (e-NOS, NOS endotelial; iNOS, NOS inducible; nNOS, NOS neuronal)
Noxa	pro-apoptotic Bcl2 family protein
nur 77	nuclear receptor 77
O$_2$$\cdot^-$	Anión superóxido
OH\cdot	Radical hidroxilo
ONOO$^-$	Peroxinitrito
p21WAF1	Inhibidor de la CDK
p38^{MAPK}	Protein kinasa activada por estrés
PALA	N-phosphoacetyl-L-aspartate
PARP	poly-ADP-ribose polimerasa
PBS	Fosfato tampón salino
PCA	Acido perclórico

PCAF	Histone acetyltransferase PCAF(p300/CBP-associated factor)
PK1	3'-phosphoinositide-dependent kinase
PDTC	Pirolidinditiocarbamato
PERP	Putative tetraspan transmembrane protein
PGF2alfa	Prostaglandina F2alfa
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase-type protein
PKA	Protein kinase A
PKC	Phospholipid-dependent protein kinases
PKCδ	Proteína kinasa Cδ
PLA(2)	Phospholipase A (2)
PMS	Fluoro fenilmetisulfonil
PMSF	Fenil metil sulfonil fluoride.
PP2A	Phosphat proteine 2
PT	Permeability Transition
PTDC	Pirrolidin ditiocarbamato
Pterina	2-amino-4-hidroxipteridina
PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis
Rb	Retinoblastoma
RHD	Rel homology domain
Rho	Homologue to Ras proto-oncoprotein
RIP	Receptor Interacting Protein
RNS	Radical Nitrogen Species
ROO[•]	Radical peroxilo.
ROS	Radical Oxigen Species
RP-2	o STK19P: Serine/threonine kinase 19
RP-8	o PDCD2: Programmed cell death protein 2
RSK	Ribosomal S6 kinase
SDS	Sodio dodecil sulfato
sGp	small G-proteins
SGP-2	Sulfated glycoprotein-2
SOD	Superóxido dismutasa.
SODD	Silences of death domains
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
STH	Somatotropina

TAF	Transcription initiation factor TFIID
TBS	Tris tampón salino.
TBS-T	Tris Tampón Salino con Tween 20
TCA	ácido tricloracético
TdT	deoxinucleotidil terminal transferasa
TEMED	N,N,N,N'-tetrametilnetilenodiamina.
TFIID	General transcription factor
TGFα	Transforming Growth Factor α
TIMP	Metalloproteinase inhibitor 1 precursor
TNFL	TNF ligando
TNF-R1	Tumor Necrosis Factor Receptor 1
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
tPA	Plasminogeno tipo tisular
TRADD	TNF-R Associated Death Domain
TRAF-1	TNF-receptor associated factor 1
TRAF-2	TNF-receptor associated factor 2
TRAIL	TNF-related apoptosis – inducing –ligand
TRIS	2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol.
TRPM/SGP-2	Testosterone repressed message/ sulfated
TSH	Hormona tireotropa
tTG	tissue Transglutaminase
TUNEL	“terminal deoxyribonucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labelling”
Tween 20	Polioxietileno sorbitan monooleato.
uPA	urokinase-type plasminogen activator
VDAC	Voltage-Dependent Anion Channel
vFLIP	virales FADDlike ICE inhibitory protein
WAP	Whey acidic protein
XDH	Xantina deshidrogenasa.
XO	Xantina oxidasa.
XOR	Xantina oxidoreductasa.
Z-VAD-FMK	Caspase inhibitor

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

I. APOPTOSIS

1. Generalidades

1.1. Definición

La apoptosis es un mecanismo que forma parte de la vida de las células. Es un proceso fundamental en el desarrollo embrionario, en morfogénesis, en el mantenimiento de la homeostasis celular y en la defensa frente al cáncer. Este proceso tiene un mecanismo regulado y bien conservado para todos los organismos multicelulares desde el nemátodo hasta el ser humano (Green y Amarante-Mendes, 1998)

El proceso apoptótico es un proceso activo, dependiente de energía y por lo tanto activo, que define unos mecanismos fisiológicos (Uchiyama, 1995), para distintas líneas celulares.

La apoptosis se define por los cambios morfológicos y bioquímicos que se producen durante la muerte celular programada (Bowen, 1972). Se le da la definición de muerte celular programada por el requerimiento de expresión génica tras la estimulación celular.

1.2. Histórico

Voghten en 1842 hace las primeras observaciones de muerte celular fisiológicas en la metamorfosis de anfibios (Peter, 1997). La masiva muerte celular durante la metamorfosis está descrita por Weisman en 1864 (Clarke, 1990). Fleming en 1885 en su descripción morfológica de la muerte celular en tejidos en desarrollo, aplica el término de "cromatolisis". En 1914 Gräper publica "una nueva perspectiva sobre la eliminación fisiológica de la célula". Hamburger y Levi-Montalcini en 1949 estudian la muerte neuronal en el desarrollo embrionario y establecen un porcentaje de 50% de muerte celular.

El término de "muerte celular programada" fue utilizado por primera vez por Lockshin y Williams en 1965, y se describe como un proceso de autodestrucción celular controlada, que permite al organismo su correcta morfogénesis. El ejemplo

más visible es la morfogénesis de los dedos (que se produce por eliminación de las áreas interdigitales – Figura I.1.) o la muerte neuronal.

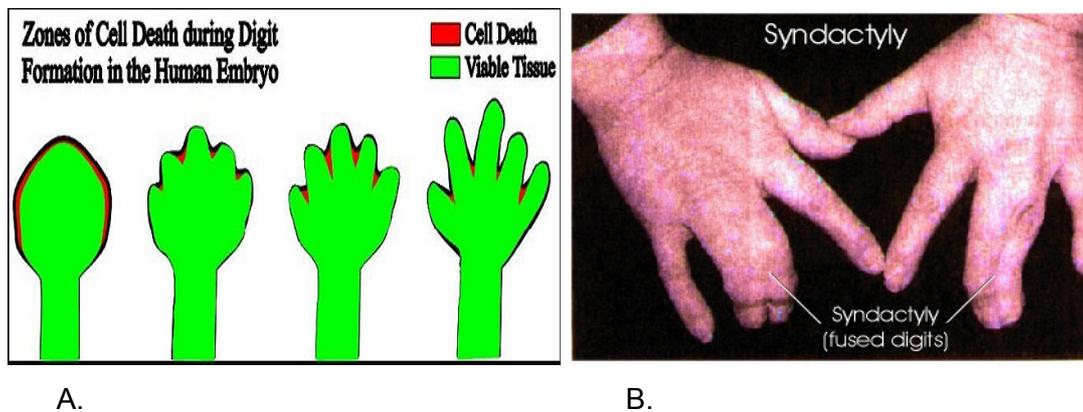


Figura I.1. Apoptosis durante la embriogenesis (A) y sindactilia por falta del proceso apoptótico (B)

En 1972- Ker, Wylie y Currie a partir de una recopilación de evidencias morfológicas, establecen las diferencias entre 2 tipos de muerte celular. Una patológica que ocurre en el centro de una lesión aguda como trauma o isquemia, que se caracteriza por la ruptura celular, denominada “necrosis celular”; y otra fisiológica, que ocurre durante el desarrollo o la homeostasis del organismo, que mantiene la integridad de la célula. Esta última la llaman “apoptosis”. Kerr utiliza este término por primera vez en 1972 en el British Journal of Cancer (Kerr, 1972).

El término apoptosis fue sugerido por James Cormack del Departamento de Griego de la Universidad de Aberdeen. La definió como la caída de los pétalos de las flores o de las hojas de los árboles. Pero, la palabra tiene también el sentido de rechazar o expulsar.

En 1986, Horvitz publicó las bases moleculares y genéticas del proceso apoptótico en estudios sobre el nematodo *Caenorhabditis elegans* y describe los genes encargados del control y ejecución de la apoptosis.

Posteriormente la muerte celular por apoptosis se relaciona con numerosas patologías (Thompson,1995; Naik,1996; Stambolic,1999; Lockshin,2000).

Desde 1996 Weil postula que el proceso es debido a unos mecanismos intracelulares, codificados genéticamente, que se expresa en todas las células nucleares. Es decir existe un “programa” que controla la muerte celular. Éste es muy complicado y aun parcialmente desconocido, que últimamente atrae campos de investigaciones y estudios muy variados.

Para demostrar la importancia del proceso apoptótico al nivel científico, en el año 2002, el Premio Nóbel de Medicina y Fisiología se atribuye a los británicos Sydney Brenner y John E. Sulston y al estadounidense Robert Horvitz, por sus trabajos sobre la muerte celular programada y el establecimiento del nemátodo *Caenorhabditis elegans* como modelo animal para el estudio de éste y otros procesos fundamentales del desarrollo.

1.3. Diferencias entre apoptosis y necrosis

La muerte celular se define por cambios que afecta todos los componentes celulares: membrana celular, citoplasma, núcleo, mitocondria etc.

El mecanismo de muerte celular por apoptosis difiere al de necrosis.

Si la apoptosis se considera como una "muerte fisiológica", la necrosis es una "muerte patológica". Si la apoptosis requiere un gasto energético, la necrosis no es ATP dependiente.

Durante el proceso de muerte celular los cambios morfológicos son distintos: en apoptosis la célula se arruga, pero manteniendo la continuidad membranaria (Figura 1.2.) y se forman los "blebs" celulares. En apoptosis disminuye el volumen celular, la cromatina se condensa y se realiza la fragmentación internucleosomal del DNA genómico por las endonucleasas. En necrosis la célula se hincha, aumenta su volumen celular, aparece lisis del núcleo, destrucción de orgánulos y el DNA se fragmenta al azar.

Al final de los procesos, en apoptosis se forman los cuerpos apoptóticos que son fagocitados por células vecinas o macrófagos, sin la aparición de inflamación y sin señales histológicas residuales, con la desaparición de células aisladas.

El final de la necrosis es dramático, con la lisis de la membrana plasmática, se liberan enzimas proteolíticas que inician un proceso inflamatorio en el tejido, con la desaparición masiva de células y la formación de una cicatriz fibrosa.

Existen argumentos que apoyan la relación que existe entre los procesos de muerte celular apoptótica y necrótica. Una misma toxina puede inducir apoptosis a dosis bajas y necrosis a dosis altas. Muchas patologías caracterizadas por la necrosis, son acompañadas también de apoptosis: es el caso del infarto miocárdico, anoxia o daño isquémico. La permeabilidad mitocondrial se altera tanto en la necrosis, como en la apoptosis. La oncoproteína Bcl2 puede inhibir la apoptosis y también unos estadios iniciales de la necrosis. La regulación de los niveles de ATP puede convertir un proceso apoptótico en uno necrótico (niveles

bajos) o al revés (niveles altos). La sobreexpresión de la proteína Bax puede inducir apoptosis y en presencia de inhibidores de caspasas determina necrosis.

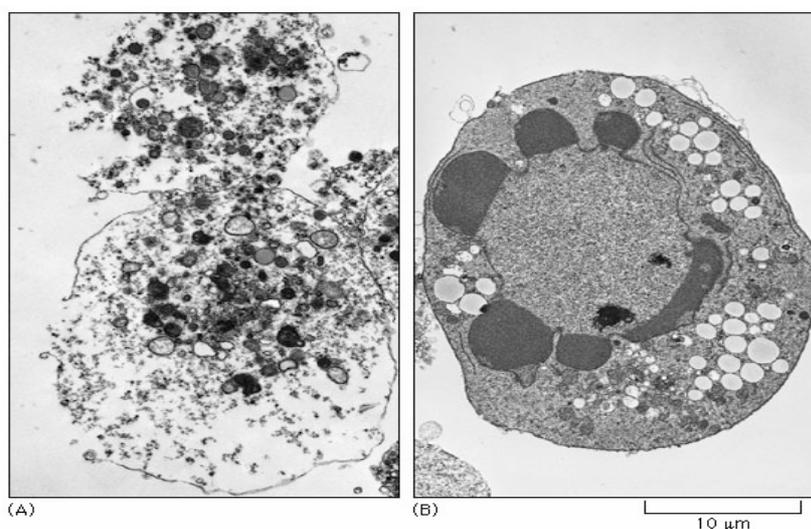


Figura I.2. Cambios morfológicos durante la necrosis (A) y apoptosis (B)

1.4. Aspectos morfológicos y bioquímicos de la apoptosis

El proceso apoptótico se caracteriza por cambios morfológicos y bioquímicos que se pueden dividir en tres fases: fase de iniciación, fase efectora y fase de degradación.

1.4.1. Fase de iniciación

La fase de iniciación es una fase reversible, en la cual un estímulo activador, actúa sobre un receptor específico, y activa mecanismos reguladores que determina la muerte por apoptosis de la célula. Se distinguen dos mecanismos de iniciación: uno extrínseco, producido por estímulos externos y otro intrínseco, que desarrolla el mecanismo interno (Figura I.3.)

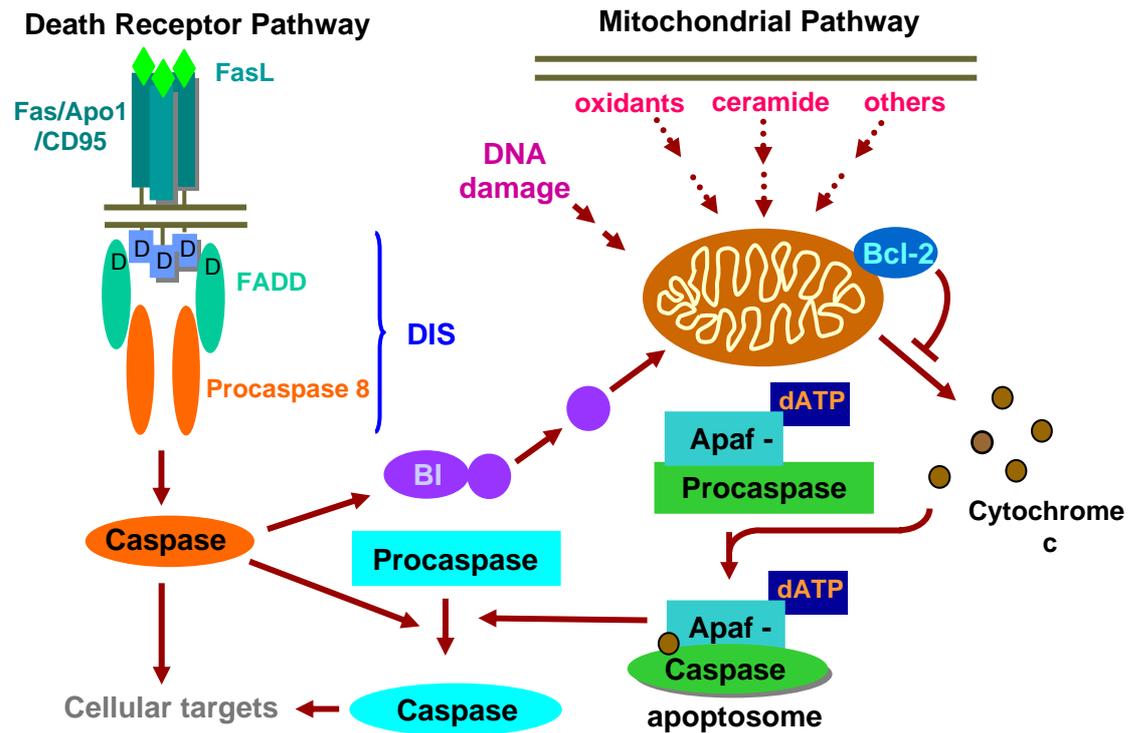


Figura I.3. Mecanismo apoptótico extrínseco e intrínseco

(Hengartner, M.O. 2000. *Nature*. 407:770. Green, D. and Kroemer, G. 1998. *Trends Cell Biol.* 8:267.)

1.4.1.1 Mecanismo extrínseco

El mecanismo extracelular consiste en la existencia de un estímulo externo que actúa sobre un receptor de la membrana celular que puede encadenar después el proceso apoptótico.

Los inductores apoptóticos pueden ser activadores fisiológicos, activadores dañinos (tóxicos) o agentes terapéuticos.

- Los activadores fisiológicos son: neurotransmisores (glutamato, dopamina, N-metil D-aspartato), factores de crecimiento, glucocorticoides, Ca^{2+} , la familia de las TNF (TNF, ligando Fas), $TGF\beta$.
- Los activadores tóxicos o que expresan un daño celular son: toxinas bacterianas, infecciones virales, linfocitos T citotóxicos, heat shock protein, oncogenes *myc*, E1A, p53, radicales libres de oxígeno etc.
- Entre los agentes terapéuticos se nombran: radiaciones γ , las radiaciones UV, drogas quimioterapéuticas (cisplatino, doxorubicina, bleomicina, citosina, arabinósido, vincristina, metotrexate, etc).

Granzima B es otro factor activador. Es una serín proteasa, formada por 247 aminoácidos, que se encuentran en los gránulos citotóxicos secretados por las células “natural killer” y los linfocitos T citotóxicos. Puede inducir la apoptosis tanto *in vivo* como *in vitro* activando las caspasas 3 y 7, o induciendo la activación de las caspasas 4, 5, 6 y 9. Puede cortar sustratos de tipo PARP, DNA-PK2 y DFF 45/ICAD, sobre los cuales actúan las caspasas (Pardo, 2004). Recientemente se ha descrito que es capaz de inducir la liberación de citocromo c de la mitocondria independientemente de la vía de las caspasas (Waterhouse, 2005).

Catepsina es una proteasa lisosomal que activa la apoptosis; es importante en el “turn-over” proteico, activa algunos precursores enzimáticos e interviene en el proceso de invasión tumoral y metástasis (Fehrenbacher, 2005). Se sintetiza como pre-proenzima y se activa después de una glicosilación y una fosforilación. Factores oncogénicos o quimiotácticos influyen su liberación desde los lisosomas al citosol o la secreción de la proenzima en la matriz extracelular. Hay distintos tipos de catepsina pero solo la B actúa sobre la procaspasa 1 y 11 e induce apoptosis permeabilizando la célula (Emert-Sedlak, 2005).

Los receptores implicados en apoptosis pueden ser: dependientes de una señal externa llamados “receptor mediated signaling” o independientes de ésta y se llaman “receptor independent signal”.

- Receptores mediante un señal son los de tipo Fas (CD95, Apo-1) y TNF-R1 (Tumor Necrosis Factor Receptor 1).
- Receptores independientes de una señal es la familia de los TRAIL (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand) tipo DR4 (Apo-2) y DR5, específicos para las células tumorales y neuronales.

Cada tipo de receptor tiene una estructura específica correspondiente que se llama “ligando de muerte” (death ligand). Así se definen los FasL, TNF α , etc.

Cuando los ligandos específicos reconocen estos receptores y se unen a ellos, se produce una trimerización de la parte extracelular del receptor, que se transmite a la parte interna o “DD”, dominio de muerte (DD-death domain) y se produce la aproximación intracelular de unas moléculas puente específicas de cada receptor que interaccionan con ellos.

Para los receptores Fas (Figura 1.4.) y DR4 la molécula puente se denomina FADD (Fas Associated Death Domain protein) y esta constituida por una región DD (homologa al DD receptor) y una región DED (Death Effector Domain) el dominio efector de la muerte, que va interaccionar con las caspasas.

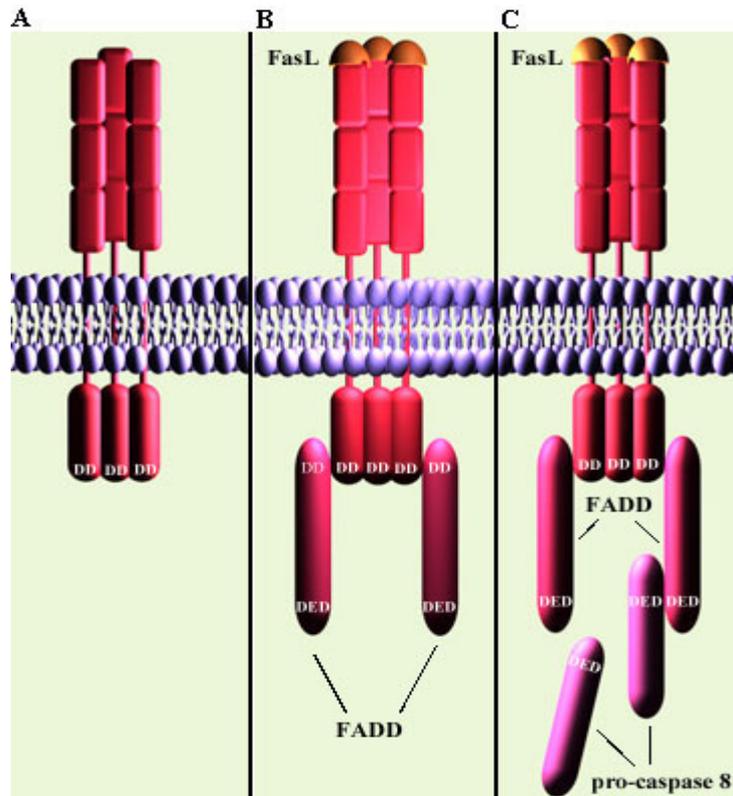


Figura I.4. Receptor Fas y su vía de señalización

Para los receptores TNF-R1 y DR3, la molécula puente es más compleja y se llama TRADD (TNF-R Associated Death Domain) y puede interactuar con FADD y ésta con la caspasa (enzima proteolítica), o puede interactuar con RIP (Receptor Interacting Protein) que a su vez pone en marcha el proceso apoptótico por la vía de las caspasas (Figura I.5.)

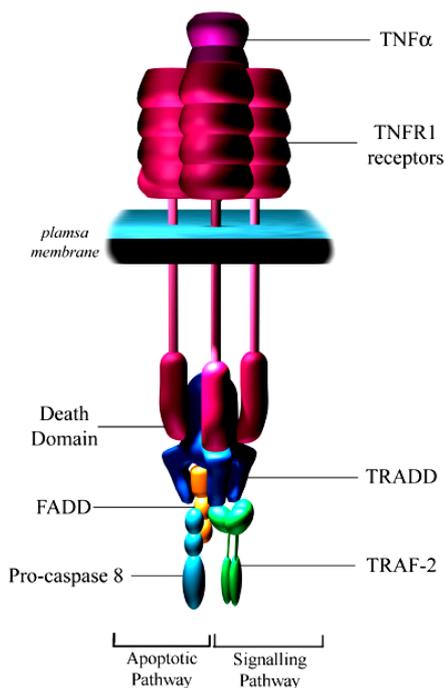


Figura I.5. Receptor TNF-R1 y su vía de señalización

El Fas/Fas L junto con FADD y con la procaspasa 8 (situada en el citosol), forma el compuesto DISC (Death Inducing Signal Complex). Bajo un estímulo externo, la procaspasa 8 se autoactiva y activa sobre: la caspasa 3 que va a activar la fragmentación del DNA, y actúa también sobre el Bid citoplasmático. El Bid se fragmenta en el tBid (15kDa, C-terminal) y otro fragmento de 11kDa (N-terminal). El tBid se transloca en la mitocondria y determina la liberación de factores proapoptóticos mitocondriales.

Por la vía inductora extracelular descrita anteriormente se inducen 3 tipos de apoptosis:

1. Sobre la eliminación de células T maduras al final de la respuesta inmune.
2. Muerte de células “dianas” infectadas por virus o células cancerígenas mediante los linfocitos T citotóxicos y a través de células “natural killer” (NK).
3. Muerte de células inflamatorias en los lugares de inmunidad.

1.4.1.2 Mecanismo intrínseco

La muerte celular programada es un proceso controlado por factores efectores, inhibidores o potenciadores que pueden proceder de dentro de la célula.

Los reguladores del ciclo celular pueden actuar como estímulos internos en la activación del proceso apoptótico. Manteniendo el equilibrio entre mitosis y apoptosis asegurando la homeostasis de la arquitectura tisular. Los reguladores actúan en los puntos críticos del ciclo celular: entre la fase G y la fase S, en la fase S, durante las fases G2 y entre G2 y la fase M. En estos puntos se detiene la célula para reparar el daño celular o sufrir apoptosis si la reparación del DNA no es posible.

1.4.2. Fase efectora

Es la fase de ejecución, es el compromiso hacia la muerte, el punto de “no retorno”.

La clave de ésta fase es la mitocondria dentro de la cual se produce:

- La interrupción del transporte de electrones en la fosforilación oxidativa y en la producción del ATP.
- Liberación de proteínas que disparan la activación de las proteasas de la familia de las caspasas, al citocromo c.
- Liberación de calico.
- Alternación del potencial redox.

La fase efectora se caracteriza por el incremento de Ca^{2+} libre intracelular debido a un influjo extracelular o a la salida de Ca^{2+} desde la mitocondria o retículo endoplásmico. El incremento de Ca^{2+} determina la activación de endonucleasas y proteasas apoptóticas (caspasas). Las caspasas se encadenan y forman una cascada apoptótica, cortando moléculas como actina, laminina nuclear, la proteína quinasa C y polimerasas; inactivan proteínas como Bcl-2 que protegen las células vivas de la apoptosis. El incremento de Ca^{2+} libre y de la proteína Bax, permeabiliza la membrana mitocondrial. Ésta va a perder su potencial transmembranario y empieza la liberación de compuestos intramitocondriales: el citocromo c o el AIF (factor inductor de apoptosis), radicales libres de oxígeno y de nitrógeno, además de Ca^{2+} . También se detiene la síntesis de ATP. El citocromo c junto con Apaf-1 y la procaspasa 9 forma el apoptosoma que va a activar la caspasa 9 (Figura I.6.).

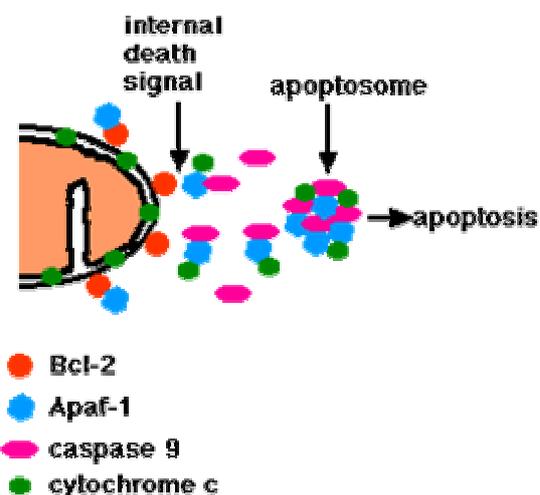


Figura I.6. La formación del apoptosoma

La caspasa 9 va a activar la procaspasa 3 que después determina la fragmentación del DNA nuclear. Ahora se activan algunos genes como *c-myc*, el p53, genes de la familia Bcl2, nur 77, erg-1, RP-2, RP-8 (Wei,2000).

Un segundo mensajero implicado en esta fase es la ceramida, describiéndose una vía apoptótica llamada "vía de la ceramida". La ceramida es un glucolípidio sintetizado en el retículo endoplásmico y en las mitocondrias, con una concentración mayor junto a la porción interna de la membrana plasmática. Se activa por vía Fas, TNF directamente por glucocorticoides o por la esfingomielinasa ácida (enzima activada por agentes oxidante, radiación UV, calor) (Tomassini y Testi, 2002). La ceramida actúa sobre la mitocondria produciendo cambios iónicos entre la matriz de la mitocondria y el citosol citoplasmático, determinando la liberación del citocromo c (Shimeno y colab, 1998; Siskind y colab, 2000).

Otra vía apoptótica en esta fase es la de las MAPKasas (ver capítulo MAPK).

La célula tiene mecanismos de supervivencia que interfiere con el mecanismo apoptótico inhibiéndolo. Una vía es de la enzima fosfoinositol-3 kinasa (PI3K) (Kulik y Weber 1998) que se activa por la proteína tirosina kinasa o por receptores asociados a las proteínas G. La PI3K activa indirectamente a la Akt (una Ser/Tre kinasa). Akt va a inhibir al Bad, factor proapoptótico. La fosforilación del Bad por Akt genera un sitio de unión para las proteínas que secuestran a Bad en el citosol, impidiendo la translocación de Bad a la membrana mitocondrial. Akt puede también bloquear directamente la activación de las caspasas mediante la fosforilación de la caspasa 9 (Song, 2005)

Otra vía de supervivencia celular es la vía de las Ras/Raf/MAPK. Este mecanismo implica la fosforilación y activación de kinasas. Si la vía proapoptótica es de la JNK y p38, la antiapoptótica es la ERK, que recibe señales extracelulares. La ERK estimula la RSK, una kinasa ribosómica S6 de 90kDa. RSK fosforila a Bad e impide la translocación mitocondrial de este; o bien actúa estimulando a Bcl-XI (proteína antiapoptótica) que a su vez inhibe la activación de la caspasa 9 (Chang, 2003).

1.4.3. Fase de degradación

Durante esta fase se pueden distinguir, desde el punto de vista morfológico 3 etapas distintas que tiene como resultado final la formación de cuerpos apoptóticos (Figura 1.7).

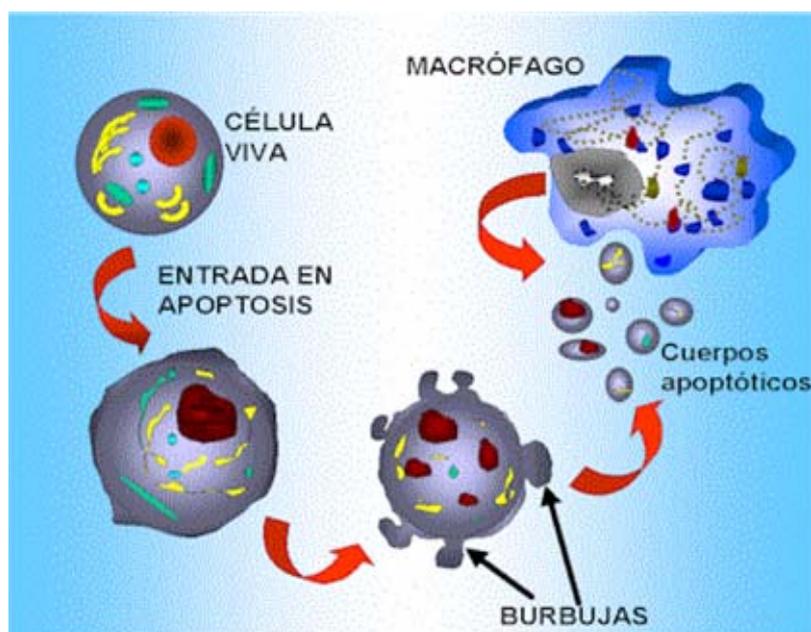


Figura 1.7. Cambios morfológicos durante apoptosis

En una primera fase comienza a redondearse la célula dentro del tejido y aparecen los primeros cambios estructurales en la membrana plasmática. Esto hace que la célula adquiera un aspecto típicamente apoptótico caracterizado por la disminución de tamaño, el aislamiento respecto de las células que la limitan (en el caso en que sea adherente) y el redondeamiento de su forma.

Una segunda fase aparecen los siguientes cambios morfológicos:

- Cambios nucleares

La cromatina se condensa y se localiza en la cara interna de la envoltura nuclear (Figura I.8). La base química de este proceso es la solubilización de la lamina nuclear por proteólisis irreversible. La lámina nuclear es una glicoproteína que se asocia con la membrana nuclear interna y organiza el nucleoesqueleto.

La membrana externa se arruga y puede aparecer marcadamente dentada

El nucleolo se disgrega y aparecen masas compactas.

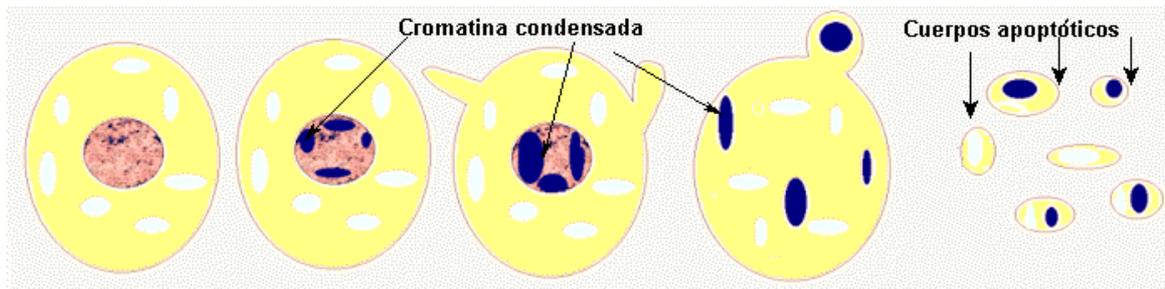


Figura I.8. Cambios nucleares durante la degradación apoptótica

- Cambios citoplasmáticos

El citoplasma se condensa y se deforma debido a la disgregación de los componentes del citoesqueleto, que sufre una hiperfosforilación o proteólisis por la acción de las caspasas.

- Cambios en la membrana plasmática

Se pierde la simetría de los fosfolípidos. Se expone en la cara externa de la

membrana residuos intracelulares de fosfatidilserina, el factor quimiotáctico para los macrófagos.

Otra alteración de la membrana plasmática es la formación de burbujas “blebs”, debido al cambio del citoesqueleto por la proteólisis (Figura I.9)

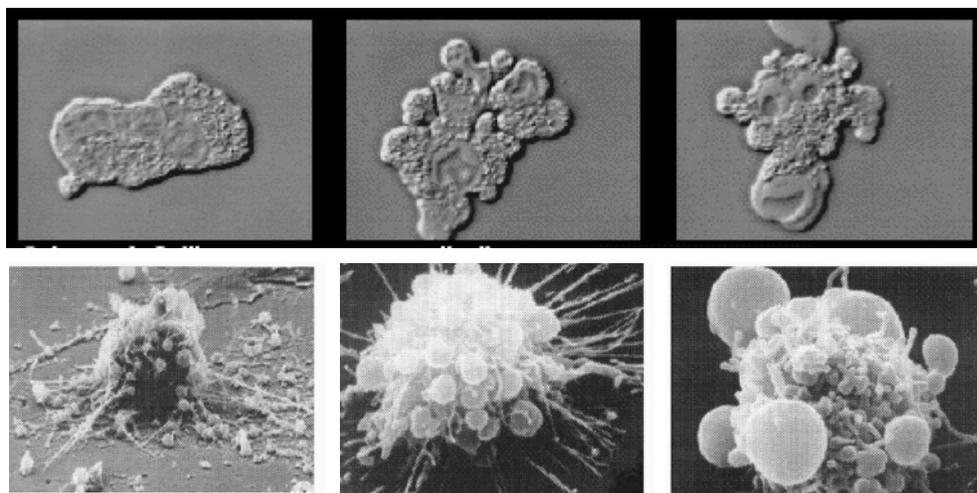


Figura I.9. Cambios de la membrana plasmática durante apoptosis

En la segunda fase de degradación las células que se mueren por apoptosis se separan de las células vecinas, por la alteración de estructuras de comunicación intercelulares.

En la tercera fase de degradación, al nivel de núcleo el DNA se fragmenta por una endonucleasa que se activa por la vía de las caspasas. Ésta endonucleasa actúa a nivel internucleosomal dando lugar a nucleósidos de 180-200pb y múltiplos de esos, con la formación electroforética característica de la “escalera” apoptótica.

Una vez se ha fragmentado el DNA intervienen mecanismos que intentan reparar el daño (Figura I.10). Por lo tanto se activa la proteína p53 que intenta reparar el daño o si no puede decide la muerte de la célula por apoptosis. La intervención de la PARP (enzima poly ADP-ribose polimerasa) y de la DNA topoisomerasa II es eliminada por la intervención de las caspasas, en especial la caspasa 3, que las inactiva y el proceso apoptótico se desarrolla.

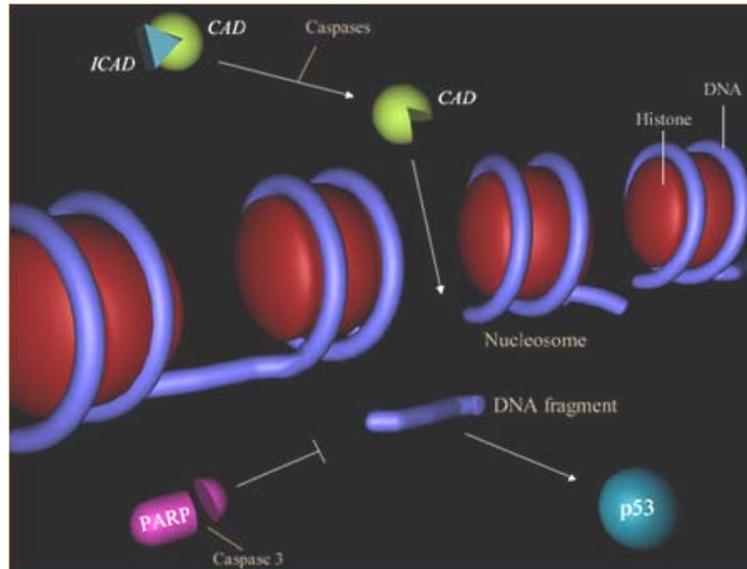


Figura I.10. Fragmentación del DNA nuclear durante apoptosis

Al final, la célula se fragmenta en cuerpos apoptóticos, sin la lisis de la membrana plasmática o de algunos orgánulos intracitoplasmáticos.

Los macrófagos (en los tejidos con altas tasas de apoptosis) o las células vecinas (en los tejidos con bajo índice de apoptosis) limpian todos los fragmentos apoptóticos sin ninguna reacción inflamatoria.

Existen 3 mecanismos propuestos (Figura I.11):

1. La unión de los carbohidratos de superficie de una célula, se unen a unas determinadas lectinas de otra célula.
2. El segundo mecanismo se describió a partir de estudios de inhibición dependiente de carga eléctrica, del reconocimiento de células apoptóticas. Se ha identificado un receptor en la superficie del macrófago que es la integrina $\alpha 4\beta 3$, que junto con CD36 por intermedio de una molécula puente denominada trombospondina (secretada y sintetizada por el macrófago), se une a una estructura aún por determinar en la célula apoptótica.
3. El tercer mecanismo es el de la pérdida de la asimetría de fosfolípidos, que provoca la exposición al exterior de la célula a la fosfatidilserina que interacciona con un receptor de la superficie del macrófago.

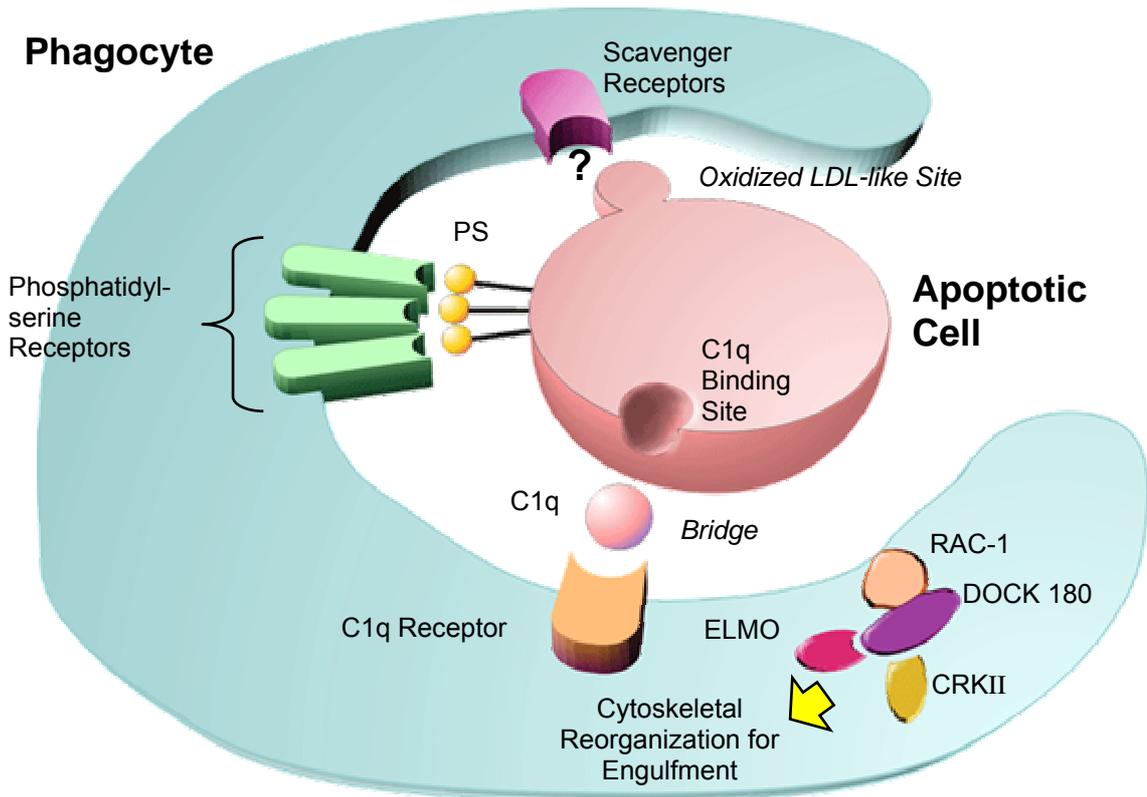


Figura I.11. Fagocitosis de los cuerpos apoptóticos

(Savill, J. and Fadok, V. 2000. *Nature*. **407**:784. Canradt, B. 2002. *Nature Cell Biol.* **4**:E139).

2. REGULACION DE LA APOPTOSIS

La regulación de la apoptosis se realiza en función del tipo celular, del microambiente, de las características génicas del tipo celular y del estadio de diferenciación celular.

Implica la participación de múltiples vías, las cuales están controladas por distintos factores:

- Inductores, como es la interacción entre el receptor y su ligando específico, la cual se regula mediante los niveles de los ligandos; las caspasas
- Efectores intra y extracelulares, como el p53, c-myc, nur77, erg-1, ICE, RP-2, RP-8, caspasas efectoras, MAPK, NFκB etc.
- Inhibidores, como el Bcl-2 que regula a la baja la apoptosis mediada por p53 y c-myc, como también el Bcl-XL
- Potenciadores como el Bax que potencia la apoptosis tras unirse al Bcl-2 y suprimir su efecto inhibitor en la apoptosis; también el Bcl-xs

En la mayor parte de los mecanismos reguladores de la apoptosis la mitocondria juega un papel clave.

2.1. Caspasas

2.1.1 Generalidades

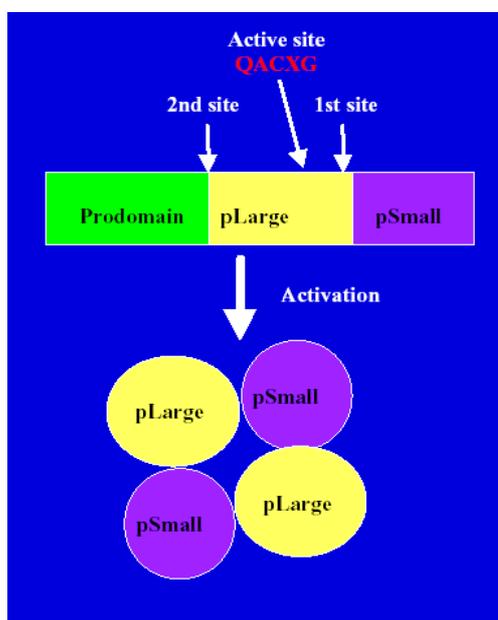
Las caspasas son una familia de proteasas que forman una secuencia de activaciones en cadena durante la fase de ejecución en el proceso apoptótico. Tanto la vía extrínseca como la intrínseca anteriormente comentadas tienen en su desarrollo a las caspasas.

Se describen por primera vez en los estudios realizados en el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, cuando se define la CED-3, que tiene como homólogo en los mamíferos a la enzima convertora de interleukina-1 β (ICE, la caspasa 1) y la proteína CPP32 (caspasa 3)(Creagh, 2001). Hoy en día se conocen 14 caspasas (Denault y Salvesen, 2002).

El nombre de esta familia fue dado en 1996. La palabra CASPASAS deriva del término Cistein-aspartato proteasa y el número indica el orden cronológico de su descubrimiento. La “C” representa la actividad cistein proteásica y la “aspase” se refiere a la habilidad de estas enzimas de cortar a sitios residuales de ácido aspártico (corta una cisteína precedida por un ácido aspártico)

2.1.2 Estructura de las caspasas

Las caspasas tienen en sus estructuras 3 unidades (Figura I.12):



- un predominio situado en el fragmento N terminal,
- una subunidad mayor de 20kDa (pLarge)
- otra subunidad menor de 10kDa (p Small).

Figura I.12. Subunidades estructurales de las caspasas

La unidad mayor y la menor constituyen el dominio catalítico.

La longitud del predominio varía mucho de una caspasa a otra, y va a condicionar el peso molecular. Así, las de masa molecular relativa mayor a 40kDa son caspasas de alto peso molecular y las de menos de 40kDa, de bajo peso molecular. En su estructura contiene el dominio DED o CARD.

A nivel de la unión de las unidades existen residuos de aspartato. La actividad proteolítica de las caspasas se ejerce en los puntos adyacentes a la región de unión, las caspasas son proteínas ricas en residuos cisteína.

La Figura I.13 representa la relación estructura – función dentro de la cascada apoptótica:

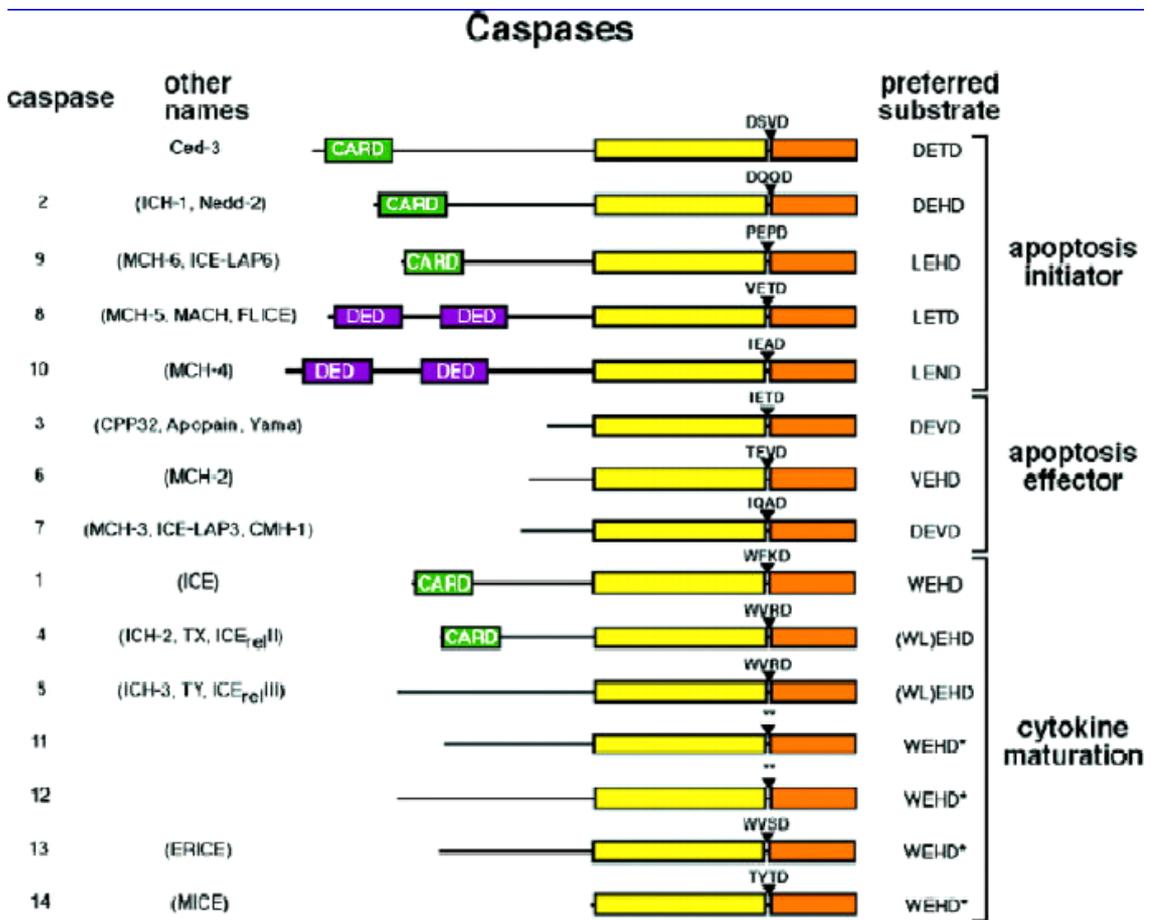


Figura I.13. Familia de caspasas

(Apoptosis Signaling: Annu Rev Biochem V69, pg.217-245, 2000)

2.1.3. Clasificación de las caspasas

Las caspasas se clasifican en:

- Caspasas iniciadoras que tienen un alto peso molecular y reciben señales apoptóticas. Son las caspasas 8, 9, 2 y 10.
- Caspasas efectoras tienen un bajo peso molecular y son activadas por las caspasas iniciadoras. Proteolizan sustratos celulares provocando la desorganización de la célula y los cambios morfológicos típicos de la apoptosis (Thornberry y Lazebnik, 1998).

2.1.4. Síntesis y activación de las caspasas

Las caspasas se sintetizan como proenzimas inactivas o procaspasas. La activación se realiza por proteólisis, el corte produciéndose entre el dominio catalítico y el predominio (Figura I.12). Las dos unidades de 20kDa y 10kDa se dimerizan, después se tetramerizan resultando un heterotetrámero.

Las caspasas 8 y 10 denominadas críticas (Srinivasula,1996;Muzio,1996), activa a los demás caspasas, pero tienen también un predominio “FADD like” que permite su activación tras un estímulo externo.

Una caspasa una vez activada, actúa sobre las caspasas efectoras e inicia la cascada enzimática. La activación de las caspasas puede ser por:

- A. Receptores de superficie celular o bien por
- B. “Disparadores” relacionados con la integridad mitocondrial.

Lassus 2002 demuestra que las citocinas y los factores de estrés tienen una vía distinta, activando la caspasa 2 antes que la permeabilización mitocondrial se produzca. Además, la granzima B producida por los linfocitos T citotóxicos es capaz de activar directamente las caspasas 3, 7, 8 y 10.

A. Activación por receptores de superficie

Los receptores de superficie de tipo Fas, TNF, TRAIL tienen un dominio extracelular rico en cisteínas constituido por 68 amino ácidos. Este dominio es sensible a los factores externos (Figura I.14). Cada receptor se va a unir a un ligando específico: FasL, TNFL, Apo2L y determina la trimerización del receptor. La región interna (citoplasmática) de cada receptor tiene el dominio DD. Una vez activado, el DD va a reclutar una proteína adaptadora (FADD o TRADD); que tiene

un dominio DD idéntico al receptor en el lado C-terminal, mientras que con lado N-terminal que lo representa el dominio DED (*death effector domain*), va a reclutar la procaspasa 8 o la 10. Por la unión de la procaspasa 8 con el complejo receptor se forma el compuesto DISC (death-inducing signal complex). Se produce después la autoproteólisis de la procaspasa 8, con la formación del heterotetrámero (dos subunidades pequeñas y dos grandes)

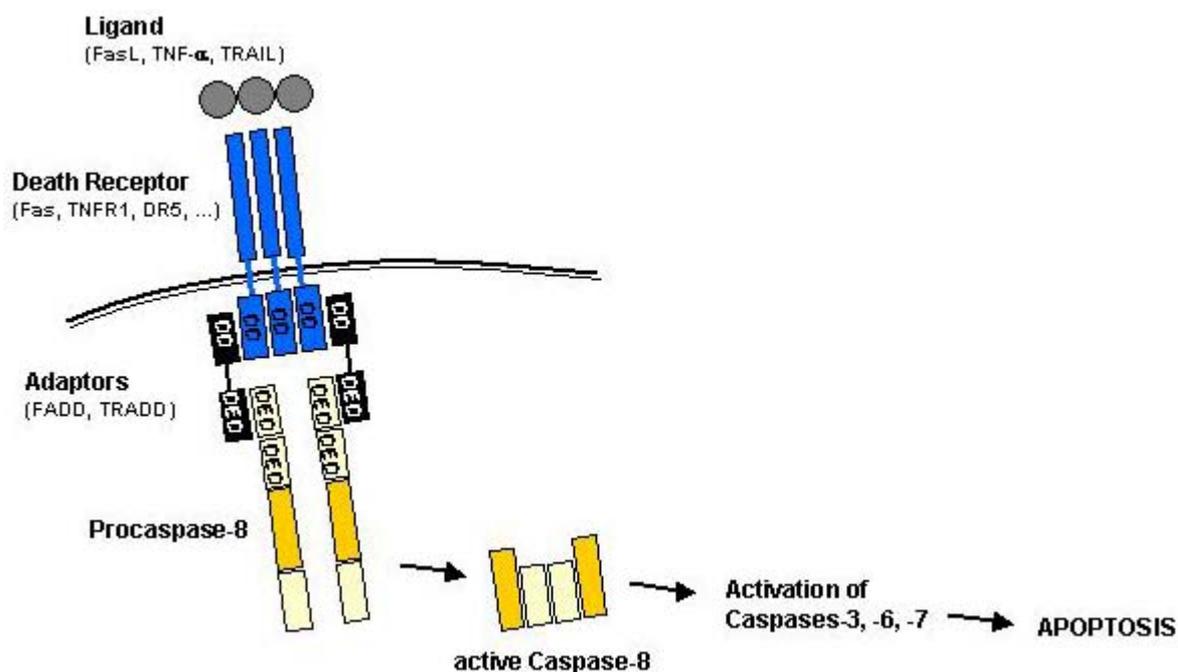


Figura I.14. Activación de la caspasas 8 por vía receptores de superficie (extrínseca) (*ApoReview, Introduction to Apoptosis-Andreas Gewies-2003*)

Existen 3 mecanismos implicados en la regulación de la vía de activación por receptores de superficie (extrínseca):

- 1) Se definen unos mecanismos que van a inhibir la fijación de la procaspasa. Los primeros descritos fueron las proteínas vFLIP (virales FADDlike ICE inhibitory protein) que contienen 2 dominios DED, que van a competir con los DED de la proteína adaptadora e impiden la formación del DISC. Se ha descrito después el homólogo para los mamíferos, el cFLIP, conocido también como 1-FLICE, FLAME, CASH or MERIT (Srinivasula, 1997).
- 2) Otro mecanismo es específico a los receptores TRAIL es debido a la expresión de DcTRAIL (Gostein, 1997; Ashkenazi, 1999). En condiciones normales en los tejidos humanos expresa DcR4 para TRAIL-DR4 y DcR5 para el TRAIL-DR5, mientras que en los tejidos

tumorales, con un incremento de la apoptosis la expresión disminuye (Ashkenazi y Dixit, 1998).

- 3) El tercer mecanismo es inhibir directamente a las procaspasas 8, 10. La proteína viral crm A (cytokine response modifier A) inhibe la autoactivación proteolítica de la caspasa 8 (Goswami, 2002) y también actúa sobre Bid, impidiendo su activación y así la liberación mitocondrial de citocromo c.

Se ha descrito también una proteína de 60kDa, la SODD (silences of death domains) (Harrington, 2000) que esta asociada al dominio DD del receptor TNFR1 e impide el contacto de las proteínas activadas con el receptor.

B. Activación de las caspasas por la mitocondria

Los principales factores que influyen esta vía, son los que regulan la liberación del citocromo c de la mitocondria en el citoplasma.

Por la acción del citocromo c y dATP la proteína Apaf-1 adopta una conformación heptamérica y forma el apoptosoma. La procaspasa 9 se fija en la región central del apoptosoma y se activa formando un dímero. Después va a activar las caspasas efectoras: la 3, 6 y 7 (Acehan, 2002). Estas rompen el complejo CAD/ICAD, con la liberación del CAD que va a fragmentar el DNA nuclear a nivel internucleosomal (Figura I.15).

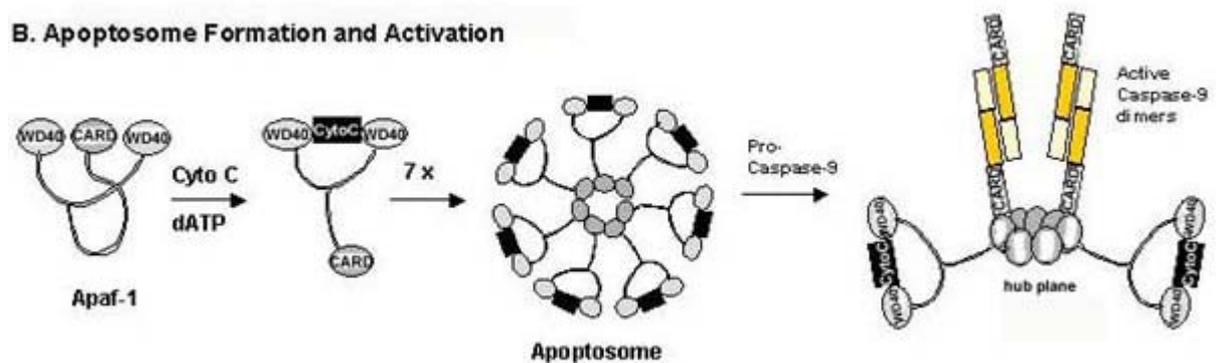


Figura I.15. La mitocondria active las caspasas por intermedio del apoptosoma (Andreas Gewies in 2003-ApoReview - Introduction to Apoptosis)

La activación de las caspasas por la mitocondria puede ser regulada por: miembros de la familia Bcl2 (Luo, 1998; Wang, 2001) , por IAP (Tenev, 2005; Richter, 2000) o algunos inhibidores peptídico de tipo Z-VAD-FMK, Ac-DEVD, Ac-YVAD (Malyshev, 2004)

2.1.5. Sustratos de acción de las caspasas

Se conocen unos 40 sustratos celulares para las caspasas. Una vez activadas las caspasas ejercen su actividad proteolítica sobre numerosas proteínas, a nivel nuclear o citoplasmático. Los efectos de las caspasas son evidentes en la fase de degradación de la apoptosis, cuando se producen cambios membrenarios, citoplasmáticos y nucleares.

Cuando el sustrato sobre cual las caspasas actúan es una enzima de actividad autorregulada, actúa de forma proteolítica, separando el dominio regulador y el dominio catalítico de la enzima. Es el caso de las enzimas reparadoras, replicadoras y de transcripción del DNA: DNA-PK, PARP y U1-70kDa.

- PARP es el sustrato proteolítico más característico de las caspasas. La molécula de PARP-116kDa, se rompe en 2 fragmentos: uno de 24 kDa- es el fragmento N-terminal que se fija al DNA y el otro 89kDa, el C terminal, el fragmento catalítico (Kaufmann, 1993). La caspasa típica que actúa sobre el PARP es la 3 (Casciola-Rosen, 1996). Otras, las caspasas 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, actúan solo en concentraciones altas (Gu, Sarnecki, 1995).

Las caspasas pueden inactivar sustratos que en condiciones normales inhiben la apoptosis: las proteínas Bcl2 y el ICAD, sobre el Rb. La inactivación de Rb determina también la regulación de otras proteínas relacionadas con el desarrollo de la apoptosis como sería la MDM2 (Janicke, 1996).

Las caspasas degradan moléculas implicadas en la estructura celular, provocando su desintegración estructural.

- Las caspasas actúan sobre la lamina nuclear, el componente proteico más importante de la membrana nuclear (Gridinger, 1996). La caspasa 6 rompe la lamina A (Takahashi, 1996)
- La gelsolina (24kDa) es una enzima responsable de la fragmentación regulada de los filamentos de actina, sobre la cual actúan las caspasas.
- Actúa sobre otras proteínas del citoesqueleto incluyendo la Gas2 (Brancolini, 1995) y fodrina (Vangs, 1996)

Las caspasas actúan sobre unas quinasas:

- La FAK (focal adhesión kinase) que es un componente de la vía de traducción de las integrinas (Kurenova, 2004). Esta kinasa está implicada en

la muerte celular, en el cáncer de ovario y que el proceso esta mediado por la caspasa 3 y la activación está modulada por XIAP.

- Sobre la proteína PKC δ (proteína kinasa C δ). La PKC δ se activa catalítico por la caspasa 3 y se fragmenta. La sobreexpresión de estos fragmentos enzimáticos se correlaciona con la condensación de la cromatina, la fragmentación nuclear durante apoptosis (Emoto, 1995).

2.2. Familia Bcl-2

El gen Bcl-2 fue descubierto por primera vez en el linfoma humano de células B. La familia Bcl-2 contiene los principales reguladores intracelulares de la apoptosis, siendo éstos asociados a diferentes membranas celulares como el retículo endoplásmico, mitocondria y núcleo. Los miembros de la familia Bcl2 son capaces de alterar el funcionamiento de estas membranas, cambiando el potencial de membrana y facilitando la salida o la entrada de iones. Pueden formar canales propios iónicos o puede influir en la actividad de unas proteínas que forma un canal ya existente.

La familia Bcl-2 contiene hasta el momento 34 miembros que se pueden dividir en tres grupos conforme sus estructuras (Figura I.16):

- I grupo – es el grupo que conserva todos los 4 dominios de la familia-Bcl-2 homology (BH):BH₁;BH₂;BH₃;BH₄.
- II grupo - es el grupo que contiene solo 3 dominios: BH₁; BH₂; BH₃
- III grupo - es el grupo que tiene solo el dominio BH₃

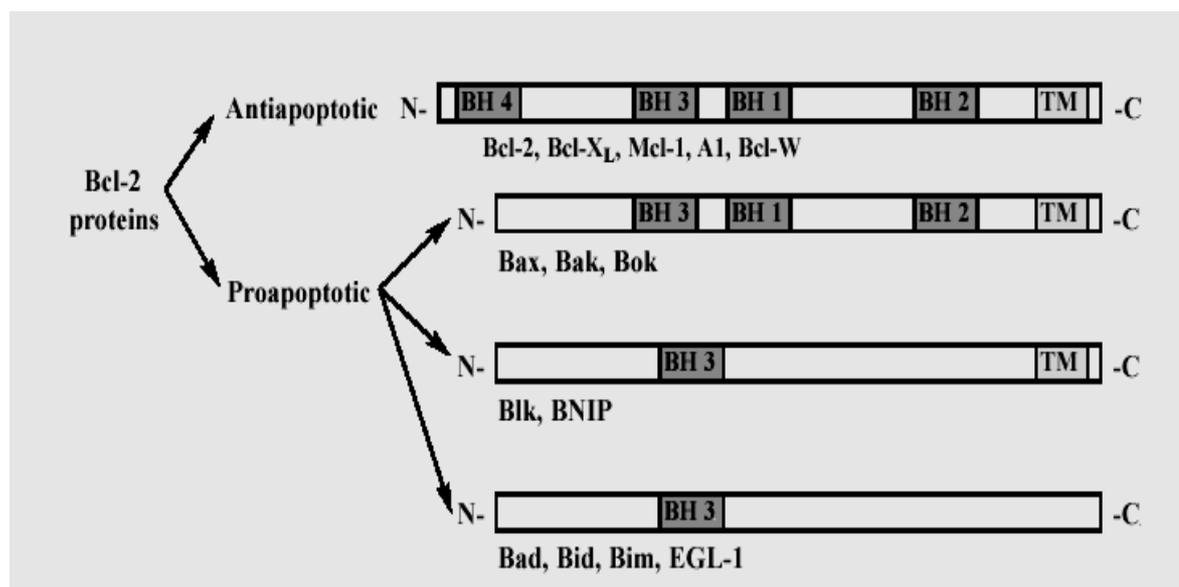


Figura I.16. Clasificación de las proteínas Bcl-2 (Burlacu J. Cell.Mol Med.Vol7 No3.2003)

Parece que existe un balance entre los factores pro y antiapoptóticos de la familia Bcl-2, que controla la liberación del citocromo c de la mitocondria. Se describen dos mecanismos: uno por cual se influye la permeabilidad del poro PT y otro independiente de la permeabilización del mismo.

a) Los factores proapoptóticos determina la apertura del poro de dos maneras (Figura I.17):

- interaccionando directamente con componentes del PT, como es el caso del Bax que se asocia a la ANT (Marzo, 1998) o a VDAC(Narita, 1998; Tsujimoto 2000)
- regulando la actividad de los factores antiapoptóticos, formando compuestos heterodiméricos de tipo Bcl2-Bax o Bcl2-Bak, tras una dimerización.

b) La vía independiente de la permeabilización del poro PT implica a los miembros de la familia Bcl-2 como: Bak, Bax, Bcl-XL e incluso Bcl-2, por dimerización, forman poros en la membrana mitocondrial, liberando factores mitocondriales implicados en apoptosis.

Además, los miembros antiapoptóticos secuestran a los proapoptóticos, uniéndose al dominio BH3, e impiden su activación, como es el caso del Bax y Bak

Aparte de sus efectos mitocondriales, Bcl-2 controla de forma indirecta la activación del apoptosoma.

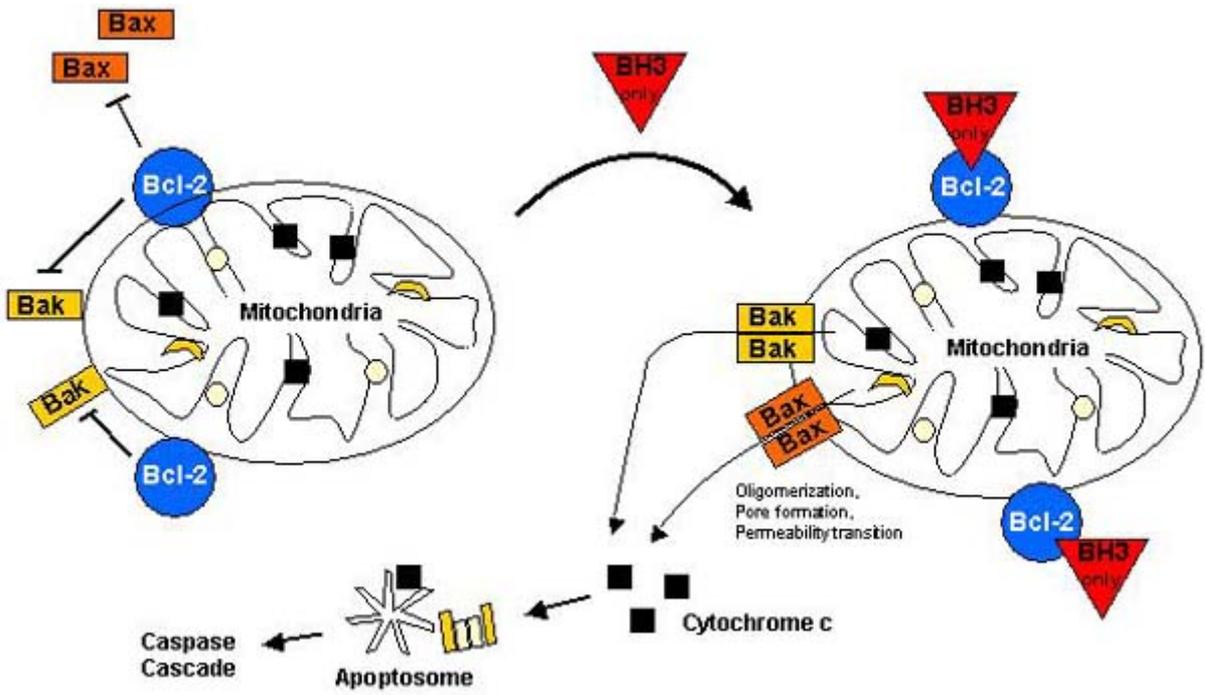


Figura I.17. Control de la liberación del citocromo c por la familia Bcl-2

(Burlacu J. Cell.Mol Med.Vol7 No3.2003)

Una vez producidos los Bcl-2 se activan por: dimerización, translocación o fosforilación (Figura I.18)

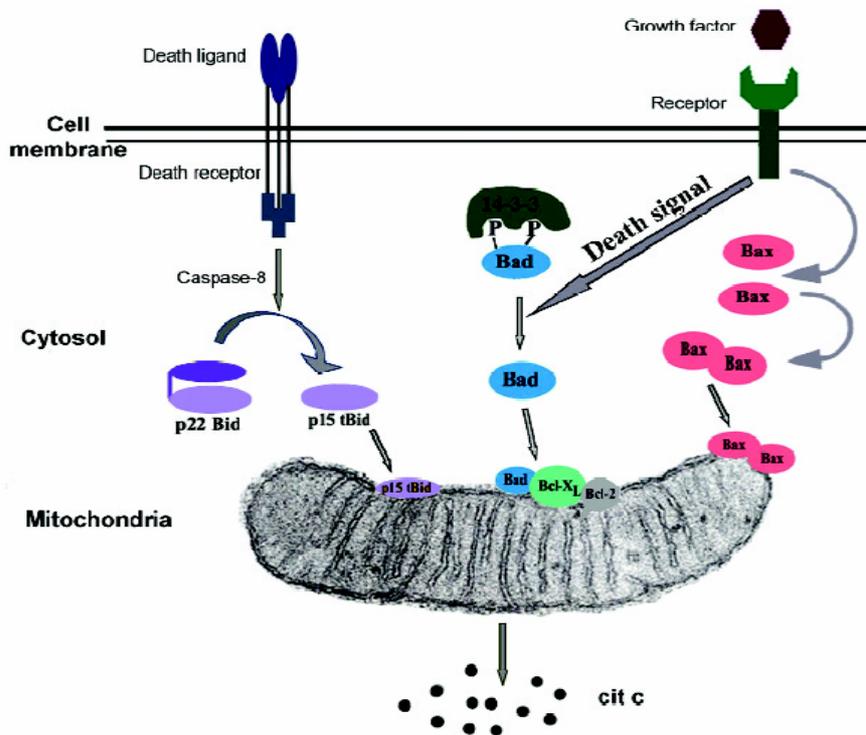


Figura I.18 Mecanismo de fosforilación, ruptura proteolítica y la vía caspasa independiente en la liberación del citocromo c de la mitocondria

(Burlacu J. Cell.Mol Med.Vol7 No3.2003)

Los más importantes y mejor estudiados representantes de la familia son: Bcl-2, Bcl-X,

Bcl-2

El Bcl-2 (B cell leukemia/lymphoma 2 genes) fue el primer proto-oncogen detectado y fue asociado con procesos malignos de las células B. Durante la maduración de las células B puede ocurrir una translocación cromosómica 14,18 en el gen Bcl-2, que provoca un aumento en la expresión de la proteína citoplasmática, que origina inhibición de la apoptosis en células B y determina la supervivencia de la célula transformada.

Bcl-2 por su localización en la cara externa de la membrana mitocondrial puede inhibir la liberación de factores apoptóticos desde la mitocondria, tales como el citocromo c; es una proteína antioxidante que podría inhibir la apoptosis provocada por agentes oxidantes y por las propias especies reactivas del oxígeno. Puede bloquear la acción proapoptótica de otros miembros de la familia Bcl-2, formando dímeros con ellos. Pueden secuestrar e inhibir la acción de algunos factores citoplasmáticos imprescindibles para la posterior activación de las caspasas efectoras. Debido a su situación en las membranas del retículo endoplasmático, impide la elevación del Ca^{2+} intracelular que se da durante la apoptosis. Se puede asociar al Apaf-1 (apoptosis activating factor 1) impidiendo la liberación del citocromo c y la activación de la caspasa 9 y 3.

Bcl-X

Es un miembro de la familia Bcl-2 que es un regulador de la apoptosis de la forma independiente del Bcl-2.

Existen 2 isoformas de esta clase: la larga- Bcl-XL, que es similar al Bcl-2 en tamaño y estructura y la isoforma pequeña Bcl-XS. Con una estructura que contiene los dominios BH1 y BH2, se expresa en células con un alto recambio como los linfocitos T helper y citotóxicos.

Interviene en la regulación de la apoptosis debido a agentes quimioterápicos, por radiación o bien por ROS.

El Bcl-XL está ampliamente expresado en sistema nervioso (Gonzalez, 1995). Su acción antiapoptótica consiste en interaccionar con la proteína Apaf-1, bloqueando la formación del complejo citocromo c-Apaf-1.

El Bcl-XS puede unirse al Bcl-2 impidiendo la acción de este mismo sobre el Bax (Burlacu 2003)

2.3. MAP Kinasas

2.3.1. Generalidades

Mitogen –Activated Protein Kinases (MAPK) es una familia de Ser/Thr protein kinase que se ha conservado en los eucariotas, está implicada en la proliferación, diferenciación, movimiento y muerte celular.

Las MAPKs son estructuras proteicas pequeñas que se encuentra en el citoplasma de distintas células. Están formadas por 7 alpha hélices, 7 laminas tipo beta y un solo lazo de activación, tal y como se demuestra en la Figura I.19 (Vitale2000). Existen tipos distintos de MAPK pero la estructura básica no difiere mucho de un tipo a otro.

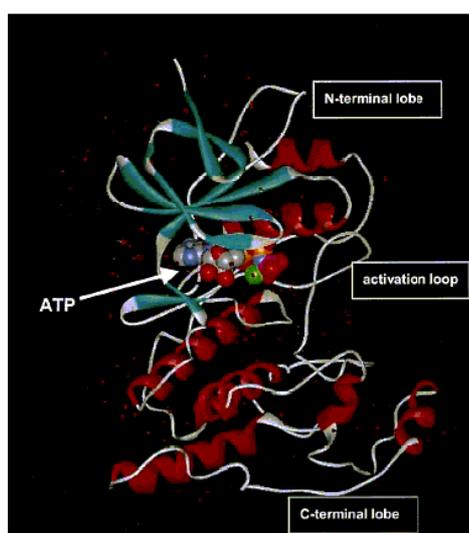


Figura I.19. Estructura tridimensional de las MAPKs (Vitale, 2001, Nature, 414, 229-233)

La cascada de señalización de las MAPK está organizada de forma jerárquica en tres pasos, regulada por fosforilaciones y desfosforilaciones en residuos de serina y/o treonina (Figura I.20). Las MAP Kinasas están fosforiladas y activadas por las MAP Kinasas Kinasas (MAPKKs o MEK), cuales son fosforiladas y activadas por MAP Kinasas Kinasas Kinasas (MAPKKKs o MEKK). Las MAPKKKs se activan interaccionando con una familia de pequeñas GTP-asas y/o con otras proteínas kinasas que conectan las estructuras MAPK con los receptores de superficie o estímulos externos.

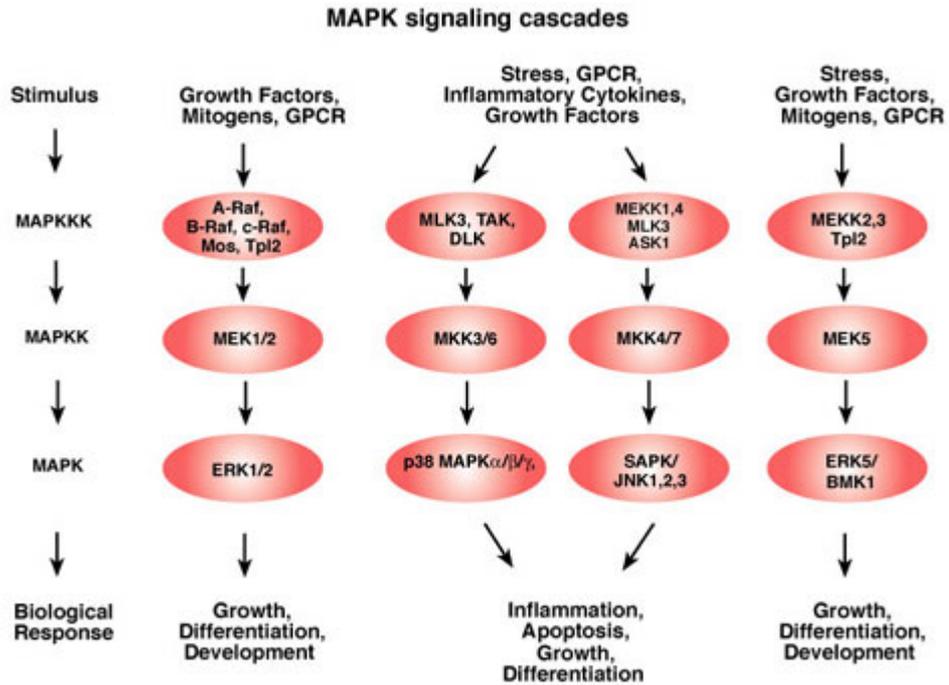
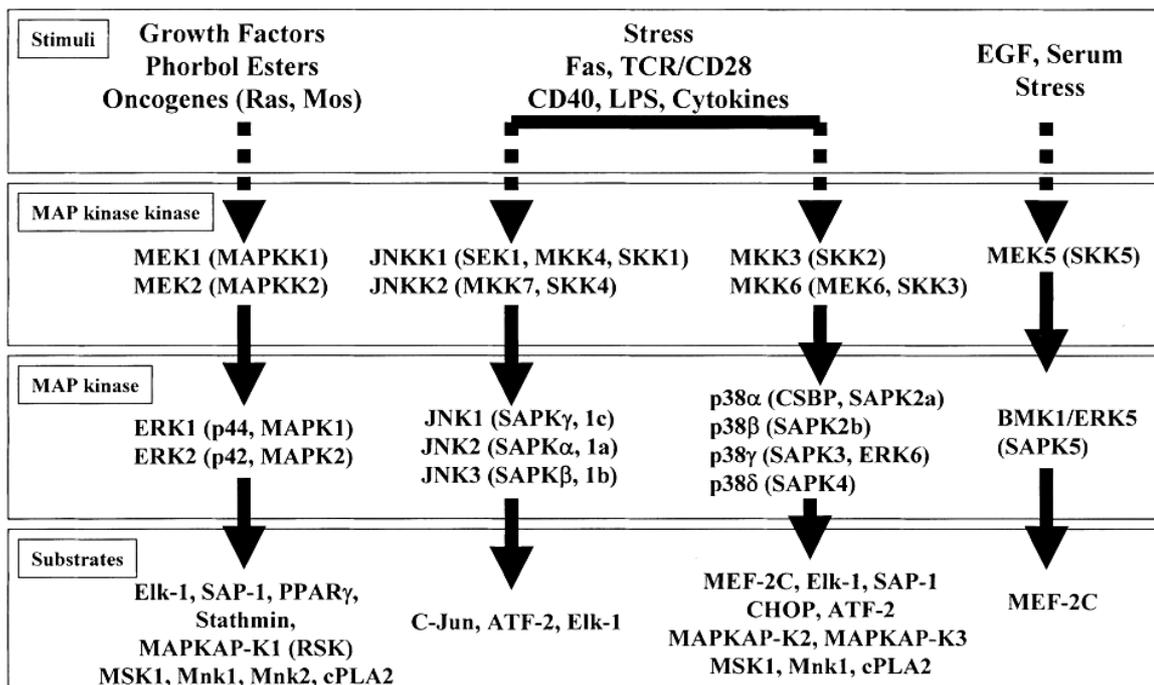


Figura I.20. Cascada de señalización MAPK (*Cell Signaling web*)

Existen 4 subfamilias de MAP Kinasas:

- p38/RK/CSBP MAP Kinasa (p38),
- ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase)
- JNK/SAPK (c-Jun NH2-terminal Kinase/
- BMK1/ERK5 (big MAP kinase-1) (1-12 cellsignaling), (Tabla I.1)

Tabla I.1. Miembros de la familia MAPK-*asas*



El prototipo de esta familia es la ERK con sus representantes ERK1 y ERK2, conocidos también como p44 y p42 MAP kinases. (English, 1999; Boulton, 1990,1991). La ERK1 y ERK2 son kinasas similares estructural y funcionalmente (English, 1999; Derijard, 1994; Sanchez, 1994). Existe una nueva subfamilia de ERK descritas: ERK3 (Zhu, 1994), ERK5, ERK7, ERK8 (Abe, 2002) tienen una homología estructural con la ERK1/2 pero tienen funciones distintas, lo que les diferencia de la familia clásica de ERK y ha determinado la formación de una subfamilia distinta (English, 1999; Zhou, 1995; Abe, 1999).

El grupo de JNK incluye 3 miembros: la JNK1, JNK2 y JNK3 (Gupta, 1996; Sluss, 1994)

La subfamilia p38 MAPK está constituida por 4 isoformas: p38 α , p38 β , p38 γ y p38 δ que tienen una parte estructural homóloga (Dong, 2002).

La cascada de señalización MAPK es activada por distintos estímulos celulares y regulan varias respuestas.

La cascada de ERK1/2, fue la primera vía MAP Kinasa de señalización caracterizada en células de mamífero. La vía ERK1/2 se activa como respuesta a las distintas citocinas, factores de crecimiento y regula principalmente señales mitogénicas y antiapoptóticas (Chang, 2001).

La vía del JNK se activa también como respuesta a estrés ambiental (luz ultravioleta, citocinas proinflamatorias, shock osmótico) o factores de crecimiento, mediante señales que regulan la apoptosis, la producción de citocinas y la progresión del ciclo celular (Davis, 2000).

Los miembros de la familia p38 se activan fundamentalmente ante estímulos de estrés, pero también durante el contacto de los distintos receptores de citocinas con sus ligandos (Verma, 2002). p38 interviene en la regulación de la apoptosis y en la parada del ciclo celular, induce la diferenciación celular y la producción de citocinas en la inflamación (Young, 2000).

La vía ERK5 es activada por el suero, factores de crecimiento incluyendo EGF(epidermal growth factor), NGF (nerve growth factor), BDNF (brain-derived neurotrophic factor) y GPCR (G protein coupled receptors) (Cavanaugh, 2001; Watson, 2001; Sun, 2003), el estrés oxidativo y la hiperosmolaridad (Kyriakis y Avruch, 2001).

2.3.2. Regulación y funcionamiento de las MAPK-asas

La superfamilia de las enzimas MAPK, es componente central en una red que coordina estímulos provenientes de una variedad grande de mediadores extra

e intracelulares. Las MAPKs, como PKA (cAMP-dependent protein kinase), Ca^{2+} y PKC (phospholipid-dependent protein kinases), coordinan un número impresionante de señales.

El modelo de regulación es el siguiente (Figura I.21)



Figura I.21. Cascada de señalización MAPKasas

La activación de las MAPKKKs y de las MAPKK ocurre bajo la actividad de la sGp (small G-proteins), que están reguladas por las proteínas GEF (guanine exchange factor). Las proteínas sGp de la vía ERK son las proteínas Ras (Lee, 2002; Dhillon, 2002) mientras que los miembros de la familia Rho (RAC1, Cdc42, RhoA y RhoB) actúan en las vías de la p38 y JNK (Dong, 2002). La activación inicial de las GEF va correlacionada con la activación del GTP. Todos estos pasos están dibujados en la Figura I.22

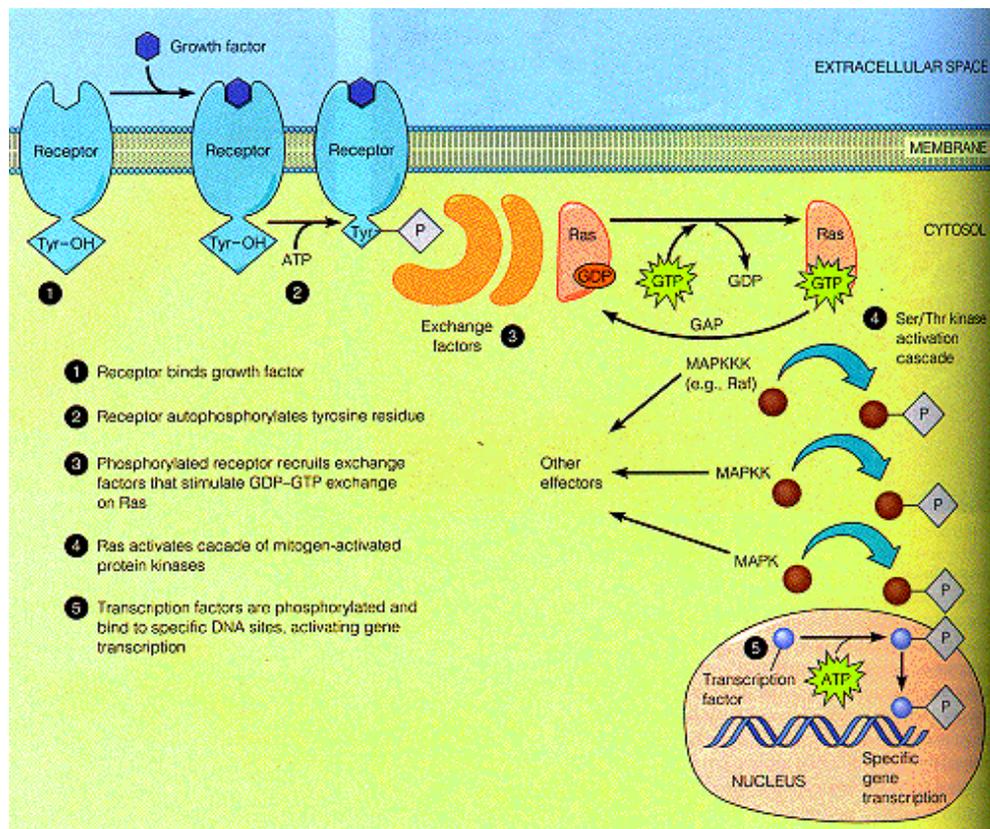


Figura I.22. Esquema general de activación de las MAPKs

Las MAPKKs (MEKK) son protein kinasas Ser/Thr que activan las enzimas MAPKK (MEK) fosforilando los dos residuos de Serina o Threonina del motivo Ser-X-X-Ser/Thr.

Una vez fosforilada la enzima MAPKK (MEK) que es una Ser/Thr/Thr kinasa, fosforila la enzima MAPK en sus residuos Thr y Tyr de la secuencia Thr-X-Tyr (T-X-Y). Para su activación es necesaria la doble fosforilación de los residuos, tanto el de Thr como el de Tyr (Rincon, 2001; English 2002).

Las MAPK-ases se defosforila bajo la acción de las protein fosfatasa: PP2A, PTP1 y MKP-1, 2, 3.

El proceso básico de activación y desactivación de las MAPKs esta representado en la Figura I.23

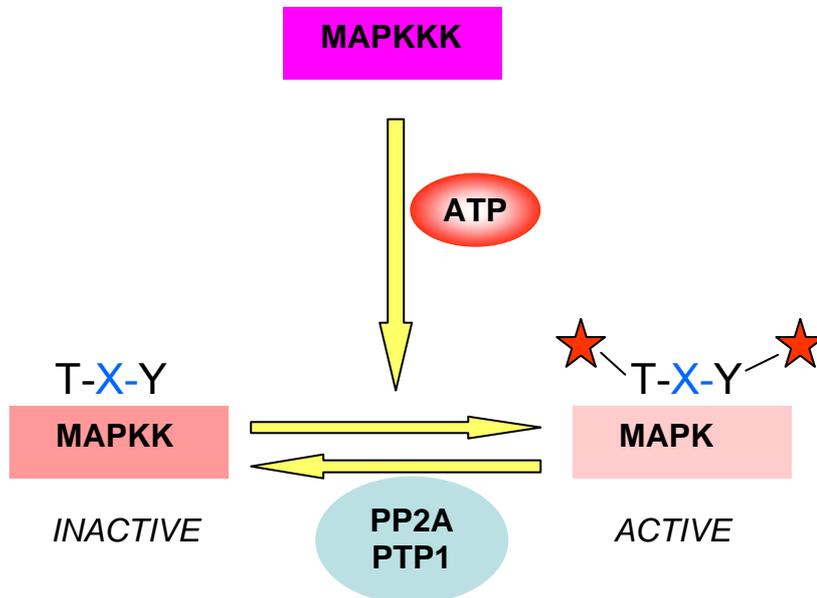


Figura I.23. La fosforilación doble determina la activación de las enzimas MAPKs

2.3.3. Respuesta celular mediada por las MAPKasas

La activación de las MAPKasas por los distintos estímulos determina la inducción de varias respuestas celulares muy importantes como sería la fosforilación de factores de transcripción, la regulación transcripcional, remodelación de la cromatina nuclear, la inducción genética inmediata, la producción de citokinas, la regulación de la apoptosis y la progresión del ciclo celular.

Cada tipo de actividad biológica es inducida por un tipo de subfamilia MAPKs y cada distinto estímulo determina una específica actividad. En general la vía Ras/ERK regula principalmente el crecimiento celular y supervivencia celular, pero en algunas circunstancias determina también la diferenciación celular. (Schaeffer, 1999). Las vías de JNK y p38 regulan principalmente la apoptosis, la respuesta inflamatoria y transmite señales inhibitoras del crecimiento (Schaeffer, 1999; Lee, 2002). Esta describe que la vía del p38 puede inducir un efecto antiapoptótico, proliferativo o en algunas condiciones transmiten señales de supervivencia celular, en función de tejido y de la isoforma de kinasa desarrollada (Davis, 2000).

2.3.4. JNK

JNK (stress-activated protein kinases SAPK/Jun N-terminal kinases) son miembros de la familia MAPK y son activados por distintos factores de estrés, citocinas inflamatorias, factores de crecimiento y agonistas GPCR. Los factores de estrés que desarrolla la cascada enzimática son los miembros small GTPasa de la familia Rho (Rac, Rho, cdc42). (Lu, 1997).

Como en todas las vías MAPKsicas, la cascada empieza con una MAPKKK que será la MEKK 1 o 4, o miembros de las kinasas MLK (mixed lineage kinases) que activan por fosforilación las MKK4 (SEK) o MKK7 y al final al SAPK/JNK kinases. De forma alternativa la MKK4/7 pueden ser activados por miembros de la familia kinasica GCK (germinal center kinase) independiente de las GTP-asas (Whitmarsh, 1998). Las SAPK/JNK se transloca en el núcleo, donde regula la actividad de distintos factores transcripcionales como sería c-Jun, ATF-2, ELK 1, SMAD4, NFAT4, NFATC1 y la p53. El esquema general del JNK está representada en la Figura I.24.

El grupo JNK incluye a tres isoformas: JNK1, JNK2 y JNK3. La isoforma JNK1 tiene un peso molecular de 46-kDa y el JNK2 de 55-kDa. Las dos isoformas se activan después de la exposición de las células a la radiación UV y las dos formas fosforila el dominio NH₂-amino del factor de transcripción c-Jun. La actividad de la isoforma JNK2 es de 10 veces mayor en comparación con de la JNK1.

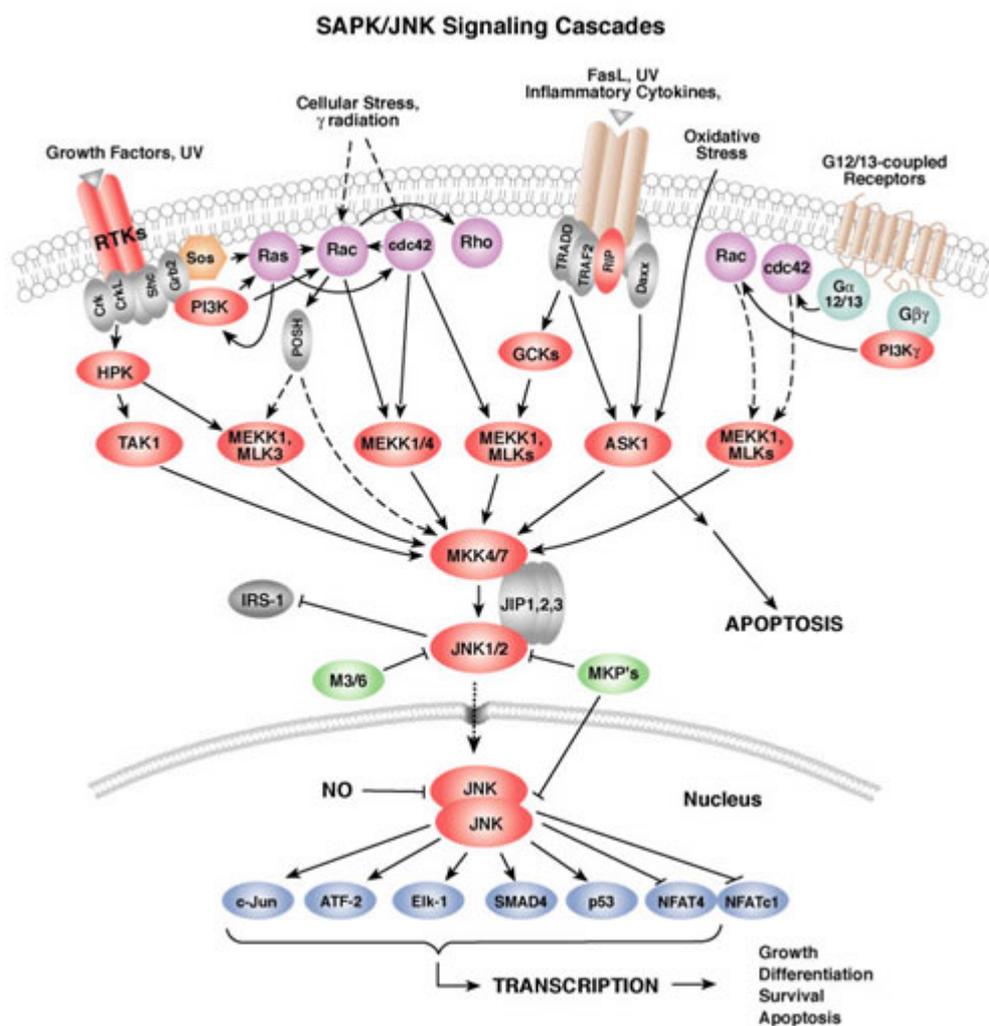


Figura I.24. Cascada de señalización del SAPK/JNK (*Cell Signaling Web*)

JNK está relacionado con:

- 1) p21WAF1 .JNK inhibe la replicación del DNA, determinando la disociación p21WAF1, inhibidor de la CDK (Cyclin- Dependent protein Kinase). El modelo fue demostrado por Patel en 1998 que con este mecanismo sugiere que el JNK (su isoforma JNK1 en especial) puede regular el ciclo celular en células humanas linfocitarias de tipo T (Patel, 1998).
- 2) Hsp 72(Heat Shock Protein) el miembro más potente de la familia Hsp70 protege las células frente a distintos factores de estrés, inhibiendo la activación de JNK por unas vías aún desconocidas. El

mismo papel lo tiene el Hsp72 en la activación de p38, otro factor apoptótico. Por tanto se lo considera como un “sensor” en la construcción de proteínas anormales después del Heat shock u otros factores de estrés. El efecto inhibitor del Hsp70 sobre JNK explica el proceso de termotolerancia de las células mamarias (Gabai, 1997).

- 3) **Obesidad.** JNK es un mediador clave en obesidad y en la resistencia a la insulina, siendo un potencial factor diana en la terapia del diabetes tipo 2, las formas insulina resistentes y obesidad (Hirosumi, 2002). En obesidad se demuestra una actividad anormal aumentada de JNK1.
- 4) **La respuesta inmune.** La activación de la vía JNK1 tiene un papel importante en la proliferación, diferenciación y apoptosis de las células T helper (Dong, 1998).
- 5) **P53.** JNK tiene un papel activo en la regulación de la actividad y estabilidad de p53. Formando un complejo JNK-p53, impide la ubiquinización de p53 y representa un regulador independiente de Mdm2. Mientras Mdm2-p53 se ha encontrado en la fase S y G2/M del ciclo celular, el complejo JNK-p53 está presente en la fase G0/G1 en las células sin estrés. Eso demuestra que existen dos vías completamente distintas en la regulación de la estabilidad de p53 (Fuchs, 1998).

2.3.5. P38

P38 es un miembro de la familia MAPK que se activa por distintos factores de estrés y por las citocinas inflamatorias. En la cascada de activación, el componente proximal es una MAPKKK, que fosforilándose activa la p38MAPKK (MKK3/6). La p38MAPKK se puede activar también directamente por ASK1, sensible a los estímulos apoptóticos (Figura I.25)

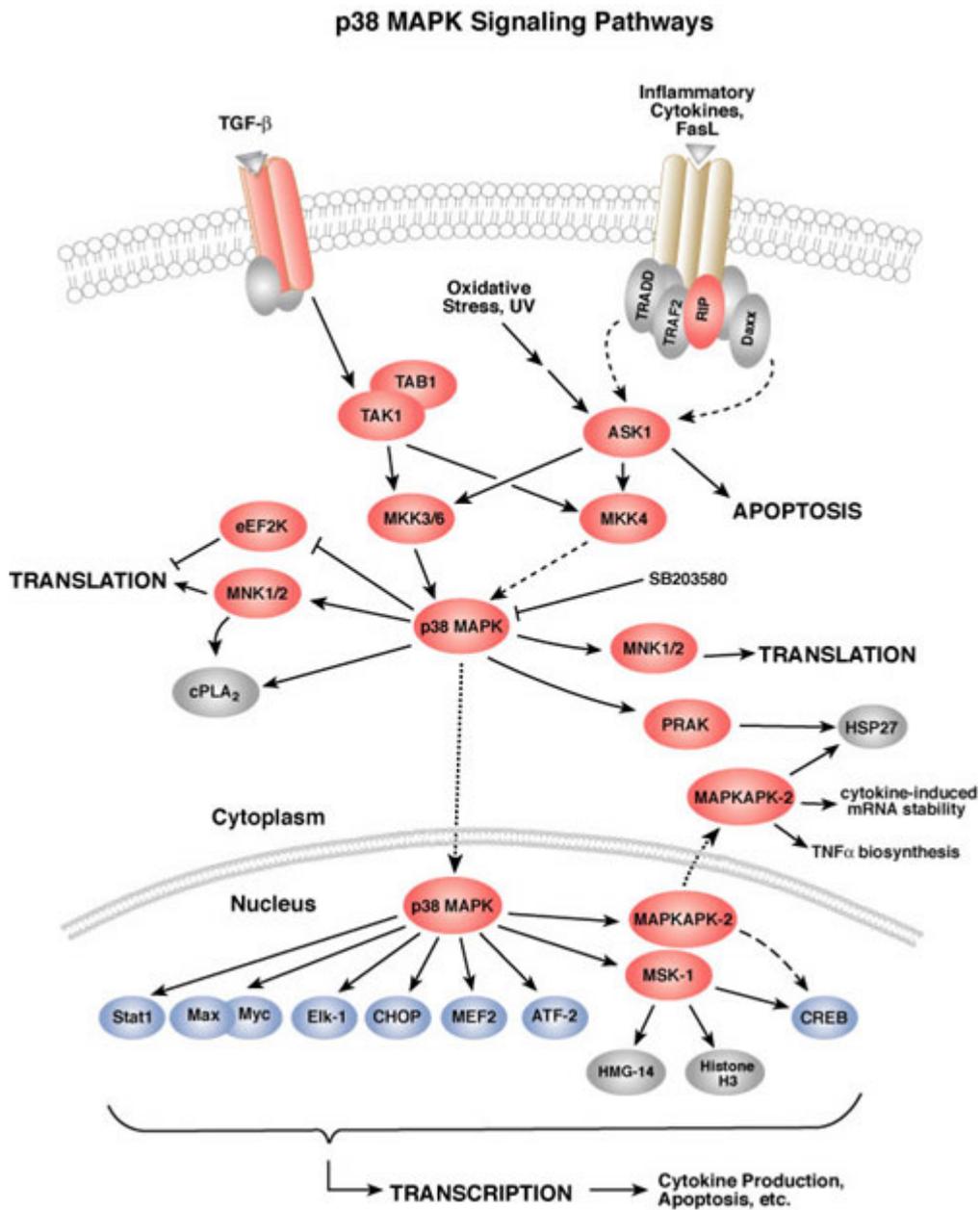


Figura I.25. Vía de señalización del p38 (*Cell Signaling, web*)

La familia p38 MAPK contiene a p38 α (38kDa), p38 β (p38 β_1 y p38 β_2 -39kDa)(Jiang, 1996), p38 γ (ERK6/SAPK3, 43kDa)(Lechner, 1996), y p38 δ (SAPK4, 40kDa) (Jiang, 1997; Kumar, 1997). La forma α y β son omnipresentes, mientras que la γ y la δ se encuentran representadas de forma distinta en función del tipo de tejido. El sitio de fosforilación para todos los miembros es Thr-Gly-Tyr (TGY). Si se compara la secuencia estructural de cada isoforma, aprox.60% es idéntica para todo el grupo de la familia p38 y sólo un 40-45% se parece a los demás miembros de la familia MAPK.

Muchos de las funciones del p38 se quedan para describir, como también su localización subcelular (Zarubin, 2005).

2.4. NF κ B

2.4.1. Generalidades NF- κ B

Nuclear Factor kappa B (NF- κ B) es uno de los factores celulares transcripcionales vitales, denominados factores transcripcionales primarios. Siendo una pieza clave en sistemas de respuesta rápida a señales extracelulares desde el exterior hacia el núcleo celular, controla y regula la expresión de distintos genes.

NF- κ B tiene una evidente importancia en la respuesta inflamatoria e inmune, en el proceso de proliferación y muerte celular, en la replicación viral, en la producción de óxido nítrico y en la interacción entre células.

Ejemplos de enfermedades inmunes e inflamatorias en las cuales el factor NF- κ B está implicado son: el rechazo de los tejidos en el trasplante de órganos sólidos, en la artritis reumatoide, en el asma bronquial (estímulos precipitantes al ataque asmático son al mismo tiempo inductores del factor NF- κ B: ozono, óxido nítrico, las infecciones respiratorias virales, distintos tipos de alérgenos).

Muchas enfermedades crónicas están asociadas a la activación aberrante del NF- κ B como: aterosclerosis, disfunciones vasculares, esclerosis múltiple, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades inflamatorias ósea, gastritis asociada al *Helicobacter pylori*, el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, enfermedad de Alzheimer, shock séptico etc.

La activación o la sobreexpresión del factor NF- κ B fue asociada con tumorigénesis y metástasis, de ahí el papel de este factor de transcripción en la regulación de la progresión del ciclo celular. Baldwin demuestra que NF- κ B es muy importante en el desarrollo normal del ciclo celular e interviene en la regulación de la ciclina D1. Algunos tumores expresan de forma constitutiva la activación de NF- κ B: los linfomas con células B y T; la enfermedad de Hodgkin's; leucemia aguda linfoblástica; el cáncer de mama, hígado, tiroides, próstata, colon, ovario, pulmón; mieloma múltiple o el melanoma (Baldwin, 2002). Por tanto un número considerable de esquemas terapéuticos anticancerosos tienen como clave la modulación de la actividad de NF- κ B.

Otros datos demuestran a NF- κ B como factor clave en el proceso de isquemia-reperfusión miocárdico y en diabetes insulina dependiente.

NF- κ B fue descrito por primera vez por Sen y Baltimore en 1986, como un factor específico presente en linfocitos B, ligado al oligonucleótido decamérico GGGACTTTC de la cadena ligera de la inmunoglobulina (Ig) kappa (κ), que activa la transcripción de los genes Ig κ en células maduras B.

Se comprobó con el tiempo que en realidad es un factor transcripcional ubicuo, con un mecanismo de activación básicamente único (si se considera al propio factor y a su represor), pero que sin embargo responde a una gran cantidad de señales, y activa también a una importante cantidad de genes. (Sen y Baltimore, 1986)

2.4.2. Componentes del NF- κ B

NF- κ B forma parte de la familia de proteínas NF- κ B/Rel que se fijan a las proteínas κ B del DNA. Se presenta como forma inactiva ligado a su inhibidor I kappa B (κ B) dentro del citoplasma o como forma activa dentro del núcleo.

La forma activa es un homo o/y heterodímero de 8 monómeros distintos que pertenecen a dos clases.

La primera clase contiene las proteínas: NF- κ B1, NF- κ B2 y a las proteínas de Drosophila (Dorsal, Dif and Relish), responsables de la unión con el DNA (Liou y Baltimore, 1993). NF- κ B1 (p50/p105) es un homodímero del monómero p50, que se obtiene por la proteólisis del precursor proteico p105 (Figural.26);

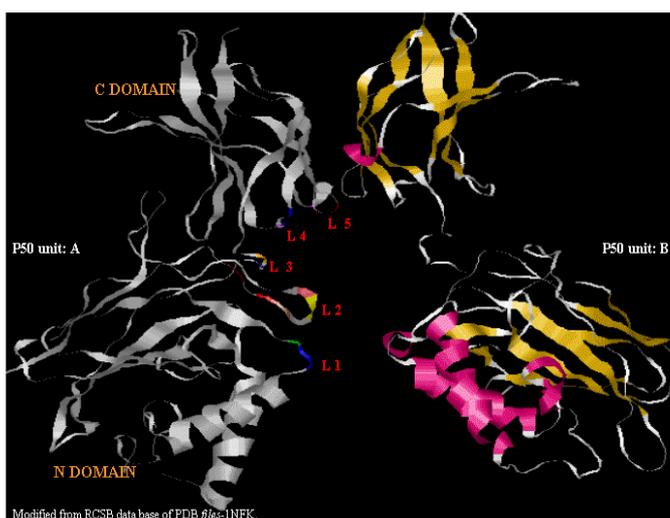


Figura I.26 Estructura del homodímero p50/p50 NF- κ

mientras el NF- κ B2 (p52/p100) es un homodímero del monómero p52 obtenido por la proteólisis del precursor p100.

La segunda clase denominada proteínas Rel contiene a: RelA (sinónimo del p65). Rel B y c-Rel y son encargados de estimular la transcripción. Las proteínas de la segunda clase en comparación con las de la primera clase no tienen un precursor proteico, ellas se transcriben directamente en forma final.

La dimerización del NF- κ B esta representada en la Figura I.27

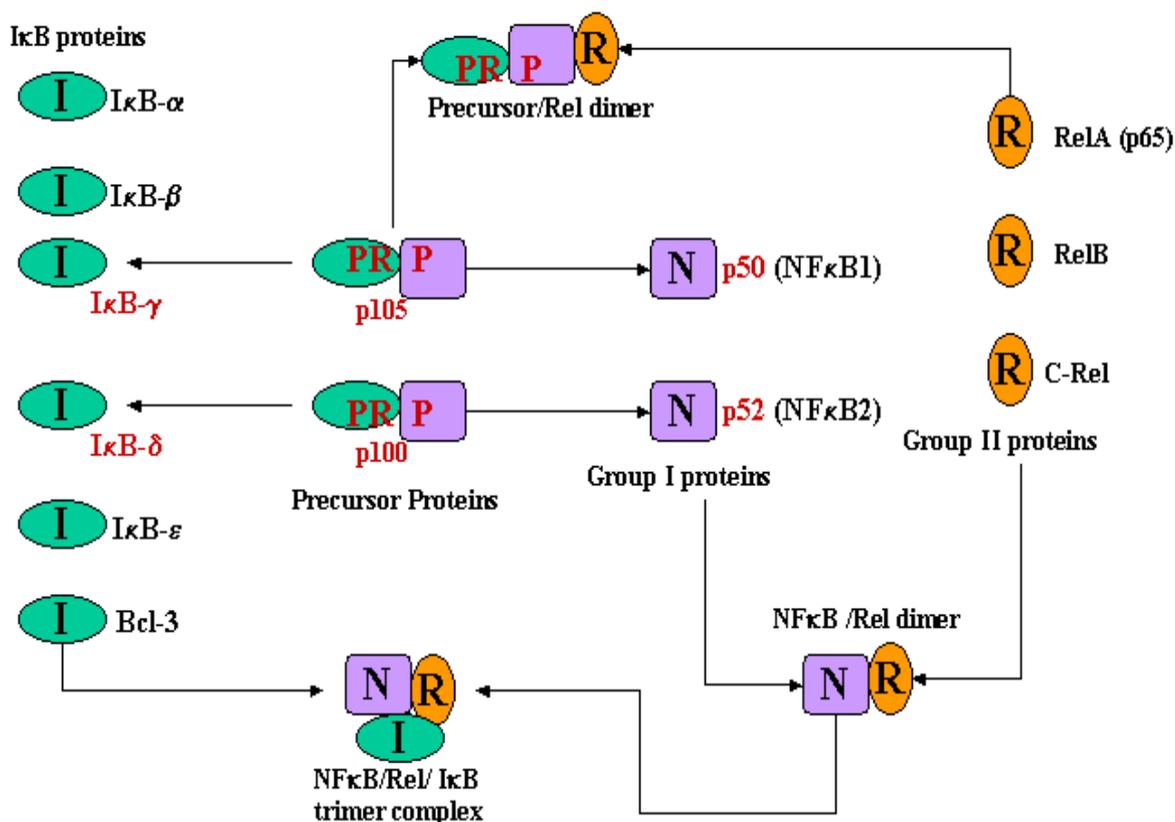


Figura I.27. Generación y dimerización del complejo NF- κ B/Rel/ I κ B en el citoplasma celular (Baldwin AS Jr-Ann Rev Immunol 1996,14,649-83)

La forma predominante y la mejor caracterizada de la proteína NF- κ B es el heterodímero p50/p65. Otras formas de tipo p50/p50, también son posibles, pero existen algunas restricciones en el acoplamiento de los monómeros. Los distintos dímeros de NF- κ B presentan distintas actividades transcripcionales. La capacidad de los diferentes dímeros de reconocer las distintas zonas κ B del DNA, explica como las subunidades del NF- κ B pueden regular de forma diferencial la expresión de distintos genes (Lee y Burckart, 1998)

Todas las proteínas NF- κ B/Rel contienen conservadas en el segmento N-terminal, un dominio de 300 aminoácidos llamado Rel Homology Domain (RHD), Rel Homology Region (RHR) o NRD (NF- κ B/Rel/Dorsal). Denominada así porque esta región también se observa en el oncogen Rel y en la proteína dorsal de *Drosophila melanogaster*. La porción N-terminal de este dominio es responsable de la capacidad de unión a ADN y la mitad C-terminal es necesaria para la interacción NRD-NRD, es decir, para mantener el heterodímero. El extremo C-terminal de esta región también está implicado en la interacción con la proteína inhibidora de NF- κ B (I κ B) y presenta además la secuencia necesaria para que NF- κ B sea llevado al núcleo cuando se produzca su activación, denominada NLS (por "nuclear location sequence") (Siebenlist y cols., 1994)(Figura I.28).

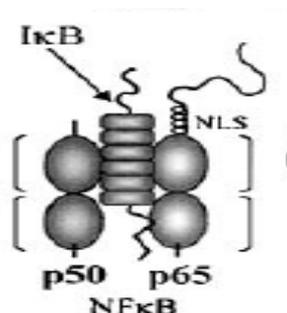


Figura I.28. Interacción de NF- κ B con su proteína inhibidora I κ B

En el dominio C-terminal de la estructura proteica, el NF- κ B presenta una alta variabilidad, responsable de la transactivación. Las proteínas p50 y p52 carecen del dominio C-terminal, por tanto ellas modulan la transcripción compitiendo con otros dímeros NF- κ B para los sitios κ B del DNA (Baeuerle y Henkel, 1994).

NF- κ B está presente en citoplasma, en forma inactiva como complejo asociado con el inhibidor proteico kappa B (I κ B). Hasta ahora se han descrito en los vertebrados 7 tipos principales de proteínas I κ B: I κ B- α , I κ B- β , I κ B- ϵ , p100/ I κ B- δ , p105/ I κ B- γ , I κ B-R y Bcl-3. El más importante es sin duda I κ B- α por su mayor presencia.

Las distintas moléculas de I κ B tienen una especificidad en unirse e inhibir a varios complejos NF κ B/Rel. Por ejemplo: I κ B gamma, alfa y I κ B beta interactúan con los heterodímeros formados de p50 y p52 con las proteínas RelA o c-Rel, con homo y dímeros de las proteínas RelA y c-Rel.

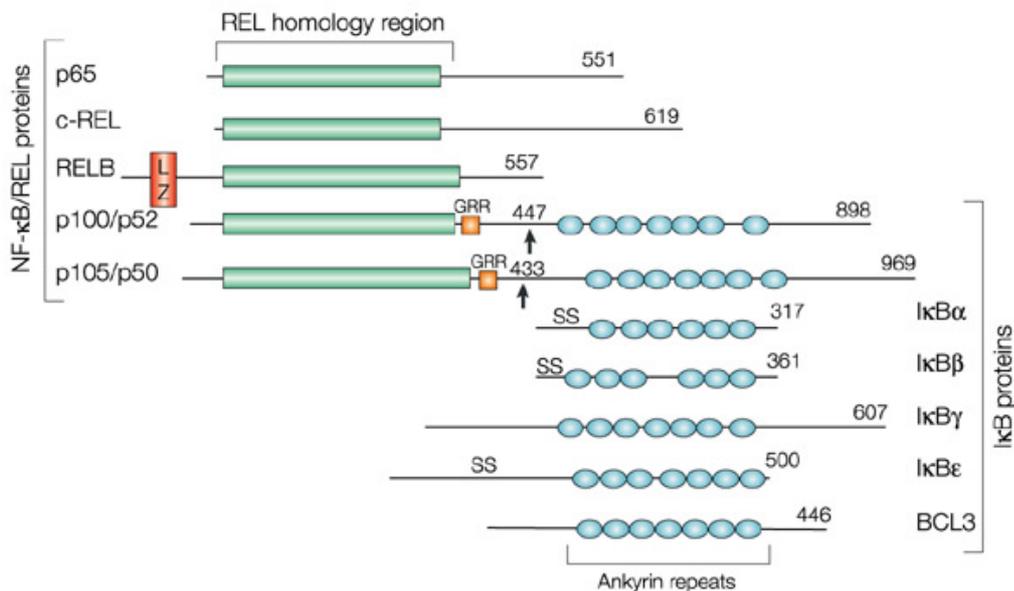
Todas las proteínas de la familia I κ B contienen de 5 a 7 copias estructurales de un motivo estructural de 33 aminoácidos denominado ankirina, el cual es muy importante en la interacción proteína-proteína. La repetición de esta estructura es

responsable del contacto con las proteínas NF κ B y tapan la secuencia de localización nuclear (nuclear localization sequence –NLS) situada en la región C-terminal del dominio RHD (Rel homology domain) de las proteínas NF κ B. Como consecuencia NF κ B está forzado a quedarse en el citoplasma sin posibilidad de translocarse dentro del núcleo.

Cerca del término N y C, las proteínas I κ B contienen una región denominada PEST, dominio rico en residuos de Serina, Prolina, Glutamato, Aspartato, Serina y Treonina. El dominio PEST es el sitio de fosforilación y está implicado en regular la estabilidad de I κ B e inhibir la unión del complejo NF κ B/Rel con el DNA (probablemente por una vía directa interaccionando con el dominio de fijación κ B del DNA) (Whiteside y Israel, 1997). Se ha demostrado que mutaciones en los dominios NLS de NF- κ B impiden la unión de éste con I κ B, lo que sugiere la existencia de una interacción física en esta misma zona de NF- κ B.

Estudios de inmunofluorescencia demuestran la presencia de I κ B α tanto en citoplasma como en núcleo, en células HeLa y SCID.

La Figura I.29 indica las principales clases de NF- κ B e inhibidores.



Nature Reviews | Cancer

Figura I.29. Familia NF- κ B e proteínas inhibidoras κ B (I κ B)

La presencia de los principales dominios de interés funcional en los diferentes miembros de las familias Rel e I κ B se muestra en la Tabla 2.

2.4.3. Activación del NF-κB

En condiciones normales NF-κB se encuentra como forma inactiva junto a su inhibidor, en el citoplasma. El heterodímero más descrito es el p50/p65 en complejo con IκB α.

Vías de activación del NF-κB

1. Regulación IκB por vía IKK (IκB kinasas)
2. Regulación IκB-α por vía tirosin fosforilación (PI3K)
3. Regulación del potencial transactivador del NF-κB vía la fosforilación de la subunidad de unión al DNA (PKA)
4. Regulación del NF-κB por el TNFα
5. Regulación del NF-κB utilizando un coactivador transcripcional
6. Regulación del NF-κB vía MAPKinasas
7. Regulación redox del NF-κB por el oxido nítrico (NO)
8. Otras vías:
 - la proteólisis del precursor proteico p105
 - la fosforilación por la casein kinasa II (CK-II)
 - la fosforilación por la DNA-PK(DNA dependent protein kinase)
 - la fosforilación por RSK

2.4.3.1. Agentes inductores NF-κB

La activación del NF-κB se realiza bajo la actuación de distintos factores inductores tales como: ROS, citoquinas, estrés, estímulos químicos de tipo: forbol ester, agentes quimioterapéuticos, agentes oxidantes y inhibidores de Ser y Thy Fosfatasa, etc (Figura I.30).

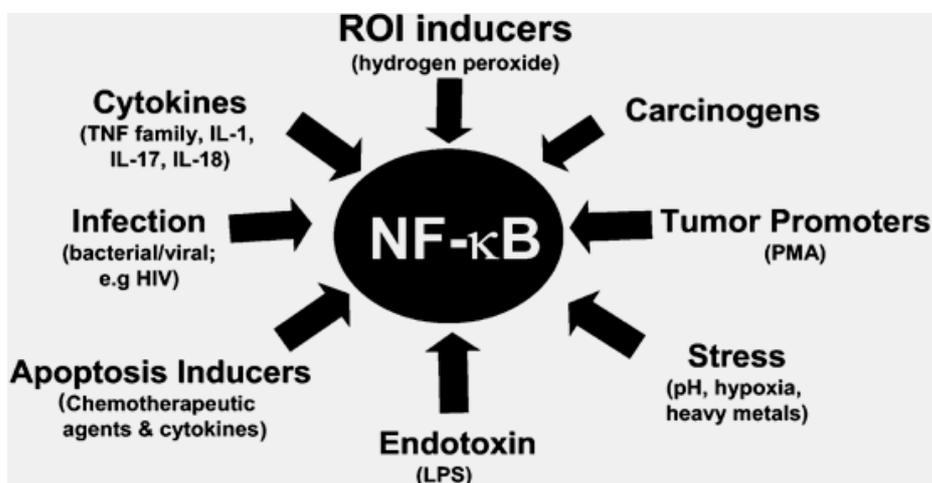


Figura I.30. Factores inductores del NF-κB (*Leukemia* 16:1053-1068, 2002)

NF- κ B es descrito como un mediador central en la respuesta inmune y en ciertas respuestas a estrés en humanos. Esta denominación se empieza a entender si miramos el número de agentes inductores y el de genes diana (Tabla I.2) de este factor transcripcional: hasta el momento se han descrito aproximadamente 150 agentes inductores de NF- κ B entre moléculas y ciertos agentes físicos. Por otra parte, se conoce más de 800 genes regulados por NF- κ B (Tabla I.4).

Tabla I.2. Selección de agentes inductores de la activación de NF- κ B

<p style="text-align: center;">BACTERIAS</p> <p>Helicobacter pilory Lactobacilli Micobacteria Tuberculosis</p>	<p style="text-align: center;">ESTRÉS FISIOLÓGICO</p> <p>Adhesión Hemorragia Hiperoxia Proteinuria Reoxigenación Regeneración hepática</p>	<p style="text-align: center;">MEDIADORES FISIOLÓGICOS</p> <p>Bradiquina Leucotrieno B4 PAF</p>
<p style="text-align: center;">PRODUCTOS BACTERIANOS</p> <p>Lipopolisacárido Endotoxina estafilocócica Lipoproteínas de membrana</p>	<p style="text-align: center;">ESTRÉS FÍSICO</p> <p>Ejercicio Radiación Ultravioleta Radiación Gamma</p>	<p style="text-align: center;">PROTEÍNAS MODIFICADAS</p> <p>LDL oxidadas Fragmento de Proteína amiloide (bA4) Componente No-beta amiloide de la enfermedad de Alzheimer</p>
<p style="text-align: center;">VIRUS</p>	<p style="text-align: center;">ESTRÉS OXIDATIVO</p>	<p style="text-align: center;">SOBREENPRESIÓN DE PROTEÍNAS</p>

<p>Adenovirus Hepatitis B HIV-1 Influenza Virus Rhinovirus Herpes Simplex Virus</p>	<p>Peroxido de hidrogeno Ceruleina Butil Peróxido Ozono Peroxinitrito Pervanadato</p>	<p>Receptor de eritropoyetina Ig cadena pesada</p>
<p>PRODUCTOS VIRALES</p> <p>ARN de doble cadena Adenovirus 5: E1A HIV-1: Nef HIV-1: Tat HBV: HBx</p>	<p>AGENTES AMBIENTALES</p> <p>Humo de tabaco Niquel Manganeso Hierro Cobalto</p>	<p>RECEPTORES DE LIGANDO</p> <p>Antígeno (IgM-Ligand) CD2-Ligand CD3-Ligand</p>
<p>CITOQUINAS INFLAMATORIAS</p> <p>CD30 THANK IL-1 TNFα IL-2 TNFβ IL-12 LIF IL-15 IL-18 IL-17</p>	<p>DROGAS DE USO TERAPEÚTICO</p> <p>Tamoxifeno Aloperidol Bleomicina Azidotimidina</p>	<p>MEDIADORES APOPTÓTICOS</p> <p>Anti-Fas/Apo-1 TRAIL</p>
<p>AGENTES QUÍMICOS</p> <p>Etanol Ácido linoléico Nicotina</p>	<p>MEDIADORES FISIOLÓGICOS</p> <p>Adenosine Albumina Angiotensina II L-Glutamato Heat shock protein 60 Heat shock protein 25</p>	<p>MITÓGENOS, FACTORES DE CRECIMIENTO Y HORMONAS</p> <p>Insulina Hormona de crecimiento Suero Esteroides</p>

2.4.3.2. Inhibición del NF-κB

Una de las principales evidencias a favor de la modulación redox de NF-κB ha sido la inhibición de su activación por compuestos de reconocida actividad antioxidante *per se*, especialmente dos casos: NAC y Pirrolidín ditiocarbamato (PTDC). La NAC es un antioxidante que actúa incrementando los niveles intracelulares de GSH al funcionar como dador de cisteína, pero que además, funciona como neutralizador directo de especies oxidantes como los ya mencionados H₂O₂, HO⁻, o HOCl. (Schreck y cols., 1992).

El PDTC pareció en un principio por ser un inhibidor general de NF-κB. Como ditiocarbamato, el PTDC presenta propiedades tanto antioxidantes como quelante de metales. Este carbamato es capaz de penetrar en las células, por lo que ha sido ampliamente utilizado en modelos celulares en cultivo. De nuevo el grupo de Scherck (Schreck y cols., 1992) mostró una actividad inhibitoria de la activación de NF-κB frente a todo un abanico de diferentes agentes (IL-1, TNF-α, LPS o H₂O₂). De esta forma se mostraban más evidencias del papel central de los oxidantes en la modulación de la actividad de NF-κB.

Como en el caso de NAC, se han ido mostrando evidencias de la dependencia del tipo celular y del agente activador en la inhibición por PDTC.

Algunos de los compuestos inhibidores de la actividad del NF-κB están esquematizados en la Tabla I.3.

Tabla I.3. Compuestos inhibidores de la activación de NF-κB

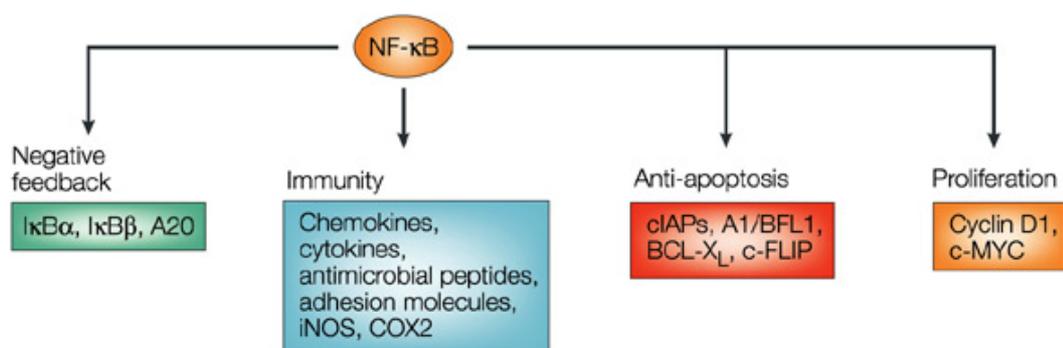
(Baldwin Jr. AS 1996, *Annu Rev Immunol.* 1996;14:649-83)

GRUPO	TIPOS
Citokinas	IL-10
Inmunosupresores	Glucocorticoides (prednisona, metilprednisona, dexametasona)
	Ciclosporina
	Tacrolimus
	Rapamicina
	Deoxyspergualina
	Aspirina

Antiinflamatorias non-esteroides	Sodium Salicilat
	Tepoxalina
Neurotransmisores	Oxido Nitrico
Activadores y antagonistas de cAMP	Prostaglandina E2
Otros agentes	Antioxidantes
	Compuestos de Au
	N-acetil L-cisteina (NAC)
	Pirolidinditiocarbamato (PDTC)
	Gliotoxina (metabolito fungico)

2.4.4. Genes regulados por NF-κB

La mayoría de las proteínas codificadas por NF-κB participan de una manera u otra en la defensa inmune, crecimiento, apoptosis, regulación del metabolismo y sistemas de protección contra diferentes condiciones de estrés. El esquema de la revista Nature (Figura I.31.) agrupa estos genes de la siguiente manera.



Nature Reviews | Cancer

Figura I.31. Clases de genes regulados por NF-κB (Nat.Rev.Cancer 2:301-310, 2002)

La selección de los genes regulados por NF-κB está ordenada en la siguiente Tabla I. 4.

Tabla I.4. Selección de genes regulados por NF-κB.

GEN	FUNCIÓN	GEN	FUNCIÓN
Citoquinas/Quimiocinas		Inmunoreceptores	
CINC-1	Quimiotaxis neutrófilos	BRL-1	IB-cell homing receptor
*CXCL 11	Chemo. ligand para CXCR3	CCR5	Chemokine receptor
Eotaxina	Beta Chemo, eosinfil-especific	CCR7	Chemokine receptor
Gro a-g	Melanoma estim actividad	CD137	TNF-like receptor
IFN-g	Interferon	CD154	CD40 ligand
IL-1a	Interleu-1a	CD40	TNF-receptor family member
IL-1b	Interleu-1b	CD40 ligand	Ligand for CD40
IL-1 receptor antagonist	Inhibitor of IL-1 activity	CD48	Antigen of stimulated lymphocytes
IL-2	Interleu-2	CD83	T-cell development molecule
IL-6	Interleu-6, inflam citoq	Fc epsilon receptor II (CD23)	Receptor for IgE
IL-8	Interleu-8	IL-2 receptor a-chain	IL-2 receptor subunit
*IL-9	Interleu-9	Immunog Cgamma1	IgG heavy chain
IL-10	Interleu-10	Immunog gamma4	IgG heavy chain
IL-11	Interleu-11	Immunog E heavy chain	IgE heavy chain
IL-12 (p40)	Interleu-12	Immunoglobulin K light chain	Antibody light chain
IL-13	Interleu-13	Invariant Chain I _l	
*IL-15	Interleu-15	Factores de crecimiento	
TNF-α	Tumor Necrosis Factor.	G-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor
Virus		GM-CSF	Granulocyte Macrophage
Adenovirus (E3 region)	Adenovirus		
Avian Leucosis Virus	Causa avian leucosis		
Bovine Leucemia Virus	Causa bovine leucemia		
CMV	Citomegalovirus		
EBV (Wp promoter)	Epstein-Barr virus		
HBV (pregenomic promoter)	Hepatitis B virus		
HIV-1	Human inmunodeficiencia virus		
HSV	Herpes simpl virus		
JC Virus	Polioma virus		
HPV type 16	Human Papillomavirus		
SIV	Simian inmunodeficiencia virus		
SV-40	Simian virus 40		

GEN	FUNCIÓN	GEN	FUNCIÓN
Moléculas de adhesión			
DC-SIGN	Dendritic cell surface C-type lectin	EPO	Erythropoietin
ELAM-1 (CD62E, E-selectin)	E-selectin, endothelial cell leukocyte adhesion molecule	*IGFBP-1	Insulin-like growth factor binding protein-1
Endoglin	Endothelial cell membrane glycoprotein	IGFBP-2	Insulin-like growth factor binding protein-2
Fibronectin	Extracellular attachment	M-CSF (CSF-1)	Macrophage Colony Stimulating Factor
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1	NK-1R	Neurokinin-1 Receptor
MadCAM-1	Mucosal addressin cell adhesion molecule	PDGF B cadena	Platelet-Derived Growth Factor Hormone
P-selectin	Platelet adhesion receptor	Proenkephalin	Matrix glycoprotein t
Tenascin-C	ECM protein controls cell attachment and migration, cell growth	*Thrombospondin-2	
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule	VEGF C	Vascular Endothelial Growth Factor
Proteínas en fase aguda		Factores de transcripción	
Angiotensinógeno	Precursor del a angiotensina	A20	TNF-inducible zinc finger
beta-defensin-2	regula presión arterial	c-myb	Proto-oncogene
Proteína de unión	Péptico Anti-microbial	c-myc	Proto-oncogene
Proteína de Unión C4b	Proteína de Unión del Complemento	c-rel	Proto-oncogene
Factor B Complemento	Factor del Complemento	IRF	Interferon regulatory factor
Factor C4 Complemento	Activa vías extrínsecas de la vía del complemento	I κ B - α	Inhibitor of Rel/ NF- κ B
C-reactive protein	Pentraxin	junBMail	Proto-oncogene
Lipopolysaccharide binding protein	Une al receptor LPS (CD14) con LPS	nfkb2	I κ B -like protein
Pentraxin PTX3	Pentraxina	nfkb1	NF- κ B p100 precursor
Proteínas A amiloides del suero	Componentes del suero	NURR1	NF- κ B p105 precursor
			Nuclear orphan receptor

GEN	FUNCIÓN	GEN	FUNCIÓN
Factor-1 del tejido	Activa vías extrínsecas del complemento	p53	Tumor suppressor
Activador plasminógenos tipo Urokinasa	Activa fibrinógeno	relb	Transcription factor Zinc finger transcription factor
Genes de respuesta a estrés		Stat5a	Rat homologue of IEX
Angiotensin II	Peptide hormone	WT1C	Non-proteasomal multi-ubiquitin cadena binding protein
CYP2C11	Cytochrome p450	Reguladores apoptosis	
COX-2	Cyclooxygenase, prostaglandin endoperoxide synthase	Bfl1/A1	Homólogo de Bcl-2
Ferritin H cadena	Iron storage protein	Bcl-xL	Pro-survival
*5-Lipoxygenase	Arachidonic acid metabolic enzyme, leukotriene synthesis	Bcl-2	Bcl-2 homologue Pro-survival factor
12-Lipoxygenase	Arachidonic acid metabolic enzyme	Caspase-11	Caspase
Inducible NO-Synthase	NO synthesis	Nr13	Pro-survival Bcl-2 homologue
*MAP4K1	Activator of Activator of stress-induc protein kinase pathway	c-FLIP	Pro-survival factor
Mn SOD	Superoxide dismutase	CD95 (Fas)	Pro-apoptotic receptor
NAD(P)H quinone oxidoreductase (DT-diaphorase)	Bioreductive enzyme	*Fas-associated phosphatase-1	Protein phosphatase
Phospholipase A2	Fatty acid metabolism	Fas-Ligand	Inducer of apoptosis
Receptores de superficie Celular		IAPs	Inhibitors of Apoptosis
A1 adenosine receptor	Pleiotropic physiological effects	IEX-1L	Immediate early gene
Amiloride-sensitive sodium channel	Sodium channel	TRAF-1	TNF-receptor associated factor
*CD23	Celul-surface molecule	TRAF-2	TNF-receptor associated factor
CD69	Lectin mainly on activated T	Genes de respuesta temprana	
		*B94	Early response

GEN	FUNCIÓN	GEN	FUNCIÓN
Enzimas			
ADH	Liver alcohol dehydrogenase	*Egr-1	Mitogen-induced early response gene; zinc finger
ARF-related protein-1	GTPase	p22/PRG1	Rat homologue of IEX
*Ceramide glycosyl transferase	Glycosphingolipid	*p62	Non-proteasomal multi-ubiquitin chain binding protein
*cis-retinoid/androgen dehydrogenase type 1	Short cadena dehydrogenase	*TIEG	TGF-b early response gene; zinc finger protein
*cis-retinoid/androgen dehydrogenase type 2 (CRAD2)	Short cadena dehydrogenase		
Collagenase 1	Matrix metalloproteinase	Miscelánea	
*Dihydrodiol dehydrogenase	Oxidoreductase, oxidation of trans-hydodiols	alfa-1 acid glycoprotein	Serum protein
*ENO2	Enolase 2 gamma	AMH	Anti-Mulleriahormone
*GAD67	Glutamic acid decarboxylase	Apolipoprotein C III	Apoprotein of HDL
GD3-synthase	Sialyltransferase	*Biglycan	Connective tissue proteoglycan
Gelatinase B	Matrix metalloproteinase		
GSTP1-1	Glutathione S-transferase	*Caveolin-1	Lipid raft protein
*Glucosel-6-phosphate dehydrogenase	Hexose monophosphate	Cyclin D1	Celul-cycle regulation
* HO-1	Hemeoxygenase	*Cyclin D3	Celul-cycle regulation
Hyaluronan synthase	Synthesizes hyaluronic acid	Factor VIII	Hemostasis
H+-K+ATPase alfa2	Role in potassium homeostasis	Gadd45beta	ADN repair/celul cycle
Lipocalin-type prostaglandin D synthase (L-PGDS)	Prostaglandin D2 synthase in brain	Galectin 3	b-galactosidase-binding lectin
Lysozyme	Hydrolyzes bacterial celular walls	epsilon-Globin	Globin protein
Mmp-9, matrix metalloproteinaase-9	Secreted gelatinase involved in metastasis	*GS3686	Homology to microtubule aggregating protein
iNOS	Inducible nitric oxide synthase	HMG14	High mobility group 14
PIM-1	Ser/Thr kinase	K3 Keratin	Intermediate filament protein
*PTGIS, prostaglandin synthase	Prostaglandin synthase	Laminin B2	Basement membrane
Serpin 2A	Serine protease	Cadena	

GEN	FUNCIÓN	GEN	FUNCIÓN
TERT (mouse)	Telomerase catalytic subunidad	Mts1	Multiple tumor suppressor
Transglutaminase	Params isopeptide bonds	Mucin (MUC-2)	Airway defense glycoprotein
*Xanthine Oxidase	Oxidative metabolism of purines	*Pax8	Paired box gene
		*PCBD	6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase
		Perparain	Pore-paraming effector molecule
		*PGK1	Phosphoblycerate kinase
		Pregnancy-specific glycoprotein nCGM3	Placental expression
		Prostate-specific antigeno	Serum protein in prostate cancer
		*UBE2M	Ubiquitin conjugating enzyme E2M
		*UCP-2	Uncoupling protein-2
		Vimentin	Intermediate filament protein
		Wilm's Tumor Suppressor Gene	Tumor suppressor

2.4.5. NF- κ B y APOPTOSIS

El NF- κ B es un factor pro o antiapoptótico?

Lo que se sabe es que el NF- κ B regula la apoptosis desde el desarrollo fetal (Beg, 1995; Kanegae, 1998).

Estudios distintos demuestran que diferentes subunidades NF- κ B tienen distintos efectos en apoptosis (Baeuerle y Baltimore, 1996; Van Antwerp, 1998). Ratones deficientes de p65 demuestran una masiva degeneración hepática por apoptosis, determinando la muerte embrionaria en el 15-16 día de gestación (Beg, 1995). Ratones *knock-out* de la unidad p50 (Sha, 1995) y Rel (Weih, 1995) no presenta ningún cambio debido a la apoptosis. La sobreexpresión de la unidad c-Rel, en embriones de aves y de las células óseas marrones *in vitro*, induce la apoptosis (Abbadie, 1996). La subunidad p65 es un factor proapoptótico en células 293 y COS (Grimm, 1996). Por todo lo expuesto anteriormente, el NF- κ B es un factor de transcripción que tiene un efecto pro o antiapoptótico en función del tipo de células, del estímulo y de la subunidad activada.

El efecto antiapoptótico NF- κ B resulta como respuesta a la vía celular inducida por el factor tumoral de necrosis (TNF α) (Gerondakis, 1998; Van Antwerp, 1996; Wang, 1996; Beg y Baltimore, 1995). El mecanismo protector antiapoptótico consiste en la activación NF- κ B, que determina la expresión génica de factores inhibidores apoptóticos (IAP-1, IAP-2), TRAF-1 y TRAF-2 (TNFR associated factor-1 y -2) (Wang, 1998). Estas proteínas cooperan e interaccionan suprimiendo la actividad de la caspasa 8, inhibiendo la muerte celular por apoptosis.

Otro gen activado por NF- κ B incluye al c-myc (Wu, 1996), esencial para la supervivencia de la línea celular WEH1 231 murine B.

La subunidad p65, pero no la p50, en células HeLa activa al factor tumoral p53.

Los dos genes c-myc y p53 son esenciales en el proceso de involución en la glándula mamaria.

El papel de NF- κ B está demostrado tanto en la supervivencia de las células endoteliales (Scatena, 1998) como en las epiteliales de distintos tejidos (Li, 1998; Eicher, 1996; Soler, 1999).

NF- κ B es un factor de transcripción que induce genes tanto pro como otros antiapoptóticos (Tabla I.5)

Tabla I.5. Genes pro y antiapoptóticos inducidos por el NF- κ B

GENES	FUNCIÓN	REFERENCIA
Bfl1/A1	Pro-survival Bcl-2 homologue	Grumont y colab.,1999
Bcl-xL	Pro-survivalBcl-2 homologue	Clark y colab,1999
Bcl-2	Pro-survival factor	Catz y Johnson, 2001
Caspase -11	Caspase	Schauvliege y colab,2002
Nr13	Pro-survivalBcl-2 homologue	Lee y colab., 1999
c-FLIP	Pro-survival factor	Kreuz y colab.,2001
CD95 (Fas)	Pro-apoptotic receptor	Chan y colab,1999
*Fas-associated phosphatase-1	Protein phosphatase	Irie y colab., 2001
Fas-Ligand	Inducer of apoptosis	Matsui y colab., 1998
IAPs	Inhibitors of Apoptosis	You y colab.,1997 Stehlik y colab., 1998
IEX-1L	Immediate early gene	Wu y colab.,1998
TRAF-1	TNF-receptor associated factor	Schwenzer y colab.,1999
TRAF-2	TNF-receptor associated factor	Wang y colab., 1998

Estudios distintos demuestran que diferentes subunidades del NF- κ B tienen distintos efectos en apoptosis (Baeuerle, 1996; Van Antwerp, 1998). Ratones deficientes en p65 demuestran una masiva degeneración hepática por apoptosis, determinando la muerte del embrión en el 15-16 día de gestación (Beg, 1995). Ratones *knock-out* de la unidad p50 (Sha, 1995) y Rel B (Weith, 1995) no

presentan ningún cambio debido a apoptosis. La sobreexpresión de la unidad c-Rel, en embriones de aves y en las células óseas marrones *in vitro*, induce la apoptosis (Abbadie, 1993).

2.4.5.1. Efecto antiapoptótico del NF- κ B

NF- κ B está relacionado con la actividad de algunas vías implicadas en el mecanismo apoptótico, como la vía de laS MAPKasas, en especial con JNK y p38.

- NF- κ B y JNK

Los agentes quimioterápicos y la radiación determinan la muerte celular por apoptosis en las células tumorales por el daño producido al DNA nuclear. El daño activa la cascada de las proteinkinasa de tipo c-jun N-terminal kinasa (JNKs) y de la p38 Kinasa. Un ejemplo práctico sería el Cisplatino (cis-Diamino dicloroplatinum c DDP) un quimioterápico muy utilizado (Sánchez-Pérez, 1998). El cisplatino activa tanto la vía JNK como la de p38. La activación de JNK tiene lugar por la vía de la cascada de las kinasa MEKK1 (SEK1) (Sánchez- Perez y Perona, 2002). Pero se sabe que en la fosforilación de la IKK, kinasa implicada en la activación de NF- κ B, están descritas 2 kinasa distintas: la NIK (NF- κ B induced kinase) (Malinin, 1997) y la MEKK1 (Lee, 1998). Teniendo como clave a la MEKK1, Perona en 2002 demuestra que el Cisplatino determina la muerte celular controlada, la apoptosis y la supervivencia en las células tumorales. Activando MEKK1 estimula la apoptosis, induciendo la transcripción del FasL mediante AP-1 y en paralelo activa al NF- κ B. La activación de NF- κ B se realiza por vía c-Jun que interfiere con la activación transcripcional de la unidad p65 dentro del núcleo e impide su expresión génica.

Hay estudios que demuestran la interrelación entre JNK y NF- κ B. (Maggirwar, 2000; Tang, 2001). Demuestrando que la activación del NF- κ B transcrita por TNF- α , inhibe la activación de JNK y protege las células de la apoptosis.

- NF- κ B y p38

La activación de p38 por la via de NF- κ B, tiene como estímulos a las citoquinas de tipo TNF- α (Carter, 1999). El estrés oxidativo por la via del TNF- α

inhibe la activación del NF- κ B y estimula p38, induciendo la apoptosis (Alpert, 1999).

- NF- κ B y TRAIL

TRAIL (TNF-related apoptosis – inducing –ligand) es un miembro de la familia TNF, que media la muerte celular en distintas líneas de células tumorales. TRAIL induce 2 señales, la muerte celular mediante las caspasas y la expresión génica mediante NF- κ B. La inhibición de la actividad NF- κ B inducida por TRAIL, aumenta la apoptosis y atenúa la resistencia al proceso.

TRAIL inducen la activación del NF- κ B (Degli-Esposti, 1997; Jeremias, 1998) que es acompañada de la degradación del I κ B α . Dos señales antagonistas, la inducción de la apoptosis y la activación del NF- κ B, parece ser una característica común entre DIL y citostáticos como la Doxorubicina (Beg, 1996; Ponton, 1996; Das, 1997).

- NF- κ B y daño DNA

Los agentes quimioterápicos pueden ejercer sus efectos curativos, activando la apoptosis en las células tumorales, impidiendo el progreso del proceso cancerígeno.

El grupo de Boland en 1997 demuestra por primera vez que, los agentes anticancerígenos que producen un daño a nivel del DNA, potencian la actividad del NF- κ B. Igual que el p53, la activación de NF- κ B por un daño al DNA demuestra la importancia de este en los puntos vitales del ciclo celular (Webster, 1999), siendo un factor determinante en la decisión de la célula en parar el ciclo celular, reparar el daño o entrar en apoptosis.

La topoisomerasa II (topoII) es uno de los mecanismos propuestos para la activación de NF- κ B en el caso del daño al DNA (Boland, 2000; 1997). Antraciclina, Mitoxantrone y el Etopósido, quimioterápicos utilizados en el cáncer de pulmón y de mama, activan tanto NF- κ B, por este mecanismo, como la apoptosis (Boland, 1998).

Las proteínas implicadas en la reparación, en el control de los puntos clave del ciclo son: DNA-PK (DNA dependent proteine kinase), PI3K (phosphoinositide 3-kinase-type protein), ATM (ataxia telangiectasia mutated). Todas están relacionadas con la actividad del NF- κ B (Boland, 2001).

- NFκB y TNFα

Distintos autores (Kirshenbaum, 2000; Regula, 2004; Sun, 2004) demuestra en un modelo de miocitos ventriculares, que la vía de señalización del NFκB es crucial para suprimir las señales apoptóticas mediadas por TNFα. Lo que destaca el efecto antiapoptótico de NFκB.

En estudios hechos en pacientes infectados con HIV en fase de demencia severa, se demuestra una relación entre la expresión de TNFα y la actividad del NFκB, y su papel en la apoptosis de la ADC (AIDS-Dementia-Complex) severa asociada al HIV. De la localización celular y del estado de la activación de NFκB en el cerebro de estos pacientes, se define la severidad del ADC (Rostasy, 2000). NFκB activo se localiza con prevalencia en los macrófagos y microglías perivasculares, tanto en la región frontal como en el ganglion basal y de la abundancia en esta región está correlacionada con el estado de demencia. En el mismo estudio se demuestra una relación entre la expresión celular y regional del TNFα y la actividad del NFκB. La correlación entre los dos define la severidad de la ADC (Rostasy, 2000). TNFα, NFκB y HIV forman parte de un complejo de autorregulación que en patogenia de esta infección viral inducen injurias a nivel cerebral y la pérdida progresiva del campo cognitivo.

- NFκB y caspasas

Entre la vía apoptótica de la caspasa 3 y la actividad del NFκB existe una relación. Kang en 2001 demuestra que durante la apoptosis la caspasa 3 rompe a nivel de Asp97 la unidad p65/RelA del NFκB. El utiliza un inductor apoptótico, el NA (2,3 dicloro-5,8-dihidroxi-1,4-naphthoquinone), un homólogo de la naftoquinone. Éste es un “trigger” apoptótico en las células HeLa y destruye el efecto antiapoptótico determinado de TNF-α. La unidad p65 se rompe proteolíticamente por la caspasa 3 pierde su actividad transcripcional y el efecto inductor proapoptótico de NA aumenta. Si se utiliza un mutante de p65, éste no se rompe y protege las células contra apoptosis. La caspasa 3 responsable de la ruptura se activa más bien por la vía interna citocromo c/caspasa 9 que por la extrínseca Fas/caspasa 8. La conclusión es que NA induce apoptosis por un control negativo sobre la supervivencia celular, a través de la ruptura de p65 por la caspasa 3.

Hay estudios que demuestran que la ruptura del NFκB por caspasas inhibe su actividad durante apoptosis (Ravi, 1998; Levkay, 1999).

- NFκB y ceramidas

Las ceramidas son segundos mensajeros de TNF, algunas veces utilizados en el proceso apoptótico y en la transducción del señal externo hacia la célula.

Boland en 1998 compara el efecto producido por un análogo de ceramida (la ceramida C2, N-acetylsfingosine) y TNF, sobre la actividad del NFκB relacionado con la apoptosis (Boland, 1998). La N-acetylsfingosina activa NFκB por la activación del complejo homodomérico p50. El demuestra que la C2 ceramida tiene solo un papel marginal en la degradación del IκBα, pero estimula el proceso de transformación del p105 a p50.

TNF por otra parte, estimula tanto la degradación del IκBα como la transformación del p105. El efecto de TNF sobre el NFκB es rápido, mientras que el del C2-ceramide necesita un tiempo (Boland, 1998).

2.4.5.2. Efecto proapoptótico

El efecto proapoptótico de NF-κB fue demostrado en el síndrome mielodisplásico (MDS= myelodyslastic syndrome). Es una hemopatía mieloide con tendencia a la evolución en leucemia aguda. Parece que la ineficiente hematopoyesis es debida a un incremento en apoptosis de las células hematopoyéticas intramedulares. Sanz en 2002, describe un aumento significativo en la unión de NF-κB al DNA en las células de la médula marrón en los pacientes con MDS en comparación con las células de donantes normales.

Slater en 1995 demuestra que los timocitos de ratón son sensibles a distintos estímulos que inducen apoptosis. En condiciones normales estas células expresan p50/ NF-κB/rel unido al DNA en núcleo. La actividad de este complejo se aumenta significativamente con el tratamiento con metilprednisolona o etoposide, dos agentes inductores proapoptóticos en estas células. Antioxidantes como pirrolidín ditiocarbamato (PDTC), inhiben la apoptosis en timocitos, previniendo la activación del factor NF-κB/rel.

2.5. P53

2.5.1. Definición

El gen supresor tumoral p53 (TP53-human *p53 tumor suppressor gene*) es un homotetrámero polipeptídico formado por 393 aminoácidos, que funciona como un factor transcripcional. p53 regula la expresión de genes implicadas en el control del ciclo celular, apoptosis, reparación de DNA y otras funciones celulares como la respuesta al estrés. La pérdida de su función, directamente por mutaciones en su estructura o indirectamente por otros múltiples mecanismos, determina el desarrollo de cáncer (Hollstein, 1991; Balint, 2001).

El gen p53 fue identificado y descrito por primera vez en 1979, en células transformadas por el virus SV40. El término supresor tumoral viene del hecho que la expresión de clones p53 salvajes suprime la transformación de células en cultivo activadas por oncogenes, y por el hecho de la frecuente delección de la zona del gen en varios tumores.

2.5.2. Estructura

El gen p53 se localiza en el brazo corto del cromosoma 17 (17p13), y está formado por 11 exones. La proteína p53 es un polipéptido formado por 393 aminoácidos, que tiene en su estructura tres regiones estructurales y funcionalmente distintas (Figura I.32).

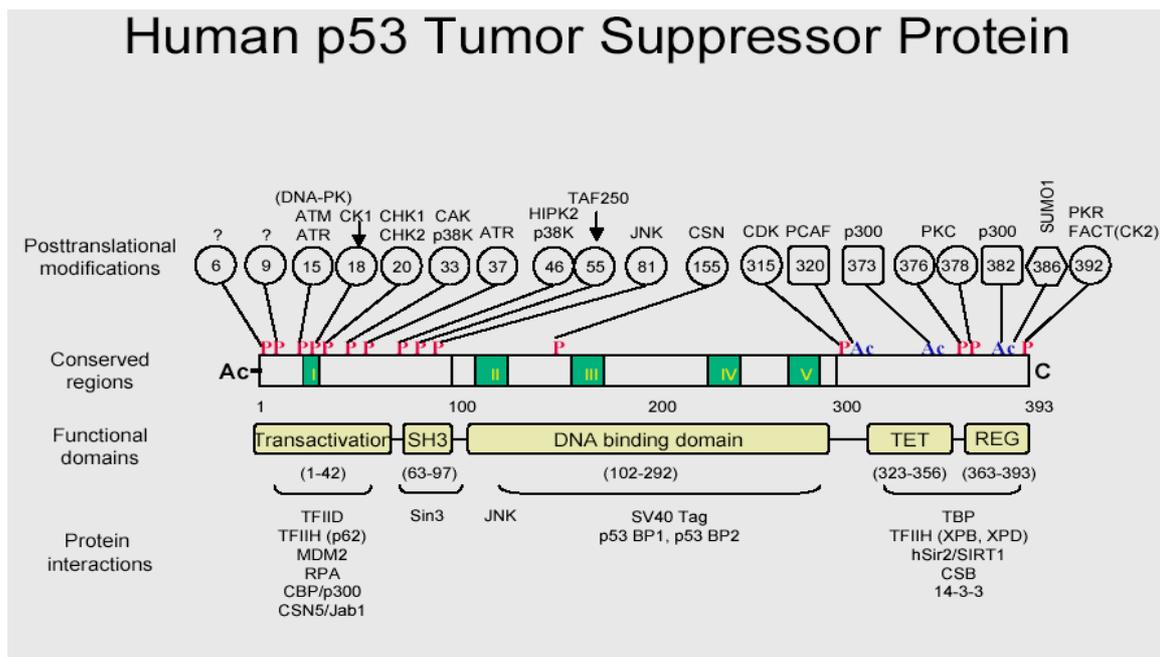


Figura I.32. Estructura de la proteína p53 (Anderson y Appella, 2001)

- Una región N-terminal, el dominio de activación transcripcional, que interacciona con las proteínas reguladoras.

Los residuos 1-42 de la región N terminal son necesarios para la actividad de transactivación e interaccionan con factores de transcripción de tipo: TFIID, TFIIH, distintos TAF, con histono-acetiltransferasas de tipo CBP/p300 y como también con MDM2.

- Un dominio central, que reconoce y se fija, a las secuencias dianas del DNA (102-292 aminoácidos, "DNA binding domain"). Es la zona mas conservada entre las especies y es donde se encuentran la mayoría de las mutaciones en los tumores humanos (Prives, 1999). Las mutaciones impiden el pliegue tridimensional de la proteína y por tanto su interacción con el DNA, evitando la activación transcripcional de las genes dianas en el DNA (Vogelstein y Kinzler, 1992)(Figura I.33).

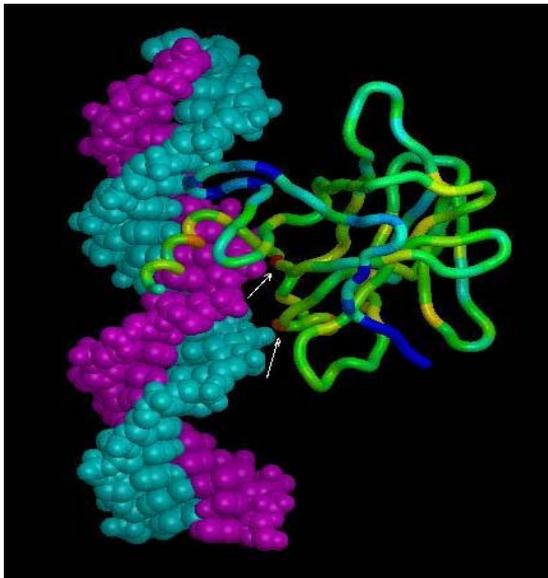


Figura I.33. p53 se fija del DNA por su dominio central. Las flechas indican los sitios mas predispuestos a las mutaciones en distintos tumores

- Una región C-terminal (293-393 aa), contiene la señal de localización nuclear (312-324), el dominio de tetramerización (323-356) y un segmento básico que fijan algunas estructuras del DNA como uniones, inserciones y deleciones en una secuencia de forma independiente (Wolkowicz, 1997).

La mayoría de las mutaciones estructurales afectan el dominio central, bloqueando o alterando el sitio de fijación al DNA. Solo p53 tetramérico es activo como factor de transcripción.

El p53 sufre unas modificaciones postranslocacionales que modifican el dominio N y C terminal, de tipo fosforilación y acetilación.

2.5.3. Regulación

El mecanismo bioquímico que regula la actividad p53 es muy complejo y no totalmente conocido, lo que se sabe seguro es que su activación como factor de transcripción se realiza en dos fases: una de estabilización y otra de activación.

2.5.3.1. Estabilización del p53

Como respuesta a las vías de señalización celular, p53 se estabiliza y se acumula dentro del núcleo. En condiciones de falta de estrés p53 se mantiene en concentraciones bajas y tiene una vida media muy corta, degradándose de forma ubiquitin-dependiente mediante el proteosoma 26S.

La ubiquitinación es un proceso por el cual la ubiquitina (polipéptido formado por 76 aa) se transfiere a los residuos de Lys de las proteínas que sufre este proceso. Las enzimas que catalizan la reacción son unas ubiquitin ligasas, Las proteínas una vez ubiquitinizadas se degradan dentro del complejo proteosómico 26S.

Durante la división, el primer sistema que ubiquitina a p53 es la MDM2 E3 ubiquitin ligasa. La actividad del MDM2 es vital para p53. El MDM2 se fija al dominio N terminal siendo necesaria para la ubiquitinización de los múltiples sitios de Lys del dominio C terminal.

p53 se fosforila y acetila en lugares situados cerca de los sitios de unión para MDM2, lo que determinará un cambio conformacional impidiendo la fijación de MDM2.

El CBP/p300 interactúa también con el dominio N terminal del p53 y se fija de forma destructiva, fosforilando la Ser15. Las Ser 6,9 y 15 o la Thr se cambian en Alanina lo que reduce la acetilación de la Lys 382.

2.5.3.2. Activación del p53

La acumulación de p53 no es suficiente para la completa actividad transcripcional (Agarwal, 1998). Por lo tanto es necesaria su activación de la forma latente. El proceso se realiza por una transición alostérica, en el dominio de fijación al DNA (Figura I.34.).

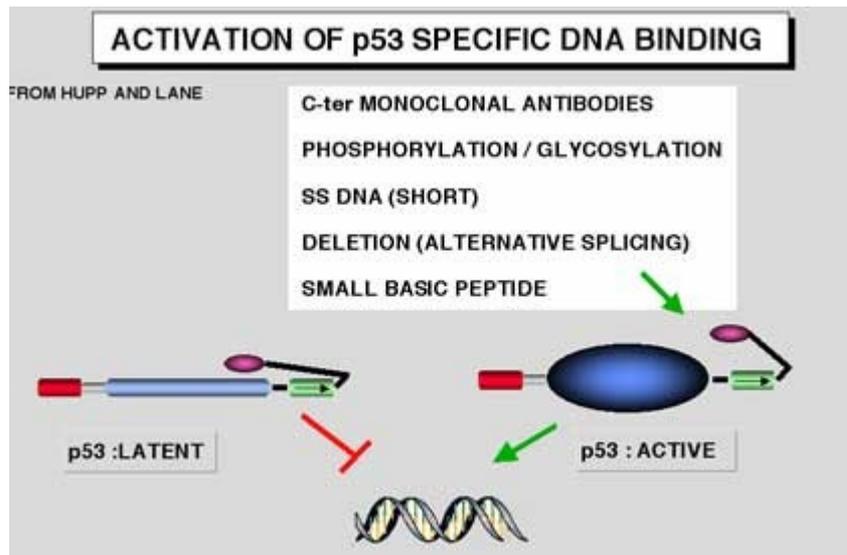


Figura I.34. Activación del p53 (Anderson y Appella, 2001)

Lo que se modifica es el dominio C terminal, que regula los sitios de fijación en el dominio central. El dominio C terminal sufre distintas modificaciones de tipo: fosforilación (Hupp, 1994), acetilación (Gu, 1997), fijación de anticuerpos y la ruptura del dominio C terminal en 30 amino acidos (Figura I.35.).

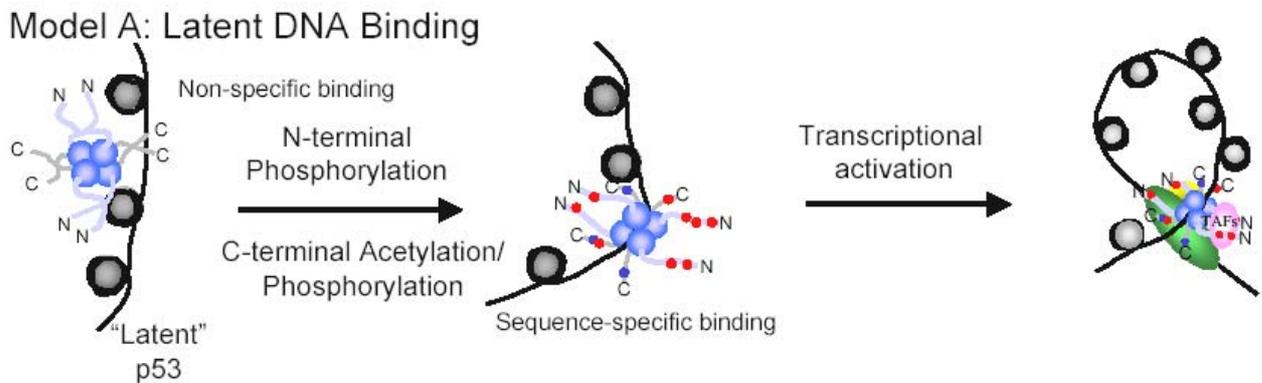


Figura I.35. Activación del p53 por acetilación y fosforilación (Anderson y Appella, 2001)

En la acetilación del dominio C se le atribuye un papel importante a la CBP/p300 y PCAF, que acetilan los residuos de Lys.

El dominio N terminal se puede también acetilar bajo la actividad de la HAT (histone acetyltransferase) teniendo como coactivador a la CBP/p300 y como corepresor a HDAC (histone deacetylase) y Sin3 (Ayed, 2001)(Figura I.36).

Model B: HAT/HDAC Recruitment and Chromatin Remodeling

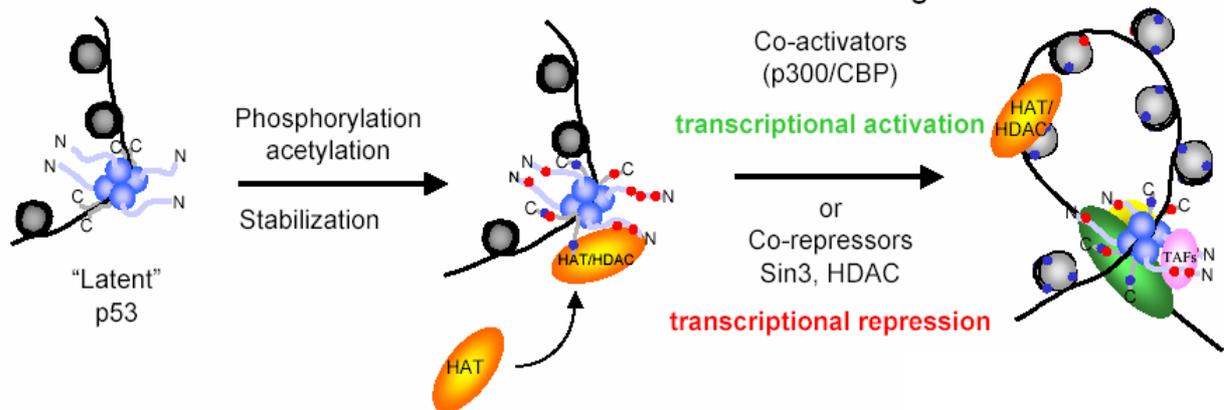


Figura I.36. Modelo de activación de p53 que implica la presencia del HAT con su coactivadores y supresores ((Anderson y Appella, 2001)

El mecanismo de acetilación no esta completamente conocido, pero parece que se inicia por la formación de un complejo entre p53 y p300/CBP.

2.5.4. Estímulos

Las células de los mamíferos parecen que tienen por los menos dos vías de señalización completamente distintas para activar p53, como respuesta a los agentes genotóxicos: una en la cual se rompe completamente la doble hélice del DNA y otra en la que hay lesiones de las bases pirimidínicas o a las bases adyacentes.

Bajo factores genotóxicos o no genotóxicos se producen cambios postraduccionales en la estructura de p53, que determina su implicación en distintos procesos.

2.5.4.1. Factores genotóxicos de estrés

Los factores genotóxicos de estrés son:

a) las radiaciones ionizantes, que determinan la activación de:

- ATM (que fosforila directamente p53 a nivel de Ser15 en el dominio N terminal),
- IPI-3K (que fosforila p53 a nivel de Ser15 y Ser37)
- CK1 (casein kinasa 1) (que fosforila residuos distales de Ser y Treonina – Ser 6 y 15 y la Thr18 (Sakaguchi, 2002).

b) las radiaciones UV que inician vías de activación de p53 por la activación de ATR (A-T and Rad3-related) (Abraham, 2001), de p38 MAPK, JNK.

Bajo los factores genotóxicos se producen reacciones de fosforilación, pero también de acetilación. Parece que la acetilación se realiza a nivel del dominio C-terminal y que algunas veces necesita la fosforilación previa del dominio N-terminal, en especial la Ser 15, 6, 9 y Thr 18 (Saito, 2002). Parece que las UV producen acetilación antes que las radiaciones infrarrojas.

c) Otros factores genotóxicos determinan también la activación por fosforilación:

- fármacos anticancer (adriamicina)
- Inhibidores de topoisomerasa (aphidicolin, actinomicina D, 5,6-dicloro-1-beta-D-ribofuranosilbensimidazol (DRB)
- agentes de cross-linking al DNA (cisplatino, mitomicina C)
- compuestos químicos: As, Cd, Cr.

2.5.4.2. Factores no genotóxicos de estrés

Estos factores incluyen a: la hipoxia, la depleción de ribonucleótidos, la interrupción de los microtúbulos, la activación de algunos oncogenes y la replicación durante el envejecimiento.

a) La hipoxia induce la transcripción bajo la regulación de GADD45, Bax y p21 (Koumenis, 2001). En el proceso de acetilación durante la hipoxia, p53 forma primero un complejo con mSin3A y después se une a p300.

Un papel importante en el proceso de hipoxia-anoxia se le atribuye al HIF

b) Las vías de activación bajo la depleción de ribonucleótidos o la interrupción de los microtúbulos estructurales se realiza por mecanismos menos conocidos, pero completamente distintos de los factores genotóxicos, como si fuera la intervención de la PALA (N-phosphoacetyl-L-aspartate) (Linke, 1996) o la intervención de las Erk1/2MAPK en caso de la ruptura del sistema microtubular (Sablina, 2001).

- c) Oncogenes como Ras, c-Myc o E1a, estabilizan o activan p53 en función del tipo de células. Las Ras inducen envejecimiento, mientras que el c-Myc y E1a apoptosis.
- d) La replicación durante el envejecimiento en fibroblastos humanos está correlacionado con la vía de transcripción de p53 y el incremento (en la fosforilación de la Ser15 y Thr18; y probablemente en la Ser 376) y/o un descenso en la fosforilación de la Ser 392 (Webley, 2000).

Parece que el acortamiento o interrupción de la estructura del telómero tiene como señal la vía de p53.

2.5.5. Funciones

p53 es un factor de transcripción que moviliza mecanismos celulares vitales. Los cuales tienen como finalidad inhibir el crecimiento aberrante de las células, debido a distintos factores como: daño al DNA, activación de los oncogenes, hipoxia y la pérdida de contacto entre las células normales (Jin y Levine, 2001). p53 impide el crecimiento celular induciendo: envejecimiento (actuando en la fase G1 y/o G2 del ciclo celular) o determina la muerte celular por apoptosis (Jin y Levine, 2001). El criterio exacto por el cual el gen toma la decisión no es muy conocido, pero parece que depende: del tipo de señal que determine el estrés, del tipo de células y del tiempo y situación en el ciclo celular sobre cual actúa el estímulo (Balint y Vousden, 2001). Las mutaciones dentro de la estructura de p53, determinan su imposibilidad de actuar en circunstancias de estrés, lo que determina el desarrollo del cáncer, de ahí el papel de p53 en cancerogénesis.

2.5.6. P53-apoptosis

El papel de p53 en apoptosis fue demostrado por primera vez en 1991 por Yonish-Rouach. Ahora se sabe que p53 está implicado en la regulación transcripcional de distintos componentes de la vía intrínseca y extrínseca de la apoptosis.

2.5.6.1. P53-vía extrínseca apoptótica

p53 induce la expresión génica de 3 proteínas transmembranarias; Fas, DR5 y PERP.

- La inducción de Fas se realiza como respuesta a las irradiaciones γ y parece que es un proceso específico para algunos tejidos como el vaso, timo, riñón y pulmón (Bouvard, 2000). Parece que en linfocitos el proceso Fas-p53 dependiente es imprescindible (O'Connor, 2000).
- El segundo receptor p53 dependiente es el DR5/KILLER, el del receptor TRAIL. Se induce como respuesta al daño al nivel del DNA (Wu, 1997) y a las radiaciones γ .
- El mecanismo exacto de la expresión del PERP (putative tetraspan transmembrane protein) por p53 no está completamente elucidado. PERP es miembro de la familia PMP-22/gas proteínas. La PERP se induce como respuesta al daño a nivel de DNA e implica en su vía de activación apoptótica al E2F-1 (Attardi, 2000)(Figura I.37.)

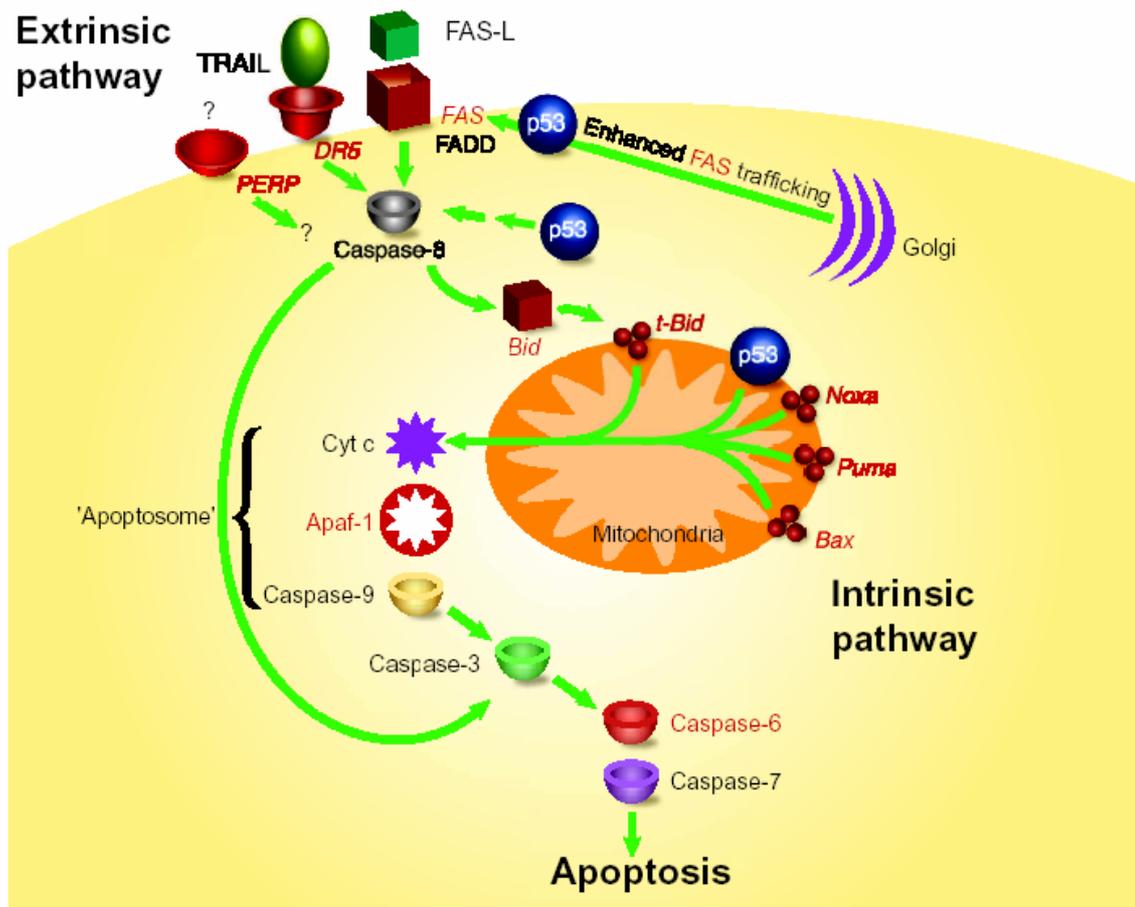


Figura I.37. Vía extrínseca e intrínseca de p53 en apoptosis (Haupt, 2003)

2.5.6.2. P53- vía intrínseca apoptótica

La vía intrínseca de la apoptosis está regulada por la familia Bcl-2, que determina la liberación del citocromo c de la mitocondria en el citoplasma.

p53 induce genes de algunos representantes de la familia Bcl-2 como es: Bax, Noxa, PUMA y mas recientemente al Bid.

- Bax fue el primer miembro de la familia Bcl-2 que fue descrito como inducido por p53. p53 induce Bax como respuesta a las radiaciones γ (Chong, 2000) y contribuye en la expresión del E1A en fibroblastos durante quimioterapia (McCurrach, 1997).
- PUMA (p53 upregulated modulator of apoptosis) conocido también como BBC3 (Bcl-2binding component 3) se induce por p53 como respuesta al daño de DNA. El balance entre PUMA y la p21 determina el hecho que la célula pare o entre en apoptosis. El Bax es precisamente necesario en la vía apoptótica mediada por PUMA, por lo tanto es una diana indirecta (Yu, 2003). La expresión de PUMA determina la translocación mitocondrial de Bax, induciendo apoptosis. De este modo, aunque p53 puede unirse al promotor de Bax, la afinidad es débil en comparación con la unión de p21 y PUMA. (Kaeser y Iggo, 2002)
- Noxa, se induce por p53 como respuesta a la acción de radiaciones X (Oda, 2000).

p53 puede inducir apoptosis por mecanismos independientes de la transcripción. En algunas condiciones p53 induce apoptosis en ausencia de la transcripción o síntesis proteica. (Caelles, 1994). Este mecanismo es mas frecuente en células transformadas que en las células normales de tipo linfocitos o fibroblastos. Precizando la presencia de E2F-1 (factor de transcripción de de la vía proteica del retinoblastoma Rb) (Vogt Sionov y Haupt, 1999).

2.5.6.3. p53- inhibe las vias de supervivencia

p53 actúa sobre la vía de supervivencia de Akt (Figura 1.38.).La vía de supervivencia por Akt se inicia por factores de crecimiento o supervivencia celular. Implica la participación de la kinasa PI3K que actua sobre la Akt fosforilándola por la PDK1 (3'-phosphoinositide-dependent kinase) (Lawlor y Alessi, 2001). Akt fosforila a MDM2 (Mayo, 2002), que entra dentro del núcleo donde se acumula. Lo que determina un incremento en la interacción con p300 y reduce la afinidad de

MDM2 para el p19ARF. Por lo tanto el Akt aumenta la inhibición y la degradación del p53 por el MDM2.

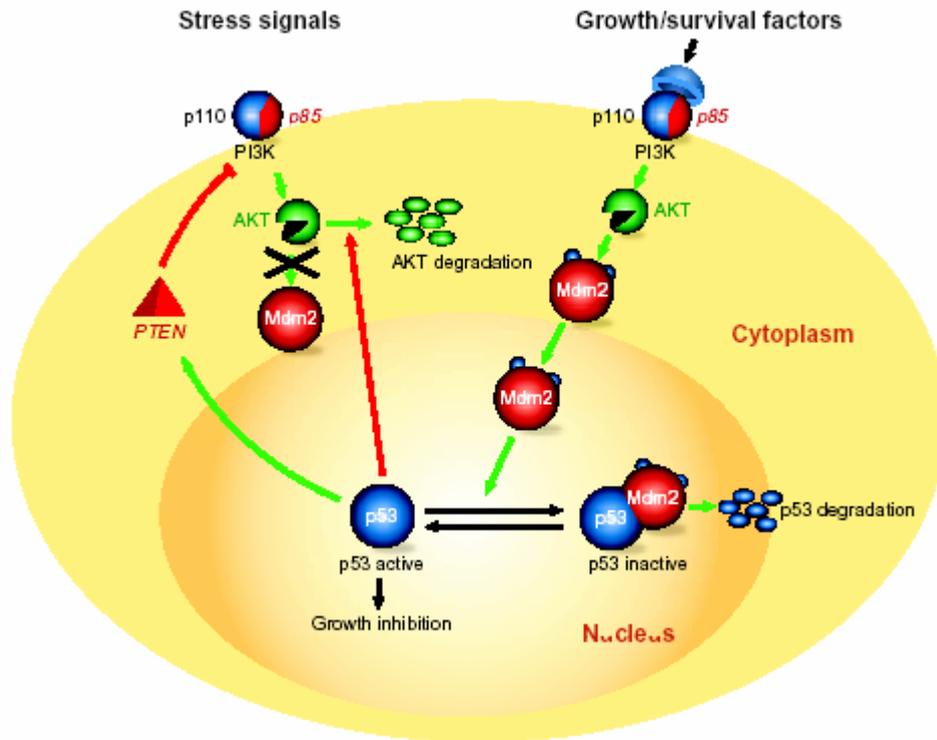


Figura I.38. p53 inhibe la vía de supervivencia del Akt (Haupt, 2003)

p53 se opone a toda esta vía por distintos mecanismos;

1. Promueve la activación de caspasas que rompen y degradan de forma secuencial Akt (Gottlieb, 2002)
2. Induce la expresión de PTEN, gen tumoral supresor que codifica una fosfatasa que defosforila al PI3K, impidiendo de esta manera la fosforilación del Akt.
3. Induce la expresión génica de la Ciclina G, la cual recluta la fosfatasa PP2AB' ante el complejo MDM2-p53. La MDM2 se defosforila al mismo nivel donde se fosforila Akt.

Todo el mecanismo descrito anteriormente está interrumpido en cáncer, debido a las mutaciones de los genes PTEN o a una amplificación de MDM2 (Mayo, 2002).

II. APOPTOSIS EN LA GLÁNDULA MAMARIA

1. Generalidades

1.1. Definición

La glándula mamaria es un tejido dinámico. Las etapas en el desarrollo normal son: la pubertad, la gestación, la lactancia y la involución. En la pubertad el epitelio glandular tiene un carácter expansivo, alcanzando un estado funcional adecuado por el proceso de mamogénesis. Durante la gestación se realiza la diferenciación secretoria, mientras que en el periodo de lactancia, se establece la secreción láctea (lactogénesis) y el mantenimiento de la lactancia (galactopoyesis). En la involución la glándula mamaria vuelve al reposo, pero nunca vuelve completamente a su estado original.

1.2. Anatomía

La glándula mamaria es de tipo tubuloalveolar, compuesta de 15-25 lóbulos irregulares, dispuestos en forma radiada a partir de la papila mamaria. Los lóbulos se subdividen en lobulillos de diversos órdenes.

La glándula mamaria esta formada por distintos tipos de células que se organizan en 2 compartimiento:

- a) el epitelial que representa el parénquima
 - b) el estromal que representa el mesénquima.
- a) El parénquima maduro tiene aspecto de árbol con ramas florecidas (Figura I.39)

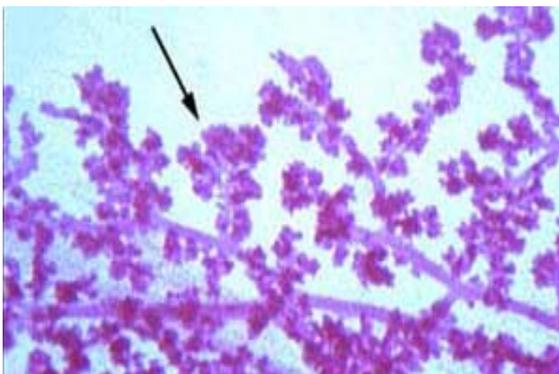


Figura I.39 Estructura alveolar de la glándula mamaria en el día 8 de

gestación

El epitelio glándular mamario consiste en una red de conductos (Figura I.40a), que comienza con el ducto galactóforo, a nivel del pezón. Este se va ramificado, formando los ductos alveolares, recubiertos de pequeñas invaginaciones saculares, que son los alvéolos (Figura I.40b).

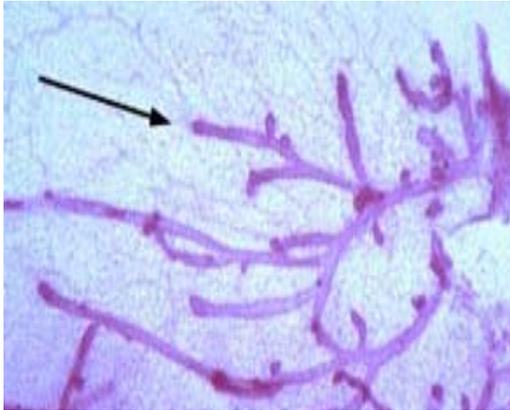


Figura I.40a
Ductos alveolares en glándula mamaria
(día 10 de vida)

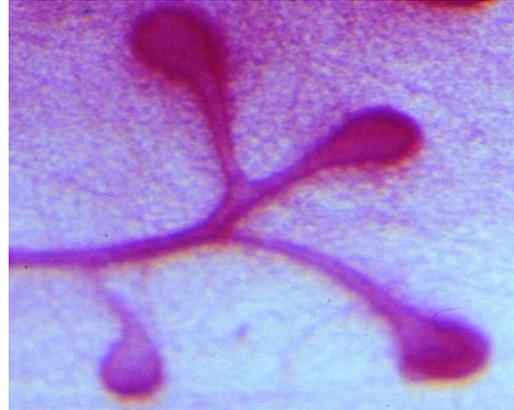


Figura I.40b
Ducto alveolar terminal con alveolo en
"dedo de guante"

El parénquima está compuesto por distintas estructuras epiteliales, con distintas actividades morfológicas, funcionales y proliferativas. Estas son:

- El lumen epitelial de los ductos y alveolos (Figura I.41 a y b).



Figura I.41a
Lumen de un ducto galactóforo



Figura I.41b
Lumen de alveolos secretorios

- La capa epitelial rodea el lumen epitelial, formando una capa

continua o discontinua, en función del estado funcional de la glándula (Figura I.42). Durante su desarrollo funcional, el epitelio ductal pasa de su forma cúbica, columnar, a la forma piramidal (antes de secreción) y globular (después de la secreción) en los alvéolos.

Las células epiteliales sintetizan y secretan la membrana basal que separa el epitelio del tejido conectivo adyacente (Ferguson, 1992; Gordon, 1980). Las proteínas componentes de la membrana basal son: colágeno tipo IV, laminina, proteínas contráctiles de tipo miosina y actina (Bocker, 1992; Dundas, 1991). Las células de la membrana basal y sus derivados son muy importantes. Su ausencia en el cáncer de mama indica el carácter invasivo de un carcinoma (Fering, 1991).

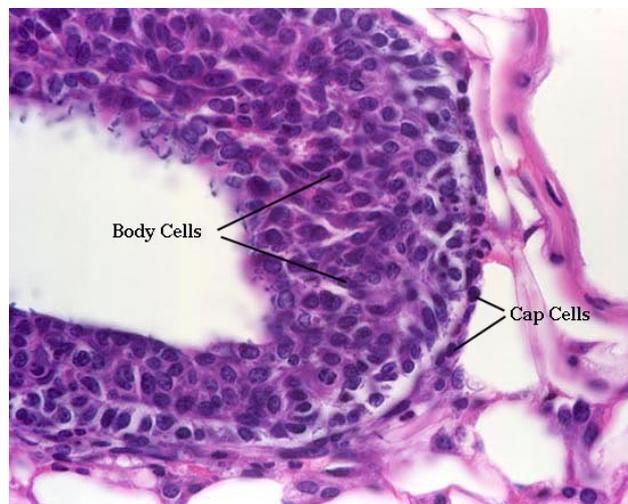


Figura I.42. Capa epitelial en un alveolo de glándula mamaria

b) El mesénquima, es un tejido conectivo estromal que rodea los ductos, y los alveolos. Difieren en consistencia, composición y densidad en función del estadio evolutivo de la glándula (Figura I.43.).

- Los fibroblastos existentes en este tejido rodean el epitelio hacia la superficie basal del mioepitelio y el compartimiento adiposo. En la periferia de la región de grasa, se evidencia una cápsula vascularizada de tejido conectivo fibrilar, que delimita los márgenes de la glándula mamaria. Este borde sirve como una "zona de inhibición", como límite en el desarrollo epitelial. Septos de esta cápsula dividen la glándula en lóbulos, que también inhiben la invasión ductal (Silberstein, 1992).

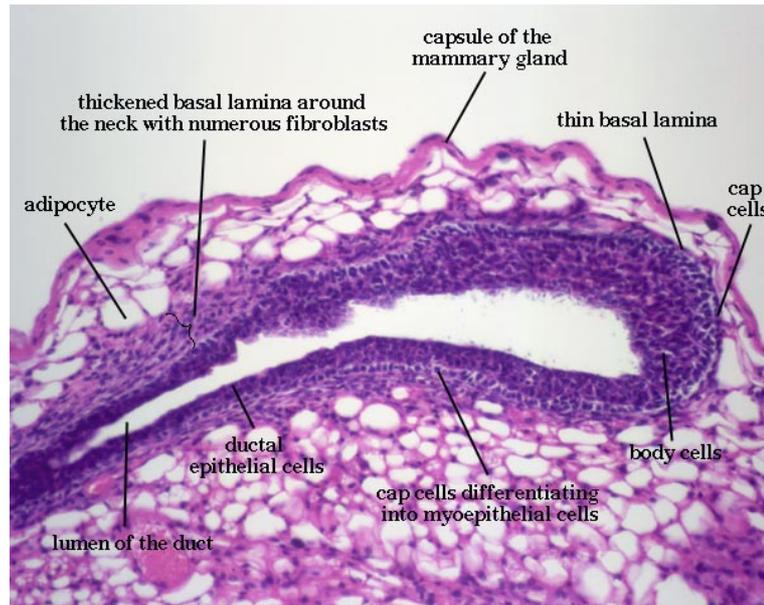


Figura I.43. Componentes del mesénquima glandular mamar

- Los adipocitos poseen una membrana basal rica en laminina. Durante la lactancia e involución, el cambio numérico y morfológico rápido, sugiere que es parte de los cambios fenotípicos lipídicos intracelulares, descritos tanto en modelos “*in vitro*” como “*in vivo*” (Matsumoto, 1995; Neville, 1998). Si en ratones están dispuestos de forma multilocular y unilocular, en la rata la mayoría de los adipocitos se disponen unilocularmente (Matsumoto, 1992).
- El tejido estromal tiene muy buena vascularización tanto sanguínea como linfática (Figura I.44). Los vasos linfáticos son más visibles durante la involución.

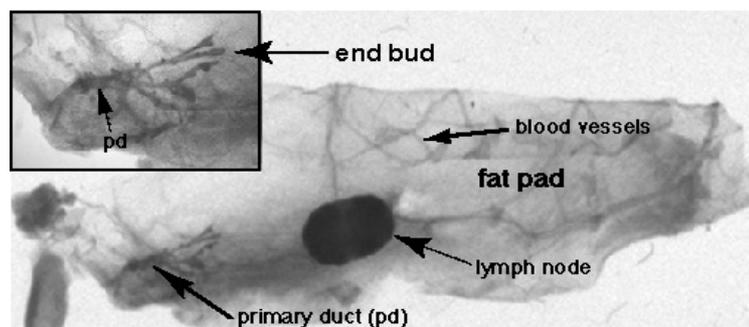


Figura I.44. Vascularización linfática y sanguínea en un lóbulo mamar

En la rata, la glándula mamaria está dispuesta subcutáneamente de forma extensiva. Se organiza en tres grupos, el grupo torácico, abdominal e inguinal. El

grupo inguinal está representado por un grupo de 6 pares de glándula, cada una con un pezón único.

1.3.El desarrollo de la glandula mamaria

El desarrollo embriológico de la glándula mamaria empieza en el día 10-11 de vida y proviene de la penetración del epitelio en el mesénquima. Hasta el día 13 el desarrollo es idéntico, tanto en macho como en hembra. Empezando con el día 13, en el macho los testículos empiezan a producir andrógenos y el epitelio mamario decrece en volumen y adquiere una forma irregular. En la hembra, desde el día 14 empieza la elongación del ducto primario (Figura I.45a). En el día 16 prolifera rápidamente de forma que antes del nacimiento ésta forma una estructura glandular rudimentaria con aspecto al árbol ductal ramificado (Figura I.45b).

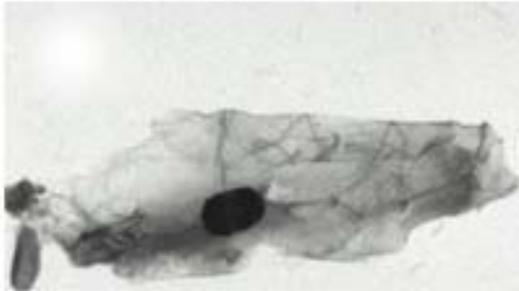


Figura I.45a
Glándula mamaria en un neonato

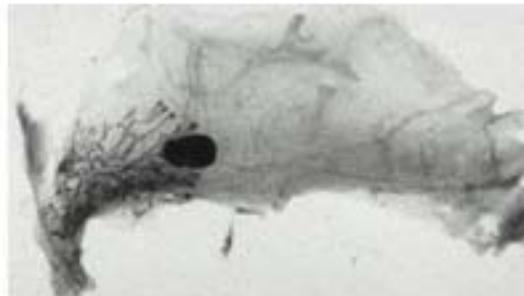


Figura I.45b
Glándula mamaria en el día 24 de vida

Después del desarrollo embriológico, la glándula mamaria se queda inactiva durante unos 21 días , hasta que los ovarios empiezan a secretar hormonas (Daniel, 1987).

El desarrollo postnatal sucede en 2 fases:

- a) El crecimiento ductal, que se inicia en la pubertad
- b) La diferenciación alveolar, que se realiza en los primeros días de gestación

- a) Pubertad

La pubertad comienza en la rata con el día 32 hasta 42 de vida (Russo, 1978). El crecimiento ductal produce la formación de una red de ramificaciones, desde el ducto primario epitelial hasta el límite del tejido adiposo, parecidas a las

ramas de un árbol, delimitando de esta manera lóbulos glandulares (Figura I.45c). Después del día 55, el número de lóbulos se quedan estables (Figura I.45d); los que empiezan son los cambios de dimensión y secreción dentro de cada lóbulo, con la formación de lobulillos.

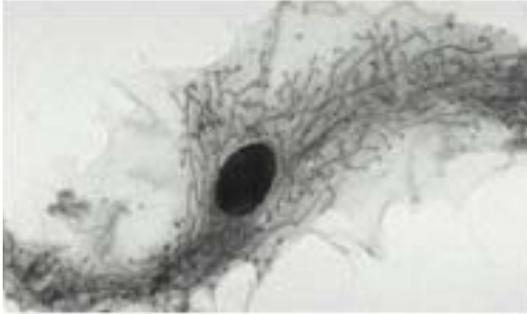


Figura I.45c
Glándula mamaria en el día 42

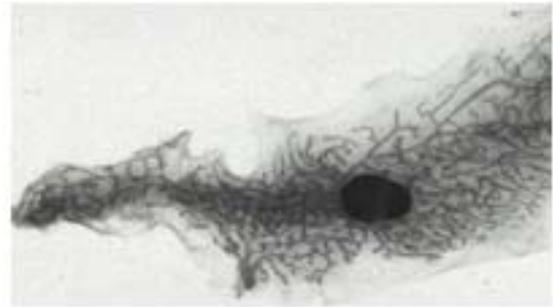


Figura I.45d
Glándula mamaria en el día 70

b) Gestación y lactancia

El pico de diferenciación mamaria es en los días 19-21 de gestación (Richert, 2000). En la primera fase de gestación la glándula crece en volumen, se produce una masiva proliferación de los ductos epiteliales (Figura I.45e). En la segunda, los alvéolos se rompen del árbol ductal, se individualizan y se definen como lóbulos que empiezan secretar la leche durante la lactancia. Esta última fase se conoce en el desarrollo de la glándula como la fase lóbulo-alveolar (Figura I.45f).

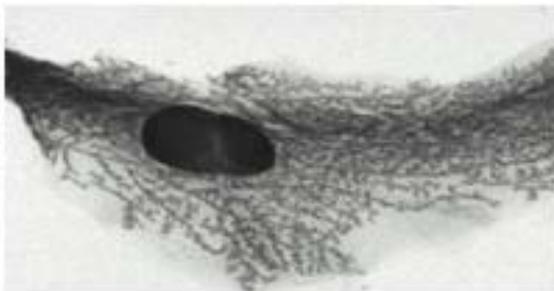


Figura I.45e
Aspecto de la glándula mamaria en el día 9 de gestación

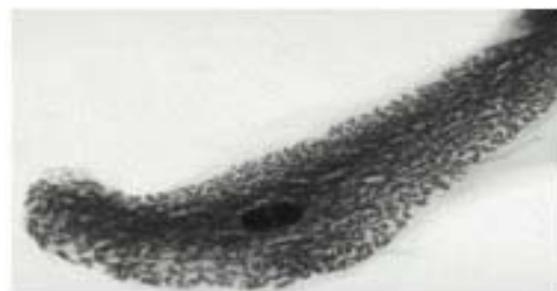


Figura I.45f
Aspecto de la glándula mamaria en el día 16 de gestación

Durante la gestación la masa del estroma glandular disminuye con el tiempo a favor del epitelio secretor glandular.

Desde el día 18 de gestación, las células alveolares producen lípidos y proteínas de la leche, preparando la lactancia. Las células mioepiteliales que rodean los alveolos, devienen una barrera menos continua, por lo tanto las células epiteliales alveolares están en contacto con la membrana basal. Este contacto es crítico para la diferenciación íntegra y la secreción de la leche (Richert, 2000). Un día antes del parto, las células epiteliales acumulan retículo endoplásmico rugoso, el aparato Golgi y las vesículas secretoras empiezan a liberar lípidos y proteínas de la leche (Richert, 2000).

En lactancia las células mioepiteliales forman un anillo discontinuo alrededor de cada alveolo y como respuesta a la secreción de oxitocina, determinan la liberación de leche desde los alvéolos dentro del lumen alveolar (Richert, 2000). El epitelio laminar alveolar se cambia en uno cuboidal o piramidal, debido a la acumulación de la leche dentro del lumen alveolar y de la presencia de lípidos globulares de la leche. Cuando la lactancia está bien definida, la grasa de los adipocitos se metaboliza y los alvéolos se extienden en toda la masa glandular (Neville, 1999).

El proceso de lactancia continúa aproximadamente unas 3 semanas; si las crías se quitan, la glándula entra en un proceso de involución.

2. Involución de la glándula mamaria

La involución de la glándula mamaria tras el destete es un proceso de remodelación, debido al proceso de muerte celular por apoptosis (Walker, 1989; Strange, 1992).

El proceso apoptótico en los primeros dos días tras el destete puede ser un proceso reversible, la glándula es capaz de volver al estadio de lactancia (Li, 1997). En el día 2 de la involución los alvéolos parecen estar relativamente íntegros y en el espacio luminal son evidentes algunos cuerpos apoptóticos (Walter, 1989; Fadok, 1999).

Después del día 2, la glándula regresa de forma irreversible a un estadio de pre-gestación. Con el día 4 de involución las células epiteliales empiezan a morir, los alvéolos se colapsan. Mientras el epitelio alveolar se desorganiza, el epitelio ductal se hace visible y un denso estroma aparece a su alrededor. Con el tiempo, los adipocitos parecen que se reparan y se organizan en forma multilocular. Otros elementos del estroma se rehacen y se concentran alrededor de los alvéolos y los colapsan. La involución del epitelio alveolar y ductal es más evidente distal al pezón.

Desde el día 6 de involución, los alvéolos son completamente colapsados, tanto el epitelio, como el estroma es completamente reordenado (Strange, 1992).

Estudios cuantitativos del DNA demuestran un fuerte descenso desde el día 10 de involución, cuando el tamaño lobular también disminuye. Los cuerpos apoptóticos se hacen visibles hasta el día 14 tras el destete (Strange, 1992). Mientras el epitelio glandular se va reduciendo, algunos alvéolos lobulares pueden permanecer al lado y distal del pezón, lo que va a diferenciar una glándula mamaria multípara de una nulípara.

En el día 21 de involución la glándula es completamente remodelada y preparada para un nuevo ciclo evolutivo (gestación, lactancia e involución)(Figura 46).

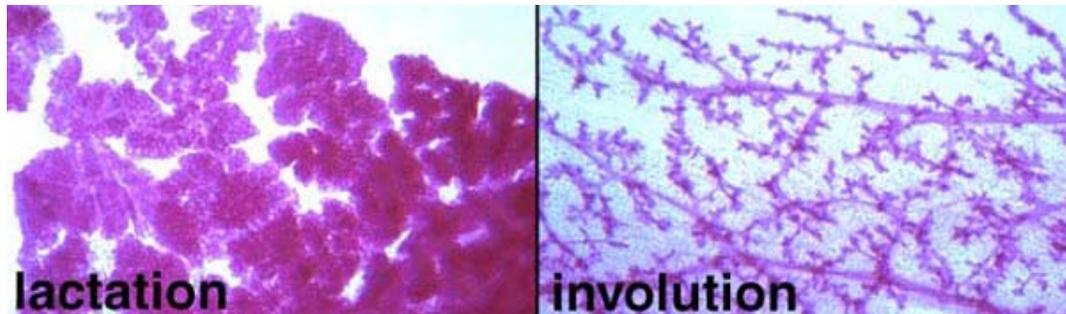


Figura I.46. Estructura alveolar de la glándula mamaria durante la lactancia y al final de la involución

3. Regulación del desarrollo e involución de la glándula mamaria

3.1. Regulación del desarrollo

La glándula mamaria es un órgano “diana” para una gran variedad de hormonas. El desarrollo glandular mamario es debido a la combinación de esteroides y polipéptidos. Los principales son el estrógeno y la progesterona. A cuales se les añaden la acción de modo indirecto, la hormona adrenocorticotropa (ACTH) y la hormona tireotropa (TSH). La hipófisis también ejerce una acción directa en mamogénesis, por medio de su secreción de prolactina y de somatotropina (STH).

La lactancia está influenciada en principal por la prolactina (Flint ,1997). Su acción hormonal es indirecta, siendo mediada por la estimulación de la producción

local de algunos factores de crecimiento como sería el IGF-1 (insulin-like factor I), producido por las células estromales de la glándula mamaria (Zurfluh, 1993).

En 1994, Silberstein demuestra la existencia de un control local de la glándula mamaria. Estos mecanismos intrínsecos regulan el desarrollo y la funcionalidad de la glándula mamaria, así que en ausencia de los estímulos externos, regulan algunos aspectos de desarrollo y funcionamiento glandular. Grosvenor en 1993 demuestran que la leche contiene un número considerable de factores bioactivos, los cuales son capaces de interaccionar con la membrana apical (milk-side) de las células secretoras que los producen.

El control local se realiza tanto en lactogénesis como en galactopoyesis. La lactogénesis es un proceso controlado por progesterona y un aumento de prolactina y glucocorticoides, pero Walker y Peaker en 1980 descubren que la glándula mamaria de cabra en la fase final de gestación produce estradiol, prostaglandina F2alfa (PGF2alfa) y sus metabolitos (en 1981).

El control local de la secreción de la leche depende de la frecuencia con la que la leche es sacada (frecuencia con cual las crías maman). Bar-Peled en 1995 describen un aumento en la secreción de la leche del 21%, ordeñando las vacas 3 veces más de lo normal al día.

El control local es evidente también en la secreción de grasa en la leche. Algunos ácidos grasos de cadena media son responsables de la inhibición de la síntesis de grasa (Williamson, 1995).

El proceso de muerte celular por apoptosis es típico en la fase de involución, pero las vías apoptóticas regulan también el desarrollo de la glándula. Humphreys en 1999, resume el papel de los miembros de la familia Bcl-2 en el control apoptótico en las ramificaciones ductales en "dedo de guante". El mismo mecanismo lo describe Strange en 2001, como control del contenido de la grasa en las células epiteliales mamarias durante el ciclo estrogénico. El efecto de los factores específicos del crecimiento en la modulación de la supervivencia de las células epiteliales mamarias, la demuestran Rosfjord y Dickson en 1999. Factores de crecimiento de tipo EGF e IGF promuevan la supervivencia, mientras el TGF β 1 y TNF son factores que inducen la muerte celular por apoptosis. Todos estos factores regulan distintos miembros de la familia Bcl-2.

3.2. Regulación de la involución

La involución de la glándula mamaria después del destete, es un proceso que se caracteriza por la pérdida del epitelio alveolar secretor y la remodelación de la estructura glandular.

Fueron atribuidos distintos factores que pueden iniciar el proceso, como serian:

- El descenso de los niveles de la prolactina circulante tras el destete (Masso-Welch, 2000)
- La isquemia producida por la leche, como resultado de la acumulación de la leche y la compresión vascular (Helminen, 1971)
- Factores de la leche que inician la muerte celular (Hakansson, 1995)
- Distensión física del epitelio luminal (Wilde, 1999)
- El aumento de la actividad de algunas enzimas que degradan la membrana basal (Boudreau, 1995). Como la apoptosis es inicial en el epitelio luminal que en la membrana basal (Quarrie, 1996), la separación física del epitelio alveolar por la membrana basal puede contribuir también a la muerte preferencial del epitelio alveolar (Pullan, 1996).

Watson y Clarkson (2004) en su estudio realizado por la técnica de microarrays de Affymetrix, estudian unos 8618 genes, utilizando tejido de glándula mamaria. Ellos comparan la expresión génica en 12 momentos distintos durante la evolución glandularia (en animales control vírgenes, 3 situaciones durante la gestación, 3 tiempos durante la lactancia y 5 medidas distintas durante la involución). Establecen que durante las primeras 24 horas de la involución, se produce un aumento transitorio de la expresión de los genes componentes de la vía de receptores apoptóticos, citokinas inflamatorias y genes de fase aguda (Tabla I.6). Después de las 24 horas, entran en acción reguladores intrínsecos de la apoptosis, que inducen la actividad de los fagocitos, proteasas de la matriz glandular y la supresión de los neutrofilos.

La tabla siguiente agrupa los genes y las proteínas que se activan durante la involución, en función de sus posiciones celular.

Tabla I.6. Genes que se expresan durante la involución de la glándula mamaria

(Marti A., *Cell Death and Differentiation*, 1999, 6, 1190-1200)

GENES- PROTEINAS	EXPRESIÓN	ACTIVACIÓN	REFERENCIAS
SUPERFICIE CELULAR/ EXTRACELULAR			
TRPM/SGP-2	+		Strange, 1992
MMP	+	+	Strange, 1992
TIMP	+		Talhok, 1992
DDC-3	+		Guo, 1998
DDC-4	+		Guo, 1998
IGFBP-5	+		Guenette,1994
CITOPLASMÁTICO			
PKA		+	Marti,1994
JNK		+	Marti, 1999
tTG	+		Strange, 1992
Caspasa 1	+		Boudreau,1995
Caspasa 3	+	+	Rueda,1999
Caspasa 9		+	Topper,1975
Bax	+		Marti-non publicado
NUCLEAR			
STAT3		+	Li,1997
NF-1 (74kDa)		+	Furlong,1996
AP-1 (Fos/Jun)	+	+	Marti, 1994
Myc	+		Strange,1992
p53	+		Jerry,1998

Durante la involución los procesos de muerte celular por apoptosis y el de

remodelación parecen ser continuos, pero para definir y determinar los mecanismos que intervienen tras el destete se clasifican en los siguientes fases (Figura I.47):

- a) Estadio apoptótico inducido por factores locales, que dura 72 horas después de quitar las crías.
- b) Fase de remodelación extensiva del estroma, cuando se pierden casi todas las señales de supervivencia celular.

Entre estas dos fases, de forma aleatoria, se define otra fase, la de transición. En cual se inducen las proteínas tisulares y la membrana basal empieza a alterarse, pero se mantienen señales de supervivencia celular, lo que limita la extensión de la destrucción tisular.

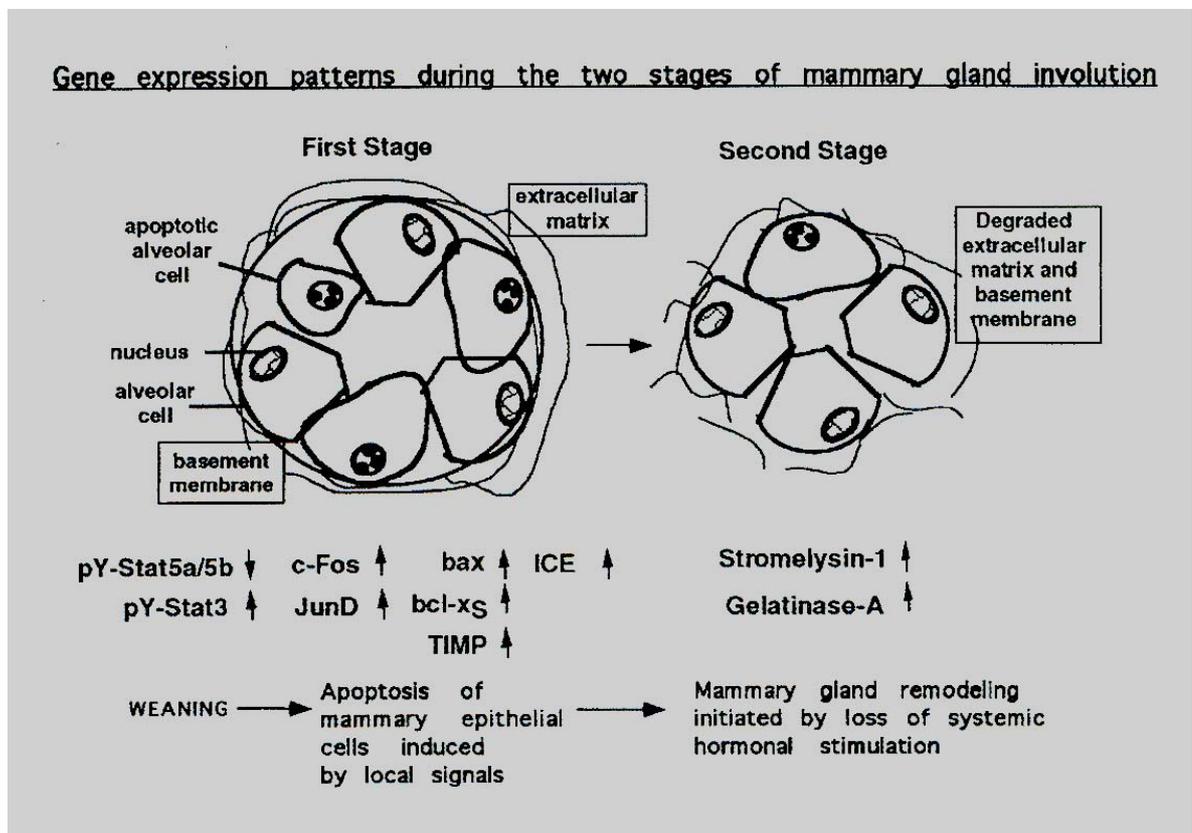


Figura I.47. El proceso de involución en la glándula mamaria está regulado por la expresión de señales proapoptóticas con la disminución del factor de supervivencia (P.A.Furth – Apoptosis 2, 19-24, 1997)

3.2.1. Estadio apoptótico de la involución

Esta primera fase de la involución presupone la intervención de muchos

factores reguladores:

1. Disminución de la expresión génica de β -caseína por la vía de las Jak2 kinasas
2. Disminución de la expresión génica del factor WAP
3. Sulfated glycoprotein-2 (SGP-2)
4. Vías de los miembros de la familia STAT
5. NF1
6. Oct-1
7. AP-1
8. Disminución de la vía Fak kinasas por señales de las integrinas α y β
9. Disminución de la vía de supervivencia celular por la vía Akt1
10. Disminución de la vía de supervivencia celular por la vía de las Jak2 kinasas
11. Miembros de la familia Bcl-2
12. Interleukin-1 β -Converting Enzyme (ICE)
13. Insulin-like Growth Factor (IGF) y Insulin-like Growth Factor Binding Proteins (IGFBP)
14. p53
15. p19^{ARF}
16. NF κ B
17. Liberación del citocromo c de la mitocondria
18. Activación de las caspasas
19. TIMP
20. PKA
21. JNK
22. Otros:
 - Heat shock protein 70 (Hsp70)
 - Lactato deshidrogenasa
 - Transglutaminasa tisular
 - Se constata también una disminución en la transcripción de unos genes del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC clase I), la histona H₂B y al gen nuclear pequeño RNA-U_{1a} y U_{1b} (Marti, 1999).
 - IRF-1- en contraste con otros genes proapoptóticos de tipo p53 o STAT3, durante la involución se incrementa la expresión de algunos genes que inhiben la pérdida del

epitelio celular mamario. Uno sería el IRF-1, que se activa como respuesta inmediata a la acumulación de la leche tras el destete. (Chapman, 2000)

A continuación voy a desarrollar algunos de ellos, que están relacionados con mi tesis.

p53

El gen tumoral supresor p53 es un gen implicado en la involución de la glándula mamaria (Strange, 1992). Se induce por distintos estímulos fisiológicos y genotóxicos del estrés, y su papel es mantener la estabilidad genómica del DNA, determinando su reparación, el paro del ciclo celular o la muerte celular por apoptosis.

El papel fisiológico de p53 en el proceso apoptótico durante la involución de la glándula mamaria, fue demostrado utilizándose ratones con déficit de p53. La apoptosis en los primeros 5 días tras el destete es p53 dependiente, mientras en la segunda fase de la involución es p53 independiente, siendo más controlada por las proteasas estromales.

Si el daño genético es severo, p53 es capaz de inducir la transcripción de genes pro-apoptóticos como Bax y Fas, que aumentan por la transrepresión de los genes antiapoptóticos Bcl2 (Somasundaran, 2000).

Strange en 1992, demuestra que el gen p53 se induce rápidamente tras la acumulación de la leche, en la glándula mamaria de ratón, sugiriendo que puede ser una señal en la iniciación de apoptosis. La p21/WAF1 mRNA (Cdkn1a - gen diana para el p53) aumenta unas 8 veces tras la activación de p53, en los primeros momentos tras el destete (Jerry, 1998).

Jerry en 2002 demuestra en glándula mamaria de ratón que p53 regula, iniciando, la apoptosis como respuesta al estrés agudo, pero no tiene ningún efecto sobre la expresión de genes de proteínas de la leche o como respuesta por apoptosis al estrés crónico.

La administración de hidrocortisona inhibe la involución, mientras la inducción del p53 y p21/WAF1 es intacta (Jerry, 2002). Por lo tanto, parece que los glucocorticoides actúan bajo el control del p53 en inhibir la apoptosis y remodelar el tejido glandular en la segunda fase de la involución.

p19/ARF (alternative reading frame of the INK4A gene que codifica la proteína p15 en humanos y la p19 en ratones) fue detectada en los primeros 2 días

tras el destete, lo que coincide con el máximo de la activación del p53 y la expresión del gen p21/WAF1. p19/ARF forma un complejo ternario con p53 y MDM2, inhibiendo la ubiquinación mediada por MDM2 y por lo tanto la degradación de p53 (Kamijo, 1998). Por eso, un desequilibrio en la balanza MDM2 y p19/ARF parece regular la apoptosis en el epitelio mamario, como respuesta a la stasis de la leche (Jerry, 2002) (Figura I.48).

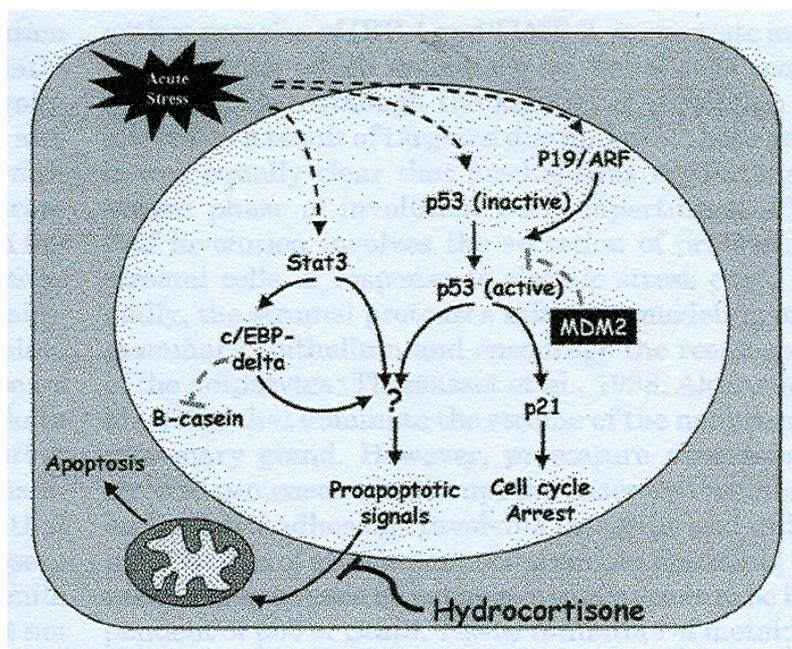


Figura I.48 La stasis de la leche representa un factor de estrés, determinando la activación de p53 y STAT3. Los dos median vías que inician la apoptosis en las células epiteliales de la glándula mamaria: STAT3 inhibe la expresión genica de proteínas de la leche, mientras p53 bloquea el ciclo celular. La actividad de p53 está regulada por el balance dinámico de los niveles de activadores (p19/ARF) o antagonistas (MDM2) (D.J.Jerry- *J. Dairy Sci*, 85, 1103-1110, 2002)

El aumento de p53 en la primera fase de la involución, va acompañado del incremento en la actividad de STAT3, pero por vías completamente distintas (9). A la expresión de p53 se le añade la represión del IRF-1.

La segunda fase de la involución es completamente independiente de p53 y STAT3 (Jerry, 2002).

NFκB

Por su expresión y su actividad NFκB regula y dinamiza distintas vías en el

desarrollo de la glándula mamaria. Si su actividad aumenta durante la gestación, descende en la lactancia y se reactiva durante la involución. Se puede detectar precoz, en la primera hora tras el destete, teniendo un máximo a los 3 días tras el destete (Brantley, 2000; Clarkson, 2000; Geymayer, 2000). Dos dímeros fueron detectados con predominancia: RelA/p50 y p50/p50. En líneas de células epiteliales de mama, la activación solo de NFκB suprime la apoptosis en ausencia de otras señales de supervivencia (Clarkson, 2000).

El factor NFκB induce la transcripción de genes anti-apoptóticos, echo demostrado en células T inmunitarias (Karin, 2002). De momento no se conocen los genes activados durante la involución, solo al gen de la cyclin D1 que se regula por NFκB durante la gestación (Cao, 2001).

Los estímulos que activan al factor transcripcional NFκB durante la involución de la glándula mamaria no son muy bien conocidos. Aunque se conoce que Akt (proteína quinasa B) activa NFκB en distintas líneas celulares (Ozes, 1999; Romashkova, 1999), su papel no es completamente cierto durante la involución de la glándula mamaria. Lo que no se puede excluir es la relación entre Akt y NFκB en el proceso de tumorigenesis en la glándula mamaria (Hutchinson, 2001).

Pero Clarkson 2000, demuestra para la primera vez que NFκB modula la apoptosis en el epitelio mamario. Aunque coincide con la inducción en la apoptosis, tanto *in vivo* como *in vitro*, NFκB parece que tiene una función de supervivencia selectiva para las células epiteliales de glándula mamaria durante la involución (Watson, 2002). Aparentemente los dos señales pro- y anti-apoptóticas existen durante la involución, y que el balance entre las dos vías es crucial para la evolución del tejido. Pero lo que si que es seguro, es que NFκB es un factor modulador en la supervivencia celular (Cao, 2003).

Liberación del citocromo c de la mitocondria

Marti (2001) demuestra en mitocondrias aisladas de glándula mamaria en ratones, que el citocromo c se pierde durante los primeros 2 días después del destete.

En 2004 Streuli y sus colab. demuestran en cultivos de células epiteliales de glándula mamaria que las señales extracelulares son coordinadas y convertidas por el epitelio glandular en respuestas apoptóticas. Por ejemplo, los cambios locales de los niveles de hormonas y el cambio de la forma de las células epiteliales, influyen en la interacción entre el epitelio celular y la matriz extracelular. Un tipo de estos cambios es la translocación de Bax del citoplasma dentro de la

mitocondria, lo que determina la liberación del citocromo c, la activación de las caspasas y la apoptosis (Gilmore, 2000).

Bcl-2 puede inhibir la liberación del citocromo c de la mitocondria, por lo tanto la activación de la caspasa 9 (Marti, 2001).

Activación de las caspasas

Durante el proceso de involución las caspasas representa la clave en el proceso apoptótico. Marti (2001) demuestra en un modelo de glándula mamaria en ratones, que la activación de las caspasas 1, 3, 7, 8 y 9, que actúan sobre la PARP (poly-ADP-ribose polymerasa) y al CBP (CREB binding protein), va en paralelo con la liberación mitocondrial del citocromo c. El pico de la actividad nuclear y citoplasmática de las caspasas es en los primeros 3 días tras el destete en la glándula mamaria de ratón (Marti, 1999).

Distintos laboratorios demuestran que el modulador intracelular de las caspasas es la proteína pro-apoptica Bax, durante la involución. (Li, 1997; Heermeier, 1996; Metcalfe, 1999). La inducción de Bax no necesita estímulos hormonales sistémicos, los locales existentes tras la acumulación de la leche son suficientes para activar su expresión (Li, 1997).

La dexametasona inhibe la actividad de las caspasas sin afectar la liberación del citocromo c de la mitocondria durante la involución de la glándula.

La procaspasa 9 se activa después de que el complejo citocromoc/Apaf-1 se le fija.

JNK

La c-Jun N –terminal kinasa (JNK) tiene un papel importante en la primera fase de la involución en la glándula mamaria. Estudios *in vivo* demuestran que si durante la lactancia la enzima se hace presente, sus niveles aumenta unos 5 veces en el día 3 de la involución (Pena, 1997; Verheij, 1996). c-Jun representa la diana para la actividad de JNK, su fosforilación fue demostrada en el tercer día de destete en glándula mamaria de ratón (Hibi, 1993).

3.2.2. Fase de remodelación en la involución de la glándula mamaria

La segunda fase de la involución es irreversible y se produce la fragmentación internucleosomal del DNA nuclear.

Empieza desde el día 3 tras el destete, hasta el día 10. Es una fase de remodelación al final de la cual, el aspecto glandular es similar al de la postpubertad, que redefine un nuevo ciclo. Se caracteriza al principio por una actividad proteolítica intensa, para que después las células adiposas acumulen grasa y cojan el aspecto final.

Los factores implicados en esta fase son:

1. La activación de las Metaloproteinasas de la matriz celular (MMP)
2. Activación de las TIMPs
3. Aumento de la expresión del TGF β 1
4. TNF α
5. Glucocorticoides
6. Integrinas
7. Caspasas

El número de células en apoptosis durante cualquier punto de esta fase es inferior al de las células apoptóticas de la primera fase (Heermeier, 1996).

La apoptosis en esta fase es iniciada por la actividad de las MMP (metaloproteinasa de la matriz) que determinan no solo la alteración de la interacción células epiteliales-matriz, si no también la degradación de las proteínas de la matriz extracelular.

La segunda fase de la involución es una fase de interacción entre las células epiteliales y la matriz extracelular (Lund, 1996; Sympson, 1994). Las células pierden la conexión con la membrana basal y la matriz extracelular (Boudreau, 1995; 1996). La interacción entre las células epiteliales y la membrana basal es la clave en la supervivencia de las células epiteliales y esta interacción se rompe por la actividad de las proteinasas titulares.

Las proteasas que se expresan durante la segunda fase de la involución son Stromelysin 1 y Stromelysin 3, colagenasa-3, MT1-MMP y la gelatinasa A (Talhok, 1992). La Gelatinasa A (72kDa y su forma activa 62kDa) y la gelatinasa 130kDa, que no son inhibidas por la TIMP-1 son consideradas las especies mayor gelatinolíticas (Talhok 1991,1992). La gelatinasa B (105kDa y su forma activa 95kDa) producidas por los macrófagos fueron también detectadas.

El factor activador de plasminogeno tipo tisular (tPA) y urokinasis (uPA) fueron también detectados.

El equilibrio entre las metaloproteinasas de la matriz y la actividad de sus factores inhibidores (TIMP) representa la vía de una involución normal. Cuando los MMP son mas altos que los TIMPs se constata una erosión y degradación de la

matriz extracelular. Si la actividad de las TIMP supera a los MMP puede dar lugar al desarrollo de procesos patológicos de tipo: fibrosis mamaria, invasión de algunos tumores y metástasis.

La expresión del balance proteasas y sus inhibidores se pueden describir en 3 etapas:

1. Durante la lactancia y principio de la involución, las proteinasas se expresan en niveles bajos. Se detectan también la MT1-MMP y la gelatinasa A (Talhok, 1991; 1992. En el día 3-4 tras el destete se expresa la Stromelisin 1, 3, tPA, uPA y la gelatinasa A (Talhok, 1991), alcanzando un máximo en el día 5-6 de destete y se quedan altos hasta el día 10.
2. La expresión de los inhibidores de proteinasas TIMP-1 y el plasminogen activador inhibidor 1 se realiza en el día 2, pero después descienden rápidamente.
3. La expresión de la β caseína se reduce de forma dramática cuando la balanza proteasa-inhibidor de proteasas se desequilibra a favor de los primeros.

La Figura 49 representa la relación que existe entre las proteasas y sus inhibidores durante la involución mamaria y la correlación con la expresión génica de otros factores.

Están descritos también unos factores específicos de crecimiento, miembros de la familia EGF (epidermal growth factor) y IGF-1, activadores de la supervivencia celular que actúa tanto en la fase de desarrollo como en esta segunda fase de involución. Estos factores representan también la vía de señalización de la supervivencia de las células cancerígenas de mama.

Dentro de la familia EGF, la sobreexpresión de TGF α (Transforming Growth Factor α) (Ferguson, 1981) y bFGF (Basic Fibroblast Factor) (Merlo, 1996) tiene como resultado la supervivencia celular durante la involución. Otros miembros de la familia, como HB-EGF (Heparin Binding Epidermal Growth Factor) y BTC (betacellulin), se sobreexpresan en involución siendo proapoptóticos. El papel de otros factores de la familia como AR (Amphyregulin) y HB-EGF en la supervivencia celular, se queda para estudiar.

Factores como el TGF β 1 y TNF inducen apoptosis en la segunda fase de la involución glandularia.

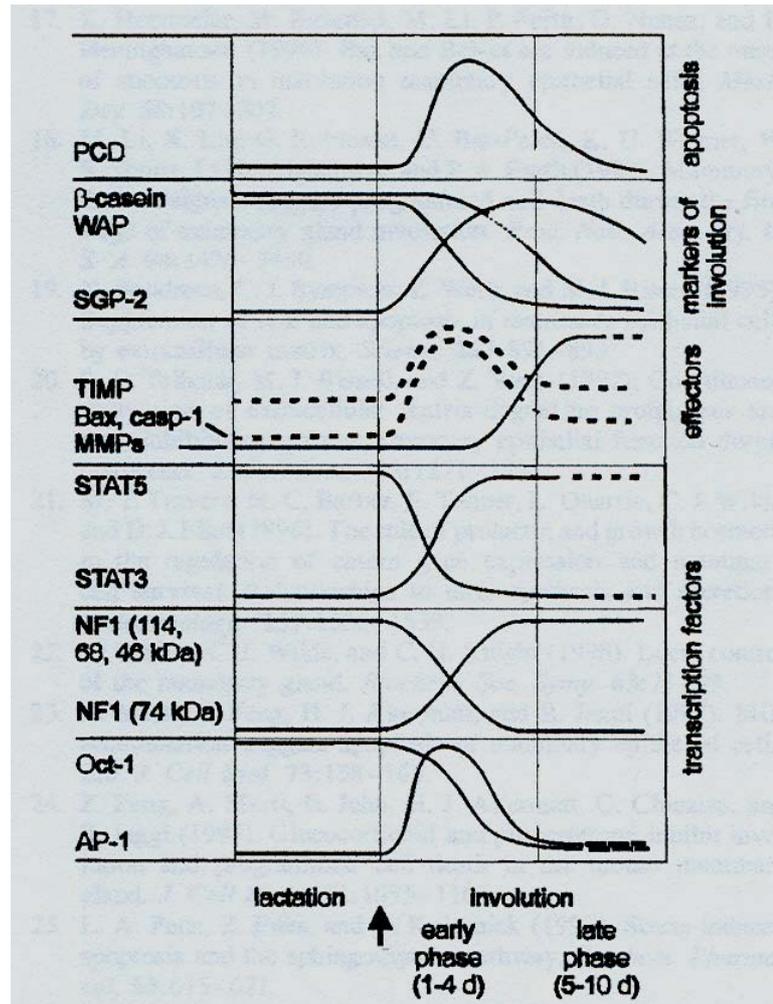


Figura I.49. Cambios en la expresión génica durante la involución de la glándula mamaria (Martí A. J. *of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, vol4,2,1999)

Los miembros de la familia TGF β tienen un importante carácter inhibidor en mamogénesis (Arteaga, 1996; Daniel, 1996). El TGF β 1 mRNA se expresa en niveles bajos en la glándula mamaria durante la gestación, siendo indetectable durante la lactancia (Strange, 1992). La expresión del TGF β 1, TGF β 2 y TGF β 3 aumenta de forma impresionante en el primer 2-3 día del destete, llegando a un pico en el día 6, después de cual se quedan con niveles en plato (Strange, 1992; Atwood, 1995). A este aspecto expresional se basa la idea que, el TGF β es el promotor de la muerte celular en los tejidos secretorios. El TGF β inhibe la expresión de proteínas de la leche, de donde su papel en la remodelación postlactancia en glándula mamaria (Arteaga, 1996). Estudios *in vitro* demuestran que el TGF β 1 disminuyen la expresión del Bcl-2 y al Bcl-x mRNA de 4-5 veces, de donde su papel

proapoptotico durante la evolución y involución de la glándula mamaria (Amundadottir, 1996; Nass, 1996).

El TNF α es un factor de crecimiento expresado primordial por la actividad de los macrófagos (Rosfjord, 1999). El receptor de TNF α es estructural similar con el CD95, Apo1 o el receptor Fas que induce la muerte celular por apoptosis (Ashkenazi, 1998). El papel del TNF α relacionado con apoptosis fue muy bien estudiado en las líneas celulares de cáncer de mama (Sugarman, 1985).

Los glucocorticoides regulan en la segunda fase la expresión génica de la gelatinasa A, Stromelysin1 y uPA *in vivo* (Furth, 1997). El aumento de la actividad de los glucocorticoides esta acompañado por el aumento de la progesterona, que controla también la expresión de las proteazas estromales (Jerry, 2002).

La remodelación de la matriz celular se realiza también bajo el control de las moléculas señal β 1-integrine (Boudreau, 1995). Las MMP pueden alterar la interacción entre las integrinas y la matriz extracelular, mientras que distintas integrinas, como las integrinas α 1 y α 2 regulan de forma específica la expresión génica de la Stromelysina 1 (Lochter, 1999).

La involución desde el día 4-8 es debido a un mecanismo regulado por las caspasas (Luna, 1996; Hill, 1996).

Streuli y Gilmore (1999) relacionan esta segunda fase con la participación de otros factores como Pp125^{FAK}, PI-3K, Bad y la adhesión celular.

Lo interesante es que, durante la involución las células glándularías se pueden morir también por necrosis (Marti, 1999).

III. Xantina OxidoReductasa (XOR)

1. Concepto de estrés oxidativo y radicales libres

El estrés oxidativo es un termino ampliamente utilizado que hace referencia a un desequilibrio entre la generación de especies prooxidantes y la eliminación de las mismas, mediante sistemas antioxidantes. Estando dicho equilibrio desplazado

hacia la generación de especies prooxidantes. Bien por aumento de estos o por disminución en la actividad de los sistemas antioxidantes.

1.1. Concepto de radical libre

Un radical libre es aquella especie química, que tiene uno o más electrones desapareados en su última capa. Esta característica les proporciona una gran reactividad.

1.2. Mecanismos generadores de radicales libres

Los radicales libres se generan continuamente en las células expuestas a un ambiente aerobio. Los sistemas enzimáticos antioxidantes han evolucionado paralelamente al metabolismo aerobio para contrarrestar el daño oxidativo debido a estos radicales. A pesar de esta defensa antioxidante, el daño oxidativo sobre las proteínas, lípidos, glúcidos y al DNA (Halliwell, 1989; Sies, 1993; Halliwell, 1996), acumulado a lo largo de la vida, está en el origen de enfermedades degenerativas como el Alzheimer (Cross, 1987). Se han visto implicadas en muchos procesos patológicos como algunos cánceres, diabetes (Okamoto, 1985; Reardon, 1992; Gerbitz, 1992), patologías cardiovasculares (Byers, 1993), procesos reumáticos (Wolf, 1986), patologías gastroentéricas y afecciones broncopulmonares (Slade, 1993; Tenenbein, 1992) así como en procesos neurodegenerativos como la Enfermedad de Alzheimer (Cross, 1987). También están implicados en procesos fisiológicos como en el envejecimiento (Bondy, 1992; Pacifi, 1991), el daño causado por el ejercicio físico agotador (Helaine, 1993; Sastre, 1992), la transición fetal-neonatal (Asensi, 1994) y otros.

Los radicales libres se forman en las células en numerosos procesos tales como el transporte de electrones a lo largo de la cadena respiratoria, la activación de los leucocitos, reacciones enzimáticas (como la catalizada por la xantina oxidasa) y en el metabolismo de xenobioticos. Un compuesto se puede transformar en un radical libre de diferentes formas: ganando un electrón, perdiendo un electrón o por fusión homolítica simétrica de una unión covalente.

Los radicales libres aparte de las fuentes endógenas descritas anteriormente pueden también proceder de fuentes externas. Con la dieta se ingieren muchos compuestos de naturaleza prooxidante, el humo de tabaco da lugar a radicales libres, la polución ambiental, el ozono, etc (Prior, 1995; Rock, 1996; Ames, 1993).

1.3. Tipos de radicales libres

Los radicales libres pueden ser derivados de oxígeno ROS (Radical Oxygen Species) o de nitrógeno RNS (Radical Nitrogen Species).

1.3.1 Radical libres de oxígeno (ROS)

Habitualmente el oxígeno se encuentra en su forma más estable, la molécula diatómica O_2 , presentando los electrones que forman parte del enlace π antienlace el mismo espín (estado triplete). En esta forma el oxígeno es solo moderadamente reactivo. Sin embargo, por efecto de radiaciones ionizantes, o por la acción de enzimas, o por mecanismos puramente químicos, se pueden generar una serie de especies químicas (radicales libres) capaces de reaccionar con otros compuestos presentes en el organismo y consecuentemente producir daño celular (Korycka-Dahi, 1981).

Las especies reactivas del oxígeno pueden tener un origen endógeno o exógeno (Freeman, 1982; Frei, 1994). Algunas de ellas surgen como “accidentes químicos”, es decir, reacciones secundarias no deseadas entre las biomoléculas o en la detoxificación de xenobióticos, pero otras especies activadas de oxígeno *in vivo* se generan con un fin determinado, como en el caso de los fagocitos activados, que producen O_2 y H_2O_2 (Halliwell, 1991)

Los ROS son radicales libres donde el electrón desapareado se sitúa predominante sobre el átomo de oxígeno.

Las principales clases de ROS estan en la tabla siguiente:

Tabla I.7. Principales clases de ROS

ESPECIE	SÍMBOLO
Radical superóxido	$O_2^{\bullet -}$
Radical hidroperóxido	HO_2^{\bullet}
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2
Radical hidroxilo	HO^{\bullet}
Oxígeno singlete	1O_2

Radical alcóxilo	RO•
Radical peróxilo	ROO•
Ozono	O ₃

1.3.1.1. Radical superóxido O₂•⁻

El radical es la forma dominante al pH fisiológico (Behar, 1979). En el metabolismo aerobio el 1-2% del consumo total de oxígeno da lugar a la formación de ión superóxido. Es relativamente poco reactivo e inestable, pero potencialmente tóxico. Es inestable y puede iniciar reacciones que den lugar a otros intermediarios a su vez muy reactivos. Tiene una vida media de algunos milisegundos y experimenta reacciones de dismutación, que consiste en la reacción entre dos radicales superóxido para dar agua oxigenada y oxígeno (Grisham, 1999).

Puede formarse como producto de muchas reacciones catalizadas enzimáticamente, como en las reacciones de las deshidrogenasas flavoproteínicas: xantina oxidasa, aldehído oxidasa, purina oxidasa, etc. (Koryka-Dahi, 1981), de oxidasas e hidroxilasas (diamino oxidasa, galactosa oxidasa, citocromo p450, etc.). También en reacciones no enzimáticas del oxígeno con la cisteína (Viña, 1983; Sáez, 1982) o la riboflavina (Barton, 1970), o bien se produce en la cadena respiratoria mitocondrial (Boveris, 1972).



1.3.1.2. Peróxido de hidrógeno H₂O₂

No es un radical libre, pero su toxicidad es importante. Atraviesa con facilidad las membranas celulares. Se forma a base de las reacciones del ión superóxido o bien por la reducción directa del oxígeno por dos electrones:



Es un producto estable en ausencia de catalizadores que promuevan su descomposición. Muchas enzimas producen agua oxigenada a partir de oxígeno:

superóxido dismutasa, glucosa oxidasa, la D-aminoácido oxidasa, uricasa, etc. (Fridovich, 1986; Romero, 1987), y también puede producirse por reacciones químicas, como la autooxidación del ácido ascórbico catalizada por el cobre (Koryka-Dahl, 1981). Se convierte en agua por acción de la catalasa, un proceso que determina su vida media. Parece que el H₂O₂ está implicado en la regulación de la transducción de la señal de expresión de genes a través del NF-κB y AP-1. Ambos son factores de transcripción capaces de inducir la transcripción de genes tales como de la interleukina 2 (IL-2), el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad y c-fos. (Schreck, 1992; Baeuerle, 1994; Sen, 1996)

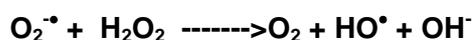
1.3.1.3. Radical hidroxilo HO•

Son las especies químicas más reactivas que se conocen y por tanto más tóxicas. Tiene una vida media estimada de alrededor de 10⁻⁹s (Liochev y Fridovich, 1994).

Puede formarse *in vivo* a consecuencia de radiación de alta energía (rayos X, rayos γ) que puede provocar la rotura homolítica del agua corporal. La luz UV no tiene suficiente energía como para escindir una molécula de agua, pero puede dividir el agua oxigenada en 2 moléculas de radical hidroxilo.



El radical hidroxilo se puede formar a base de la reacción de Haber-Weiss (1934):



Uno de los procesos más importantes de producción de radicales hidroxilo es la reducción del agua oxigenada por ciertos iones metálicos. La reacción de Fenton (Fenton, 1894) utiliza Fe²⁺ y el peróxido de hidrógeno:



1.3.1.4. Oxígeno singlete ¹O₂

El oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) es una forma activa del oxígeno, que se diferencia de la forma normal, triplete, en que los electrones del orbital antienlace tienen espines opuestos. Esta forma es mucho más reactiva que el oxígeno triplete. No es un radical libre y se forma *in vivo* por acción de la luz sobre las moléculas de oxígeno. Su vida media es alrededor de 10^{-6} segundos, dependiendo de la naturaleza de la matriz circundante. Puede interactuar con otras moléculas transfiriéndoles su energía de excitación o combinándose químicamente con ellas. Puede formarse en la oxidación del NADPH en los microsomas, en la actividad de varias enzimas como la xantina oxidasa, la lactoperoxidasa, lipooxigenasa y prostanglandinsintetasa, entre otras (Kanofsky, 1989).

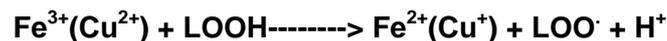
1.3.1.5. Radical Alcoxilo (RO^\bullet)

El radical alcoxilo (RO^\bullet) se puede formar durante la degradación de los lipoperoxidos en reacciones catalizadas por metales pesados:



1.3.1.6. Radical peroxilo (ROO^\bullet)

El radical peroxilo RO_2^\bullet es un producto intermedio de la s lipoperoxidación. También se puede formar en reacciones del tipo:



Tiene una vida media relativamente larga (del orden de segundos).

1.3.1.7. Ozono O_3

El ozono O_3 es un compuesto típico de las capas altas de la atmósfera, donde se forma por reacciones fotoquímicas, puede dar reacciones con compuestos biológicos.

1.3.2 Radicales libres de nitrógeno (RNS)

Los radicales libres de nitrógeno representa otra clase de radicales libres a los cuales en los últimos años se les ha dado mucha importancia. Se pueden clasificar en:

Tabla I. 8. Principales especies de RNS

ESPECIE	SIMBOLO
Óxido nítrico	NO[•]
Peroxido de nitrógeno	ONOO^{•-}
Dióxido de nitrógeno	NO₂[•]

1.3.2.1. Óxido nítrico (NO[•])

Al óxido nítrico tiene una gran importancia por su función fisiológica, además de ser considerado un intermediario tóxico importante por su condición de radical libre.

Es un gas lipofílico e hidrosoluble, con una vida media relativamente larga (3-5 s). Su formación tiene lugar por una reacción enzimática en la que la enzima óxido nítrico sintasa cataliza la conversión de L-arginina a L-citrulina dando como subproducto NO[•] en numerosos tipos celulares (Moncada, 1991; Bush, 1992).

Dicha enzima presenta cuatro isoformas: la neuronal nNOS (tipo I), la endotelial eNOS (tipo III) y la inducible iNOS (tipo II) (Bredt, 1991; Lamas, 1992).

El óxido nítrico juega un papel fundamental en numerosos procesos fisiológicos. actúa como regulador del flujo sanguíneo local, inhibe la agregación plaquetaria, se produce por los macrófagos activados contribuyendo a la defensa inmunitaria primaria y también actúa como neurotransmisor, siendo el cerebro el órgano con mayor actividad óxido nítrico sintasa (Czapski, 1995).

Otro efecto del NO[•] reside en su capacidad de reacción con el hierro de proteínas intracelulares, principalmente mitocondriales, siendo inactivadas por él la mayoría de las enzimas que poseen un grupo prostético hemo. Puede reaccionar con ácidos nucleicos dando lugar a mutaciones y roturas del ADN, y también puede producir necrosis, entre otros fenómenos.

El NO[•] posee una acción antiinflamatoria importante, a la vez que tiene la capacidad de promover la disfunción celular y tisular a través de un efecto proinflamatorio. Para entender este doble efecto Grisham y cols.(1999) proponen que los efectos reguladores y antiinflamatorios del óxido nítrico ocurren cuando éste ejerce una acción directa sobre una molécula biológica, lo cual ocurre en condiciones fisiológicas, en las que la producción de NO[•] es baja. Sin embargo,

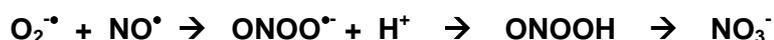
cuando las concentraciones de NO[•] aumentan, el NO[•] tiene efectos indirectos, a través de los metabolitos derivados de él, pudiendo reaccionar con el oxígeno o el radical superóxido, lo cual ocurre en situaciones de inflamación.

Un exceso de óxido nítrico es citotóxico. Parte de su citotoxicidad se cree que es debida al [•]O₂⁻, con el que reacciona para dar lugar a anión peroxinitrito (ONOO⁻)

1.3.2.2. Peroxinitrito (ONOO⁻)

No es un radical, pero sí un intermediario oxidante que puede protonarse y descomponerse con facilidad de modo que es altamente reactivo (Lipton y cols., 1993). Es capaz de inducir la peroxidación lipídica en lipoproteínas, interferir con la señalización celular por nitración de residuos tirosina, oxidar grupos tioles y guanosinas, de degradar carbohidratos y de fragmentar ADN (Beckman, 1994; Beckman, 1996).

El anión peroxinitrito (ONOO⁻) se forma por la reacción entre el óxido nítrico con el anión superóxido (Miles, 1996), tal como se muestra en la siguiente reacción:



El peroxinitrito está en equilibrio con su ácido conjugado(ONOOH). En soluciones neutras es un potente agente oxidante, capaz de oxidar grupos tioles o tieteres. Además de las reacciones de oxidación, el peroxinitrito tiene la capacidad para nitrar compuestos fenólicos en condiciones fisiológicas, como los anillos de tirosina (Goldstein y cols. 2000). Los residuos de tirosina son oxidados por los radicales derivados del peroxinitrito formando el radical tirosilo, que a su vez reacciona con el NO[•] para formar 3-nitrotirosina. La nitración mediada por peroxinitrito *in vivo* podría ser inhibida por un exceso de producción relativa de O₂^{•-}, debido a la competencia entre éste y el NO[•] por el radical tirosilo, por lo que la formación de 3-nitrotirosina sería inhibida cuando la tasa de formación de O₂^{•-} superara la de NO[•] (Goldstein, 2000). Asimismo, algunos autores han presentado la reacción de formación del peroxinitrito como una forma de eliminación de O₂^{•-} sin la consiguiente formación de H₂O₂, lo cual supone un efecto detoxificante y antiinflamatorio (Granger y Kubes, 1996).

1.3.2.3. Dióxido de nitrógeno (NO₂[•])

El dióxido de nitrógeno es un radical libre contaminante producido primariamente a partir de la oxidación del NO[•] atmosférico (Postlethwait, 1995). Es un iniciador muy efectivo de la cadena de peroxidación lipídica (Kaur y Halliwell, 1994).

2. Fuentes de radicales libres

Los radicales libres provienen a través de fuentes exógenas y endógenas

2.1. Fuentes exogenas

2.1.1. Agentes antineoplásicos, antibióticos

Unos principios antineoplásicos como la adriamicina, bleomicina, daunorubicina y algunos antibióticos (Doroshov, 1982) que dependen de grupos quinoides o de unión a metales para su actividad. Algunos de los efectos de estas drogas se han atribuido a su capacidad para reducir el oxígeno a superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo.

2.1.2. Irradiaciones

La irradiación de los organismos debido a las radiaciones electromagnéticas (rayos X y γ o debido a radiaciones de partículas (electrones, protones, neutrones, deuterones y partículas α y β) (Bielsky, 1977).

2.1.3. Factores ambientales

Factores ambientales, como contaminantes aéreos fotoquímicos, hiperoxia, pesticidas, humos del tabaco, solventes, anestésicos e hidrocarburos aromáticos. Estos agentes, o bien poseen radicales libres, como el humo del tabaco, o bien se convierten en radicales mediante el metabolismo celular y los procesos de desintoxicación (Mason, 1982).

2.2. Fuentes endógenas

2.2.1. La cadena de transporte electrónico mitocondrial

En los tejidos sanos una de las principales fuentes de radicales libres son las mitocondrias. Orgánulos responsables de más del 90% del consumo de oxígeno celular.

La cadena de transporte electrónico mitocondrial (Figura I.50) es una de las principales fuentes de radicales libres en la célula. Son muchas las patologías en las que se ha descrito que la mitocondria genera radicales libres, siendo una de las causas del estrés oxidativo que sufre la célula.

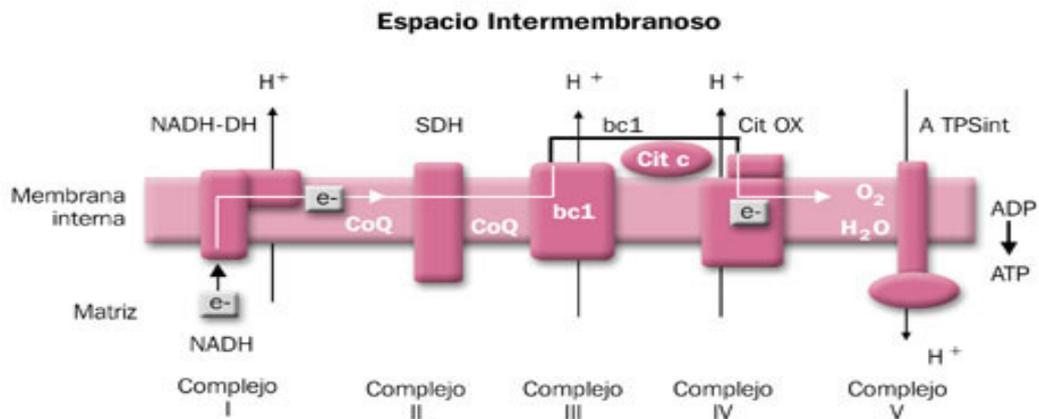


Figura I.50. Esquema de la cadena de transporte electrónico mitocondrial

2.2.1.1. Producción de radicales libres en los distintos estados mitocondriales

Se calcula que entre el 2 y el 5% de los electrones transportados por la cadena de transporte electrónico mitocondrial en estado 4 (cuando todo el ADP está en forma de ATP) no llegan al complejo IV y producen reducciones parciales del oxígeno (Cadenas, 1977; Frei y cols., 1994). Debido a las propiedades del oxígeno, su reducción tetravalente requiere la transferencia sucesiva de 4 electrones al orbital antienlazante.

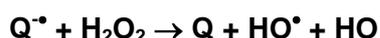
El citocromo a_3 del complejo IV de la cadena respiratoria es capaz de mantener estrechamente unidas a su centro activo todas las especies parcialmente reducidas del oxígeno hasta que se completa la transferencia de 4 electrones y 4 protones al O_2 y con ello la formación de H_2O (Benzi, 1995). Por tanto, la citocromo

c oxidasa perteneciente al complejo IV de la cadena respiratoria no produce este radical. Además, exhibe cierta actividad superóxido dismutasa. Sin embargo, otros elementos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial tienen la capacidad de transferir un electrón directamente al O₂, pero por el contrario no son capaces de retener el ión superóxido formado (Benzi, 1995). Así pues, se produce $\cdot\text{O}_2^-$, que puede dismutar a su vez generando peróxido de hidrógeno, el cual es capaz de atravesar las membranas y salir al citoplasma, donde puede reaccionar con otras especies formando diversos tipos de radicales libres (Boveris y cols., 1972). La producción mitocondrial del peróxido de hidrógeno fue inicialmente descrita por Jensen en 1966. Estudios posteriores demostraron que la mayor parte del peróxido de hidrógeno mitocondrial, procedía de la dismutación del radical superóxido (Boveris y cols. 1975).

Se ha estimado que se producen del orden de 10^{10} moléculas de $\cdot\text{O}_2^-$ por célula y por día (Ames y cols., 1993).

Los procesos de formación de anión superóxido son una serie de reacciones no enzimáticas cuya velocidad aumenta linealmente con la concentración de oxígeno presente en el medio.

Experiencias *in vitro* demuestran que formas solubles de la semiquinona son capaces de producir $\text{O}_2\cdot^-$ por autooxidación en medios oxigenados, por lo que se propuso que la ubisemiquinona mitocondrial era una de las fuentes de ion superóxido (Cadenas, 1977). Sin embargo, consideraciones termodinámicas descartan un papel directo de la dismutación de la ubisemiquinona en la producción de este radical *in vivo*, porque el ciclo redox de la ubiquinona tiene lugar enteramente en la fase apolar de la membrana, y en tales condiciones la autooxidación de las quinonas se ve desfavorecida (Benzi, 1995). La ubisemiquinona, en cambio, podría estar implicada en la formación de $\text{HO}\cdot$ a partir de H_2O_2 . Puesto que el peróxido de hidrógeno puede atravesar fácilmente las membranas biológicas puede entrar en contacto con la ubisemiquinona y producirse la reacción siguiente (Benzi, 1995):



2.2.2. Autooxidación de pequeñas moléculas

Existen en la célula una gran variedad de componentes solubles, capaces de producir reacciones de oxidación-reducción, tales como los tioles,

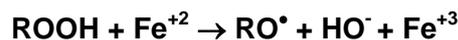
hidroquinonas, catecolaminas, flavinas y tetrahidropterinas. En todos estos casos, el radical superóxido es el radical primario formado por la reducción del dióxígeno por estas moléculas (Baccarini, 1978). Asimismo, también se produce peróxido de hidrógeno como producto secundario, a partir de la disminución de radical superóxido, bien espontáneamente, o bien catalizado enzimáticamente por la superóxido dismutasa.

2.2.3. Reacción de Fenton-Haber-Weiss

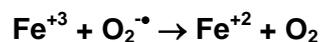
Consiste en la reducción del H_2O_2 por iones de metales de transición, sobre todo el ion ferroso (Fe^{+2}) y, en menor medida, el cuproso (Cu^+) y otros iones. El peróxido de hidrógeno o agua oxigenada (H_2O_2) es una molécula relativamente estable en ausencia de catalizadores que promuevan su descomposición. Fenton (Fenton, 1894) descubrió, a finales del siglo pasado, que se podían oxidar moléculas orgánicas por mezclas de peróxido de hidrógeno y Fe^{+2} (reactivo de Fenton). Fueron Haber y Weiss quienes dieron una primera explicación del mecanismo de reacción: el Fe^{+2} reduce al H_2O_2 , que a su vez se descompone en el radical hidroxilo y el ion hidroxilo (Haber y Weiss, 1934). Esto puede representarse como sigue:



Y en general,



Aunque esta reacción puede tener lugar con varios metales, el hierro parece ser el más importante en sistemas biológicos. El Fe^{+2} se oxida a Fe^{+3} con mucha facilidad, y éste es muy insoluble. Por ello, el hierro libre que pueda haber en los sistemas biológicos estará en muy pequeñas cantidades y en forma férrica (Halliwell y Gutteridge, 1986). Pero el ion férrico puede ser reducido por el ascorbato (Rawley y Halliwell, 1983; Sawyer, 1988) y por el radical superóxido (Frei, 1994), con lo que se genera un ciclo de producción continua de radicales hidroxilo:



Los procesos de captación y distribución del hierro y de los iones metálicos en general están muy finamente regulados en los mamíferos. Hay un gran número de proteínas de unión a metales (ferritina, transferrina, ceruloplasmina) que actúan como reserva de iones metálicos y que, además, impiden que estos iones participen en reacciones redox (Halliwell, 1991; Rouault y Klausner, 1996).

2.2.4. Sistemas de transporte electrónico del retículo endoplásmico y membrana nuclear

Ambos sistemas de membranas intracelulares contienen los citocromos P₄₅₀ y b₅ que pueden oxidar ácidos grasos insaturados (Capdevila, 1981) y xenobióticos (Chignell, 1979). De hecho, los citocromos P₄₅₀ (término usado para un número muy elevado de proteínas con grupos hemo, ampliamente distribuidas entre los seres vivos) son los más poderosos oxidantes *in vivo*, aunque también pueden actuar como agentes reductores. Son monooxigenasas que actúan activando el oxígeno molecular a especies electrofílicas de oxígeno (bien radicales, o bien generadoras a su vez de radicales) que pueden ser liberada en la célula (Dolphin, 1988) Foster, 1993).

2.2.5. Peroxisomas

Los peroxisomas son potentes fuentes celulares de producción de peróxido de hidrógeno debido a su alta concentración en oxidasas, ninguna de las cuales utiliza el superóxido como precursor del mismo. Entre estas enzimas están incluidas la D-aminoácido oxidasa, urato oxidasa, L- α -hidroxiácido oxidasa y acil-graso-coenzima A oxidasa (Boveris, 1972). La catalasa peroxisomal es la enzima que metaboliza la mayor parte del peróxido de hidrógeno generado por las oxidasas de los peroxisomas (Freeman y Crapo 1982; Frei, 1994).

2.2.6. Membrana plasmática

Los radicales libres generados extracelularmente deben cruzar la membrana plasmática antes de reaccionar con otros componentes celulares y, por tanto, pueden iniciar reacciones tóxicas en la misma. Los ácidos grasos insaturados presentes en la membrana y las proteínas transmembrana que tienen aminoácidos oxidables son susceptibles de ser alterados por los radicales libres. Estas reacciones alteran las propiedades de las membranas de tal modo que cambian su

fluidez, aumentan la permeabilidad de la membrana, disminuyen el potencial de membrana, hacen perder las funciones secretoras e inhiben los procesos metabólicos celulares, todo ello provocado por la peroxidación lipídica, o la oxidación de importantes proteínas estructurales (Freeman y Crapo, 1982).

La enzima NAD(P)H-oxidasa presente en la membrana plasmática de las células fagocíticas, es una importante fuente biológica de producción de radicales libres, debido a la activación de los polimorfonucleares y macrófagos que consumen gran cantidad de oxígeno, el cual será transformado en radical superóxido. Estos radicales libres de oxígeno pueden dañar a la propia célula que los origina y a células próximas a los fagocitos estimulados. También se ha visto que la NADH oxidasa es una importante fuente de radicales libres en células musculares lisas arteriales y endotelio, en las cuales desempeñan un papel importante como señales intracelulares.

Cabe destacar la importancia de las enzimas unidas a la membrana plasmática, tales como la lipooxigenasa y la ciclooxigenasa, en la producción de radicales libres fruto del metabolismo de su producto, el ácido araquidónico, para dar potentes productos biológicos: prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos (White, 1991).

2.2.7. Enzimas solubles y proteínas

Enzimas como xantina oxidoreductasa, aldehído oxidasa, dihidroorotato deshidrogenasa, flavinprotein deshidrogenasa y triptófano dioxigenasa, generan radicales libres durante su ciclo catalítico (Aleman y cols. 1967; Massey, 1970).

2.2.8. Fagocitos activados

Los fagocitos activados (neutrófilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos) poseen diversas enzimas que les permiten generar $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 como uno de los mecanismos para matar microorganismos (Babior, 1978).

2.2.9. Otras enzimas

Enzimas citosólicas solubles como la aldehído oxidasa y la óxido nítrico sintasa y enzimas unidos a la membrana plasmática, como la lipooxigenasa y la ciclooxigenasa, que participan en el metabolismo del ácido araquidónico, generan radicales libres durante su ciclo de catálisis (Freeman y Crapo, 1982; Frei, 1994).

3. Daño biomolecular como consecuencia del estrés oxidativo

La acción de los radicales libres viene determinada, por una parte, por su reactividad química, y por otra parte, por la disponibilidad de un sustrato susceptible en la vecindad de donde se produce el radical libre. La acumulación de compuestos alterados por el resultado de la reacción del radical libre es a menudo la explicación de efectos a largo plazo, los cuales son difícilmente demostrables como relación causa-efecto de la reacción de los radicales libres, pero las reacciones de los radicales libres provocan unos productos cuyo efecto es acumulativo.

Los organismos posean unos mecanismos de defensa contra los radicales libres, los antioxidantes, sustancias que son capaces de retrasar o inhibir la oxidación de sustratos oxidables. El balance entre los agentes prooxidantes y antioxidantes determinará finalmente el estado redox, determinando una "homeostasis redox" o estado de equilibrio de las condiciones de oxidación-reducción.

Finalmente, el desequilibrio de este estado redox tiene unas consecuencias bioquímicas de forma que altera ciertas vías de transmisión de señales cuya consecuencia es la activación de mecanismos compensatorios para restablecer la "homeostasis redox".

3.1. Daño oxidativo a proteínas

Todos los aminoácidos presentes en las proteínas tienen residuos susceptibles de ser atacados por los radicales libres, sobre todo por el radical hidroxilo (Stadtman, 1992). Dentro de los aminoácidos fisiológicos, la tirosina, la fenilalanina, el triptófano, la histidina, la metionina y la cisteína son los que más procesos oxidativos sufren (Davies, 1987). Esta oxidación puede dar lugar a un cambio conformacional de la proteína y, por tanto, a una pérdida o modificación de su función biológica. En condiciones anaeróbicas, los radicales libres promueven un entrecruzamiento considerable entre proteínas, mientras que en presencia de oxígeno los radicales libres provocan una gran fragmentación de la cadena peptídica (Stadtman, 1992).

Otro mecanismo muy importante de oxidación de proteínas son los llamados "Sistemas de oxidación de función mixta" o "Sistemas de oxidación catalizada por metal", que poseen como dianas más comunes los residuos de arginina, histidina, lisina, prolina y cisteína (Stadtman, 1992). Estos sistemas catalizan una serie de

reacciones acopladas, enzimáticas o no, que implican la reducción del O_2 a H_2O_2 y del Fe^{+3} a Fe^{+2} (Fucci, 1983; Amici, 1989). La producción de H_2O_2 y de Fe^{2+} es la única función que tienen en común los sistemas de oxidación catalizada de metal. Los sistemas más relevantes son diversas NADH y NADPH oxidasas, xantina oxidasa y citocromo P_{450} reductasas (Stadtman, 1992).

En la Tabla I.9 se resumen los sistemas fisiológicamente más importantes que producen la oxidación de proteínas.

Tabla I.9. Sistemas más importantes que generan la oxidación de proteínas

SISTEMAS ENZIMÁTICOS
NADPH oxidasas/NADPH/ $Fe(III)/O_2$
<i>Xantina Oxidasa/Hipoxantina/$Fe(III)/O_2$</i>
Citocromo P_{450} reductasa/Citocromo P_{450} /NADPH/ $Fe(III)/O_2$
Citocromo P_{450} reductasa/redoxina/Citocromo P_{450} /NADH/ $Fe(III)/O_2$
Nicotinato hidroxilasa/NADPH/ $Fe(III)/O_2$
SISTEMAS NO ENZIMÁTICOS
Ascortato/ $Fe(III)/O_2$
RSH/ $Fe(III)/O_2$
$Fe(II)/O_2$
$Fe(II)/H_2O_2$ (reactivo de Fenton)

En los procesos de daño oxidativo a proteínas, algunos aminoácidos como lisina, prolina y arginina, se oxidan dando lugar a grupos carbonilo, de modo que el contenido en carbonilos de las proteínas se puede emplear como un indicador de daño oxidativo a las mismas (Stadtman, 1992). Otros aminoácidos como histidina, cisteína y metionina, también sufren daño oxidativo, pero no forman derivados de tipo carbonilo (Stadtman, 1992). El daño oxidativo suele ser irreversible y puede conducir a la desnaturalización de la proteína (Dean, 1993).

Se ha propuesto que la oxidación de enzimas mediada por radicales libres, es un paso de marcaje dentro del recambio proteico (Stadtman, 1992), lo que se ve confirmado por las siguientes observaciones:

- La mayoría de los tejidos animales poseen una proteasa alcalina neutra que degrada las formas oxidadas de los enzimas, pero que apenas tiene actividad sobre las formas no oxidadas (Rivett, 1985).
- La degradación *in vivo* de proteínas endógenas en mitocondrias de hígado y corazón y en eritrocitos se ve estimulada por la adición de sistemas generadores de radicales libres (Davies y Lin, 1988).

En el caso de las hemoproteínas, como la oxihemoglobina, el radical superóxido o el peróxido de hidrógeno pueden reaccionar con el hierro para formar metahemoglobina y otros productos de oxidación. Otra importante hemoproteína, la catalasa, es inhibida por el radical superóxido.

3.2. Daño oxidativo a los lípidos

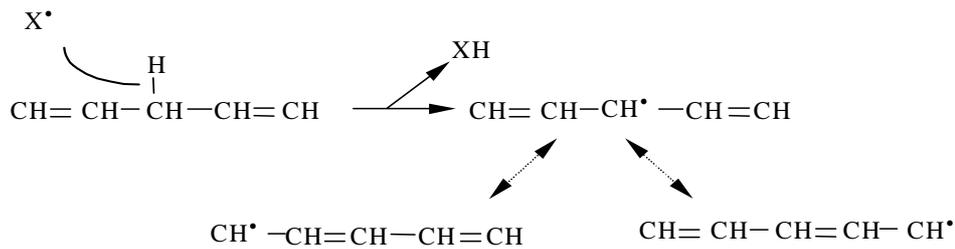
La acción de los radicales libres de oxígeno sobre los lípidos tiene lugar fundamentalmente sobre los ácidos grasos poliinsaturados (Cross, 1987), provocando su peroxidación. El resultado es la pérdida de la flexibilidad y de las funciones secretoras, así como la ruptura de los gradientes iónicos transmembrana.

Los radicales libres que pueden iniciar esta reacción son: el radical hidroxilo (HO^\bullet), el peróxido (ROO^\bullet), el alcóxilo (RO^\bullet) y el alquílico (R^\bullet).

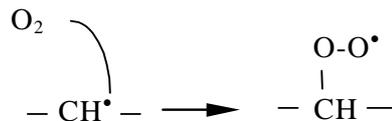
El proceso de ataque oxidativo a los lípidos (Figura I.50), denominado peroxidación lipídica, comienza cuando un radical libre ataca a un carbono de la cadena alifática de un ácido graso, se desprende un átomo de hidrógeno, y se forma un radical alquílico (Frei, 1994; Halliwell, 1994). Esta reacción se produce preferentemente en los carbonos contiguos a enlaces dobles de los ácidos grasos poliinsaturados, ya que los radicales formados se pueden estabilizar por resonancia con el enlace doble (Figura I.51A). Este radical centrado en un átomo de carbono reacciona con el O_2 y forma un radical peróxido, R-COO^\bullet (Figura I.51B). Los radicales peróxido pueden reaccionar con cadenas laterales de otros ácidos grasos poliinsaturados adyacentes (Figura I.51C), se forma un radical alquílico ($\text{R}'\text{-CH}^\bullet$) y un peróxido lipídico (R-COOH), con lo que se propaga la reacción en cadena radicalaria (Halliwell, 1994).

Figura I.51. Mecanismo de peroxidación lipídica

A) Ataque oxidativo a un ácido graso insaturado



B) Formación de un radical peróxido, COO[•]



C) Propagación de la reacción



De esta manera, un solo ataque por un radical libre da lugar a la formación de un gran número de productos de oxidación, sobre todo aldehídos como malondialdehído (MDA) y 4-hidroxinonenal (HNN)?, e hidrocarburos de cadena corta como etano y pentano (Freeman y Crapo, 1982; Halliwell, 1991; Cheeseman y Slater, 1993; Halliwell, 1994). Muchos de los aldehídos formados reaccionan rápidamente con los componentes celulares, con lo que causan mutaciones en el ADN, y producen daños estructurales y funcionales al reaccionar con proteínas (Frei, 1994). La peroxidación lipídica se considera como un factor muy importante en el envejecimiento de células aeróbicas (Lippman, 1985). El daño oxidativo a los lípidos de membrana constituye, muy probablemente, un factor importante en la disminución de la fluidez de las membranas (Shigenaga y cols., 1994).

3.3. Daño oxidativo a los glúcidos

Los radicales libres atacan a los glúcidos de forma distinta. Los monos y disacáridos resisten la acción de los radicales libres de oxígeno. La glucosa constituye un captador del radical superóxido, al retenerlo e impedir su acción sobre

otras moléculas. La manosa y el manitol son eliminadores del radical hidroxilo. Por ello, se ha observado que diversos polisacáridos actúan como agentes protectores celulares (Albertini y cols., 1996).

El daño oxidativo a los glúcidos reviste importancia cuando se trata de polisacáridos de función estructural, ya que los polisacáridos son despolimerizados por los radicales libres (Borel y cols., 1988) dando lugar a procesos degenerativos.

Un caso especial es el del ácido hialurónico cuya función estructural reside en mantener la viscosidad del fluido sinovial. La exposición a agentes oxidantes (sobre todo radical superóxido) provoca su fragmentación, lo que conduce a la desestabilización del tejido conectivo y a la pérdida de viscosidad del fluido sinovial, como es el caso de la artritis reumatoide (Greenwald y Moy, 1980; Grootveld y cols, 1991). Se ha observado que la superóxido dismutasa es capaz de proteger frente a la despolimerización del ácido hialurónico, en el líquido sinovial (McCord, 1985). Los proteoglicanos están sujetos a rotura oxidativa de forma similar (Greenwald y cols. 1980).

Se ha observado una relación directa entre los radicales libres y el estrés oxidativo en la *diabetes mellitus*, una enfermedad inicialmente caracterizada por una pérdida en la homeostasis de la glucosa, así como también, con las complicaciones diabéticas. Se postula que una anormal regulación en el metabolismo de los peróxidos y los metales de transición colabora en el establecimiento de la enfermedad, así como en las complicaciones que aparecen a largo plazo (Wolff y cols. 1987; Vicent, 2004; Wiernsperger, 2003,2003).

3.4. Daño oxidativo al DNA

El DNA también es susceptible de daño oxidativo en todos sus componentes. Se sabe que el oxígeno es capaz de adicionarse a las bases o al azúcar del ADN formándose radical peroxil. Las posteriores reacciones de estas especies radicalarias en el DNA dan lugar a un gran número de productos.

El número de bases modificadas diferentes encontradas en el ADN tras un ataque oxidativo, supera la veintena. La alteración de este tipo que se observa con más frecuencia es la 8-hidroxi-2' deoxiguanosina (8oxodG). Su importancia reside en su poder mutagénico ya que durante la replicación producirá transversiones T por C (Kasai y Nishimura, 1984; Shibutani y cols., 1992). El daño oxidativo asociado a proteínas y al DNA no deben ser considerados de manera independiente. La acumulación de formas inactivas de enzimas reparadores puede aumentar la

acumulación de daño oxidativo en el DNA, por lo que se pueden potenciar uno a otro. Cuando la replicación del DNA dañado tiene lugar antes de la reparación o cuando un DNA dañado se repara de manera incorrecta, tiene lugar una mutación (Halliwell, 1991; Breen y Murphy, 1995). Por ello las lesiones oxidativas al DNA parecen estar implicadas no sólo en el envejecimiento celular, sino también en la patogénesis de las enfermedades asociadas a la edad avanzada. El DNA dañado es reparado por enzimas que cortan la parte afectada, que es entonces excretada por la orina (Ames, 1993). Puesto que las enzimas reparadoras no llegan a eliminar todas las lesiones se acumulan, con lo que el número de mutaciones aumenta con la edad (Ames, 1993).

3.5. Indicadores de estrés oxidativo

Dada la importancia del daño que el estrés oxidativo puede producir en las células y en el organismo, en los últimos años se ha intentado encontrar índices que nos permitan medirlo. Entre los indicadores propuestos, los más relevantes son el cociente GSSG/GSH como indicador de daño oxidativo en el citosol, el malondialdehído y el hidroxinonenal como indicadores de daño a los lípidos, 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina que es un índice de daño oxidativo en el ADN, pentano y etano también como índices de lipoperoxidación lipídica, grupos carbonilo en proteínas y 2-oxohistidina como daño en proteínas (Hageman y cols., 1992).

3.5.1. Indicadores de daño oxidativo en el citosol

3.5.1.1 Cociente GSSG/GSH

El glutatión (γ -glutamil cisteinil glicina) es un tripéptido que desempeña diversas funciones metabólicas de gran importancia, sobre todo relacionadas con la protección antioxidante de las células (Viña, 1990). El grupo activo es el sulfhidrilo del residuo de cisteína, por lo que el glutatión puede ejercer su papel protector cuando se presenta en su forma reducida (GSH). Dos moléculas de GSH pueden oxidarse cediendo un electrón cada una y combinándose entre sí dando lugar la forma disulfuro (GSSG). Por ello, un indicador característico de estrés oxidativo es el aumento de la concentración de glutatión oxidado con la consiguiente alteración del estado redox del glutatión, aumentando el cociente GSSG/GSH (Sies, 1986). Sin

embargo, existen problemas metodológicos importantes en la determinación correcta del GSSG. En condiciones fisiológicas, los niveles de GSH son de dos a tres órdenes de magnitud mayores que los de GSSG (Kosower, 1978). Además, el GSH se autooxida con facilidad a GSSG, sobre todo a pH neutro (Asensi y cols., 1994). Esto hace que una pequeña oxidación del GSH suponga un aumento muy importante del GSSG, con el falseamiento consiguiente del índice GSSG/GSH. Estos problemas se han conseguido solucionar gracias al método propuesto por nuestro grupo, consistente en el bloqueo del grupo tiol con N-etilmaleimida inmediatamente después de la extracción y posterior análisis del GSSG por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (H.P.L.C.) (Asensi y cols., 1994).

3.5.2. Indicadores de daño oxidativo a proteínas

3.5.2.1. Grupos carbonilos en proteínas

Los métodos para la detección de los grupos carbonilo producidos en las proteínas por el estrés oxidativo se pueden agrupar en dos: marcaje con borohidruro de sodio tritiado, y reacción con fenilhidrazinas (Lewisch y Levine, 1995). El método más empleado se basa en la reactividad de la 2,4-dinitrofenilhidrazina con los grupos carbonilo para formar 2,4-dinitrofenilhidrazona, que se cuantifica mediante espectrofotometría (Oliver y cols., 1987; Lewisch y Levine, 1995).

3.5.2.2. 2-oxohistidina

La histidina es uno de los aminoácidos más vulnerables al ataque oxidativo. Uno de los productos de la oxidación de la histidina es la asparagina (Amici y cols., 1989; Stadtman, 1990). Sin embargo ésta no resulta un marcador apropiado debido a que aparece de manera natural en las proteínas, y además se hidroliza a aspartato con facilidad en medio ácido (Uchida y Kawakishi, 1993). La oxidación del carbono 2 del imidazol de la histidina da lugar a la formación de 2-oxohistidina, que se ha empleado como indicador del daño oxidativo a las proteínas (Lewisch y Levine, 1995).

3.5.3. Indicadores de daño oxidativo a lípidos

3.5.3.1. Malondialdehído e hidroxinonenal

La degradación de los lipoperóxidos da lugar a la formación de una gran variedad de aldehídos. Los indicadores de daño oxidativo a lípidos más empleados son el malondialdehído y el 4-hidroxinonenal. Se han descrito varios métodos para la determinación de malondialdehído (Bird y Draper, 1984; Esterbauer y cols., 1991). La mayoría son poco específicos, ya que utilizan el ácido tiobarbitúrico como reactivo y éste reacciona con todos los aldehídos de la muestra. Estos métodos se han mejorado gracias a la separación, por cromatografía líquida de alta resolución, del aducto malondialdehído-ácido tiobarbitúrico de otras sustancias que puedan interferir en la determinación (Knight y cols., 1988). El 4-hidroxinonenal es un producto muy abundante de la peroxidación lipídica. Las técnicas convencionales de cuantificación incluyen la derivatización de la muestra con dinitrofenilhidracina para formar un aducto estable y no volátil con el aldehído, y una cromatografía por H.P.L.C. para separar y cuantificar el pico correspondiente al 4-hidroxinonenal (Esterbauer y Zollner, 1989).

3.5.3.2. Pentano y etano

El etano y el pentano son dos hidrocarburos de cadena corta que se forman como productos terminales en la lipoperoxidación de los ácidos grasos poliinsaturados ω -3 y ω -6 (Dumelin y Tappel, 1977). Debido a su volatilidad, se eliminan por vía pulmonar y se pueden identificar por cromatografía de gases. Al ser una técnica no invasiva, la cuantificación de estos alcanos se ha empleado mucho en seres humanos como índice de peroxidación lipídica (Wispe y cols., 1985; Wispe y cols., 1986).

3.5.4. Indicadores de daño oxidativo al DNA

3.5.4.1. 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina

Una de las bases modificadas cuyo contenido aumenta en el DNA tras un estrés oxidativo es la 8-hidroxiguanina (Kasai y cols., 1986). Esta lesión puede repararse por una glicosilasa, que elimina la base nitrogenada (8-hidroxiguanina), o por una endonucleasa, que elimina el nucleósido (8-hidroxi-2'-desoxiguanosina) (Tchou y Grollman, 1993); ambas se eliminan por la orina. La cantidad del nucleósido 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina en órganos o en orina se utiliza como índice del daño oxidativo al ADN *in vivo* (Fraga y cols., 1990). Se prefiere la detección del nucleósido y no de la base, porque la excreción de la base oxidada en orina está muy influenciada por la ingesta.

4. Antioxidantes

El organismo posee una serie de sistemas de naturaleza enzimática y no enzimática diseñados para protegerse de la acción de los radicales libres por él generados: se denominan antioxidantes. Halliwell en 1995 definió antioxidante como "cualquier sustancia que, cuando está presente en bajas concentraciones comparado con el sustrato oxidable, disminuye significativamente o inhibe la oxidación de este sustrato" (Sies, 1993; Halliwell y Gutteridge, 1995; Halliwell, 1996).

Pueden actuar de las siguientes formas:

- Previniendo la formación de ROS
- Interceptando el ataque de ROS,
- Secuestrando los metabolitos reactivos y convirtiéndolos en moléculas enos reactivas
- Amplificando la resistencia de las dianas biológicas sensibles al ataque de ROS;
- Facilitando la reparación del daño causado por ROS y, por último
- Manteniendo un ambiente favorable para la actuación de otros antioxidantes.

Bajo el punto de vista de la fisiología celular, los podemos dividir en antioxidantes primarios, secundarios y terciarios.

Los antioxidantes primarios previenen la formación de nuevas especies de radicales libres. Estos antioxidantes actúan por conversión de los radicales libres existentes en moléculas menos dañinas, o impidiendo su formación desde otras moléculas. Dentro de este grupo se incluye a la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa, la catalasa y las proteínas ligadoras de metales (ferritina y ceruloplasmina) que limitan la disponibilidad de hierro necesario para la formación del radical OH^{\bullet} (Gutteridge y Stocks, 1981; Halliwell y Gutteridge, 1989).

Los antioxidantes secundarios son protectores no enzimáticos o captadores de radicales libres que intervienen cuando hay superproducción de radicales libres y los sistemas enzimáticos están desbordados, previniendo así las reacciones en cadena. Se incluye el glutatión, la vitamina E, vitamina C, ácido úrico, bilirrubina y albúmina (Halliwell y Gutteridge, 1990).

Los antioxidantes terciarios reparan biomoléculas dañadas por los radicales libres. Entre ellos se encuentran los sistemas proteolíticos intracelulares, que

actúan degradando proteínas dañadas oxidativamente, evitando de este modo su acumulación (Davies, 1987; Pacifi y Davies, 1991). También podemos destacar las enzimas reparadoras de ADN, la metionina sulfóxido reductasa y la fosfolipasa A2 que corta los fosfolípidos oxidados de la membrana (Demple y Halbrook, 1983; Sevanian y Kim, 1985; Dizdaroglu, 1993).

Otra forma de clasificar a los antioxidantes, muy utilizada en la literatura, es desde un punto de vista bioquímico. Así, podríamos clasificarlos en antioxidantes enzimáticos y antioxidantes no enzimáticos:

Tabla I.10. Sistemas antioxidantes

ANTIOXIDANTES ENZIMATICOS	ANTIOXIDANTES NOENZIMATICOS
Superóxido dismutasa (SOD)	Glutación
Glutación peroxidasa	Vitamina E
Catalasa	Vitamina C
Tioredoxina	Ácido alfa lipoico
Glutaredoxina	Carotenoides
	Ácido úrico
	Otros

5. Xantina Oxidoreductasa (XOR) fuente de radicales libres

La enzima xantina óxidoreductasa (XOR) es una enzima descrita originalmente como una aldehído oxidasa en 1902 (Scharinger, 1902). Está ampliamente distribuida entre seres vivos de distinta complejidad, habiéndose demostrado su existencia desde organismos tan sencillos como las bacterias hasta los mamíferos más evolucionados como el hombre.

5.1. Familia estructural de la XOR

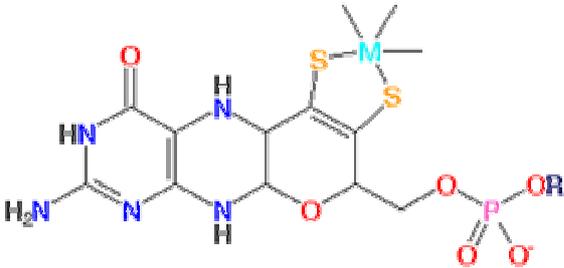
La xantina oxidoreductasa es una proteína componente de la familia molibdopterinas. Una familia de enzimas presentes tanto en bacterias (Leimkuhler, 1999), como en hongos (Glatigny, 1995), plantas (Bittner, 2001; Hoff, 1998) y animales (Wright, 1993; Carpani, 1990; Terao, 2001).

La clase de molibdopterinas (molibdo-enzimas o molibdo-proteínas) poseen como elemento central en la estructura el Molibdeno (Mo). Como cofactor contienen a la pterina, molécula que se encarga de coordinar el enlace ditiol (Mo-S). El conjunto del centro molibdénico con la pterina se conoce como Molibdopterina (*Molybdopterin-MPT*) o como Molibdeno cofactor (*Molybdenum cofactor*) (Mo-Co).

En los organismos eucariotas, el radical R situado en la estructura del Mo-Co puede ser un H, mientras que en los procariotas puede ser una adenina (AMP), citosina (CMP), guanina (GMP) o hipoxantina (HMP).

Las molibdopterinas se pueden clasificar en función del papel fisiológico, del tipo de centro molibdopterina (Tabla I.11), en función del tipo y el número del centro prostético (Tabla I.12).

Tabla I.11. Molybdopterincontaining proteins by molybdopterin centre type
(Metallo. Scripps.edu, 1997)

MOLYBDOPTERIN CENTRE	PROTEIN FAMILY
 <p>M-molybdopterin cofactor (M = Mo or W; R = H or CMP)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Sulphite oxidase family • Xanthine oxidase family

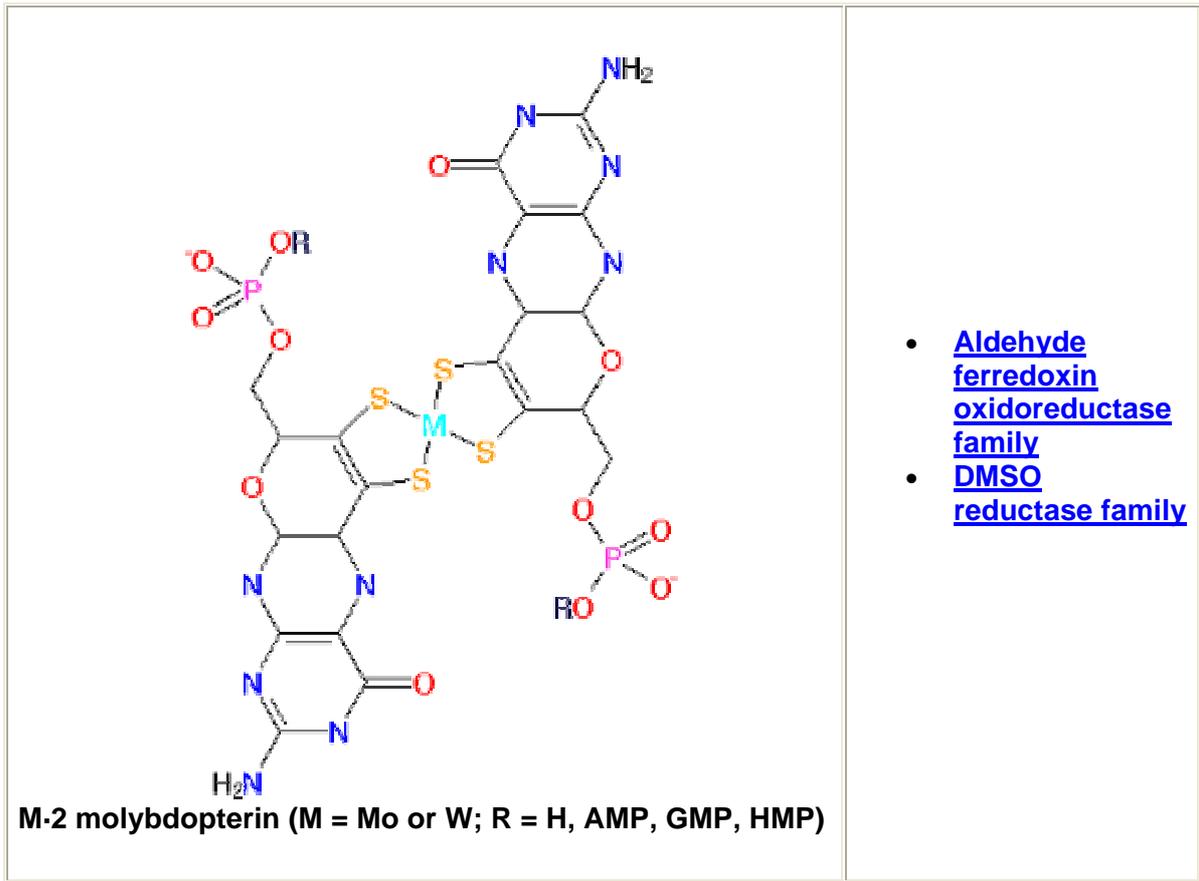
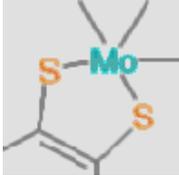
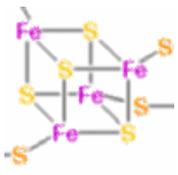


Tabla I.12. Molybdopterincontaining proteins by type and number of prosthetic centres
(Metallo. Scripps.edu, 1997)

SIMPLE	COMPLEX
	<p>MoCo-Fe-S proteins</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Aldehyde ferredoxin oxidoreductase family ○ DMSO reductase family <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;">   </div> <p style="text-align: center;">MoCo-Fe₄S₄/Fe₃S₄</p>

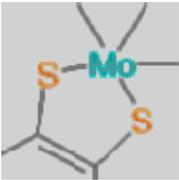
<p>DMSO reductase</p>  <p>MoCo</p>	<p>MoCo-Fe-S-flavoproteins</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Xantina oxidase family  <p>MoCo-Fe₂S₂</p>
	<p>MoCo-haemo-(flavo)proteins</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Sulphite oxidase family  <p>MoCo-haem</p>

Tabla I.13. Descripción de la familia molibdopterina (*Metallo. Scripps.edu, 1997*)

FAMILY	DESCRIPTION
<p>XANTOXIDASE (XO)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Xanthine oxidase • Xanthine dehydrogenase • Aldehyde oxidase • CO dehydrogenase

<p>ALDEHYDE FERREDOXIN OXIDOREDUCTASE (AOR)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Aldehyde ferredoxin oxidoreductase • Formaldehyde ferredoxin oxidoreductase • Glyceraldehyde3phosphate ferredoxin oxidoreductase • Carboxylic acid reductase • Hydroxycarboxylate viologen oxidoreductase
<p>SULFOXIDASE (SO)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Sulphite oxidase • Plant and fangal assimilatory nitrate reductases
<p>DMSO REDUCTASE (DMSOR)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • DMSO reductase • Dissimilatory nitrate reductases • Formylmethanofuran dehydrogenase • Trimethylamine N-oxidoreductase • Arsenite oxidase • Formate dehydrogenase • Polysulphide reductase

5.2. Estructura de la Xantina OxidoReductasa

La familia de las xantina oxidasa está formada por α_2 homodímeros de tipo molibdeno-flavonoproteico. Cada monómero está organizado en distintos dominios.

El prototipo de la familia molibdenopterinas y de la familia xantina oxidasa es la xantina oxidoreductasa (XOR).

La estructura tridimensional de la XOR se parece a una “mariposa” (Figura I.52 A y B).

Un dímero está formado por dos monómeros de 150 kDa. Cada monómero contiene en concreto 3 dominios:

- El dominio N-terminal representado por el grupo $[\text{Fe}_2\text{S}_2](\text{S}^{\text{Y}}_{\text{Cys}})_4$, de 20kDa, situado entre los amino ácidos (aa)1-165, está formado por dos centros $\text{Fe}_2\text{S}_2\text{I}$ y $\text{Fe}_2\text{S}_2\text{II}$. Se describe tanto en leche de vaca (Rojagopalan32-15) como en la humana (articol15) un tercer tipo de centro Fe/S, denominado Fe/SIII, que parece que reemplaza al Fe/SI.

- El intermedio representado por el flavín adenin dinucleótido (FAD), de 40kDa. Situado entre aa.226-531
- El dominio C-terminal es el centro molibdeno cofactor (Mo-Co), de 85kDa. Situado entre aa.590-1332 (Hill)

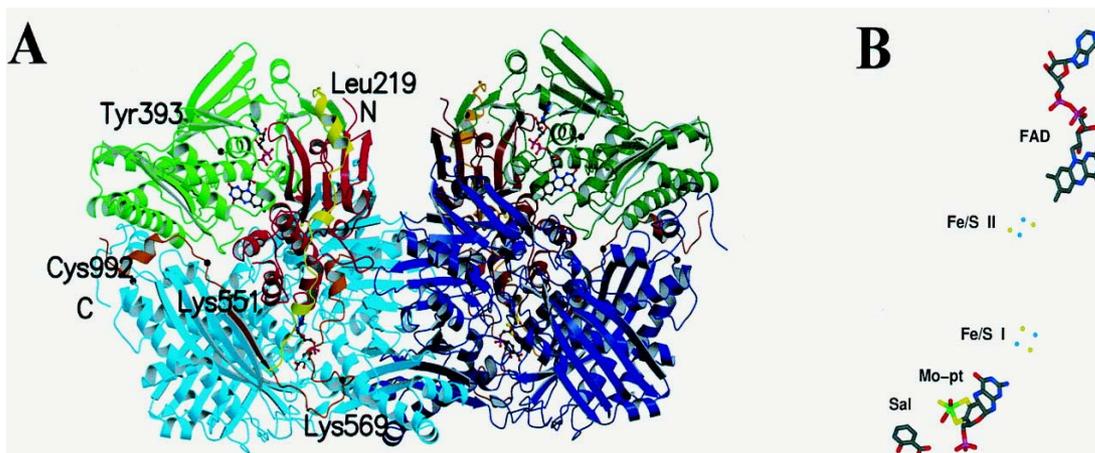


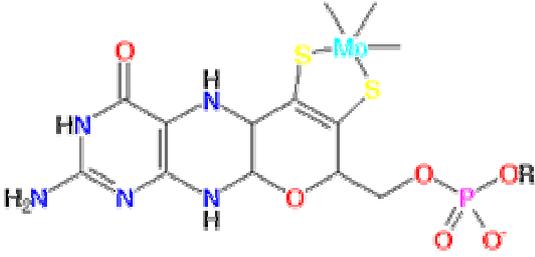
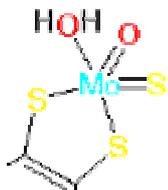
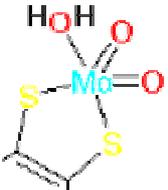
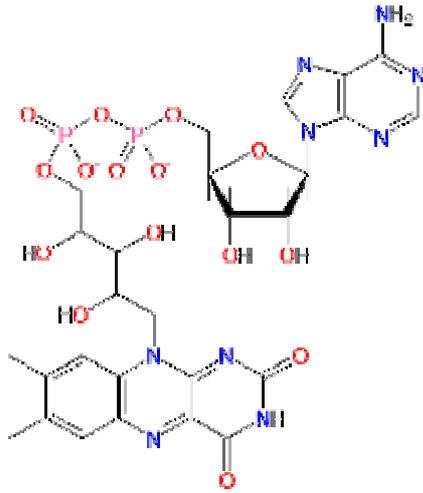
Figura I.52A Estructura tridimensional de la XOR. Los colores representan los dominios: en marron Fe_2S_2 , en verde FAD y en azul el Mo

Figura I.52B Orientación relativa de los dominios. El código de colores para los átomos es: C-blanco, N- azul, O-rojo, S-amarillo, Fe-verde, P- morado, Mo-marrón (Enroth C., *Proc. Natl.Acad.Sci.USA* 97, 10723-10728, 2000).

La estructura química de cada dominio está representada en la Tabla I.14.

Tabla I.14. Grupos prostéticos en la estructura de la XOR (*Metallo. Scripps.edu, 1997*)

CENTRE	PROSTHETIC GROUP	FORMAL OXIDATION STATES
Fe_2S_2I	 $[Fe_2S_2](S^V_{Cys})_4$	$[Fe_2S_2]^+$; $[Fe_2S_2]^{2+}$
Fe_2S_2II		

MoCo	 <p>Molybdenum cofactor (Mo-molybdopterin) R = H (eukaryotic enzymes), AMP, CMP, GMP (prokaryotic enzymes)</p>	$\text{Mo}^{\text{IV}}; \text{Mo}^{\text{V}};$ Mo^{VI}
	<div style="text-align: center;">  <p>$[\text{MoSO}](\text{S}_{\text{molybdopterin}})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (active)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>$[\text{MoO}_2](\text{S}_{\text{molybdopterin}})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (inactive)</p> </div>	
FAD	 <p>Flavin adenine dinucleotide (FAD)</p>	<p>FAD</p> <p>FAD (semiquinone)</p> <p>FADH₂</p>

La XOR posee un peso molecular y una estructura de los centros de oxidación-reducción, similar en las distintas especies (Hille y cols., 1995) . La estructura de la XOR humana de hígado, intestino y glándula mamaria es 90% idéntica con la de glándula mamaria de bovino (Godber, 2005).

La disposición geométrica y los potenciales de oxidación-reducción de los grupos Fe/S y del cofactor de molibdopterina indican que los electrones se transfieren desde el molibdeno a los dos grupos Fe/S mediante un proceso termodinámicamente favorable. Como las distancias entre los centros y el cofactor de molibdopterina son

menores de 14 Å, el mecanismo más probable por el que se transportan los electrones es el "tunneling" (Page y cols. 1999).

El dominio FAD presenta una profunda hendidura donde se localiza la molécula de FAD; en la que queda aún suficiente espacio para albergar una molécula de NAD (Enroth, 2000).

El cofactor MoCo, es el dominio con el que interacciona con los sustratos, (Enroth, 2000). En su estructura, el molibdeno está penta coordinado. En la forma activa de la XOR, el molibdeno forma 2 enlaces simples con el átomo de azufre (de los 2 grupos tiol), 2 enlaces con el átomo de oxígeno (uno con el grupo hidroxilo y otro con el grupo oxo) y la pentacoordinación se realizan con un enlace doble con el átomo de azufre (Figura I.53).

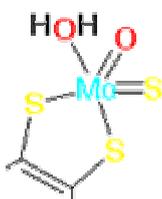


Figura I.53. Representación gráfica de los enlaces del átomo de molibdeno

La XOR presenta 3 formas inactivas:

- Una será la Desulfo, en la cual el átomo de azufre penta coordinado al molibdeno se sustituye con un átomo de oxígeno. Esta forma representa un 30-40% de la XOR en leche de vaca (Shaw, 1990; Robertson, 1994; Kisker, 1997) y 50-60% en la leche humana (Godber, 2005).
- La forma Demolibdo, que carece en molibdeno o probablemente también en molibdopterina, representa el 95% de la XOR en leche de humanos (Dudley, 1995; Robertson, 1994; Wright, 1997) y un 40% de la XOR en leche de vaca (Wright, 1999; Nishino, 1989). La deficiencia viene de la falta de incorporación de la molibdopterina, lo que determina unos cambios conformacionales de la apoproteína. Por lo tanto, se impide la integración del grupo Fe_2S_2I que será reemplazado por la Fe_2S_2III , de donde su distinta actividad catalítica. La forma Demolibdo va acompañada por una deficiencia en los centros de Fe_2S_2 , prácticamente un 30% de la XOR de la leche humana es deficiente en estos centros (Godber, 2005).

El contenido de la forma Demolibdo en la leche humana es mayor que en la leche de vaca (Godber, 2005). De momento no se sabe porque.

- La forma inactiva Deflavó de la XOR, que carece en el grupo FAD no se ha encontrado de forma natural.

Por otra parte, y dado que la XOR ha sido considerada por algunos autores como una fosfoproteína, es de destacar en cuanto a su estructura que posee dos grupos fosfato en el sitio FAD y uno en el sitio de molibdopterina (Davis, 1984; Edmonson, 1984; Schieber, 1993). Estos grupos fosfato pueden estar implicados en la regulación de la actividad enzimática.

5.3. Genética y evolución

La xantina oxidoreductasa es el producto de un único gen (Amaya, 1990).

La estructura genética de la XOR humana (Xu, 1996; Terao, 1998; Wright, 1997) y la de ratón (Cazzaniga, 1994; Demontis, 1999) fue las primeras completamente descritas. El locus de la XOR en el genoma humano es el cromosoma 2p22 (Xu, 1994) que corresponde con el cromosoma 17 en el ratón. Consiste en unos 36 exones relativamente cortos que miden 80 kb en el humano y 85kb en ratones. En ambos casos la unión intrón/exón está perfectamente conservada en términos, de posición y tipo.

5.4. Síntesis de la XOR

La biosíntesis de la XOR empieza, teniendo como clave central, la síntesis del cofactor molibdeno (Mo-Co); igual como todos los miembros de la familia estructural de la molibdeno-flavonoides, al que pertenece la XOR. El cofactor molibdeno (Mo-Co) una vez sintetizado será integrado en la estructura de la apoproteína. Seis proteínas están implicadas en la biosíntesis de estos cofactores en humanos, plantas y hongos (Mende, 2002).

En humanos la biosíntesis se realiza en tres fases así tal y como se representa en la Figura I.54.

La primera fase empieza con un derivado de guanina, el más habitual es el GTP, tras una secuencia de reacciones complejas, catalizadas por las enzimas MOCS1A y MOCS1B, determina la formación del precursor estable Z. En humanos, las dos enzimas mencionadas, están codificadas por el mismo gen *mocs1* (Reiss, 1998).

En la segunda fase al precursor Z se le incorporan dos átomos de azufre y lo convierte en molibdopterina (MPT). La reacción está catalizada por la enzima molibdopterina (MPT) sintasa. Esta se activa por la introducción de una molécula de azufre en una reacción catalizada del MOCS3, teniendo como dador de átomos de

azufre a la cisteína. La MPT sintasa es un complejo heterotetramérico, en el cual las subunidades se codifican por el mismo gen *mocs2* (Stallmeyer, 1999).

En la tercera fase, a la molibdopterina (MPT) se le añade en su estructura el átomo de Mo. El proceso se realiza por intermedio de la proteína GEPHYRIN, con la cual MPT viene en contacto en esta fase. La Gephyrina fue descrita, por primera vez, como un receptor en la membrana postsináptica (Kirsch, 1998). La Gephyrina está localizada entre el plasmalema y los filamentos de actina donde se ancla. Se supone que los canales iónicos de molibdeno interactúan con la Gephyrina y facilitan la transferencia del molibdato al dominio N-terminal de la misma.

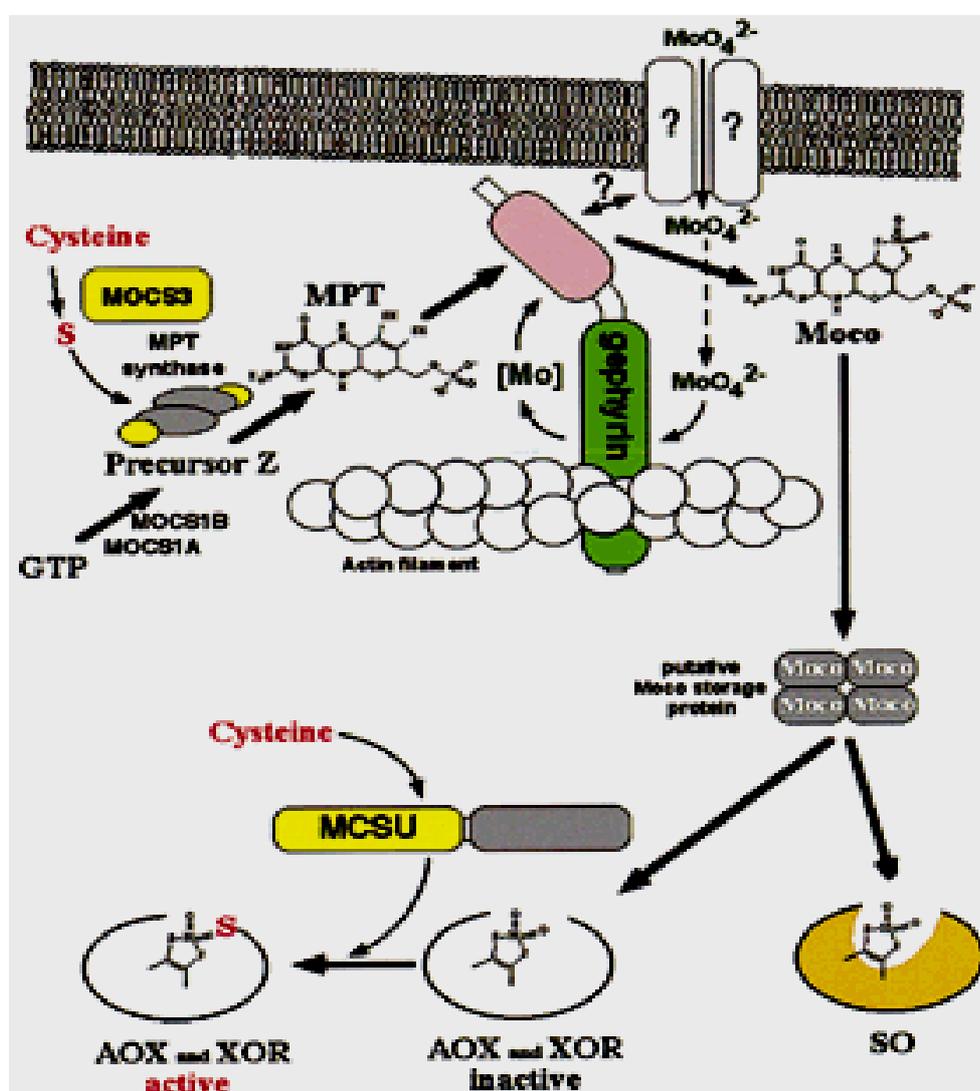


Figura I.54. Modelo de biosíntesis de Mo-Co y XOR en las células humanas

(Garattini E, *Biochem. J.*-2003)

Este dominio, genera una activación del molibdeno que será después incorporado por el lado C-terminal en la estructura de la molibdopterina. MPT es muy sensible a oxidación, por lo tanto se presupone que se produce una rápida conversión del precursor Z vía MPT al cofactor Molibdeno (Mo-Co), dentro de un complejo multienzimático enclavado por la gephyrin en el citoesqueleto.

La xantina óxidoreductasa una vez sintetizada se presenta en dos formas: xantina deshidrogenasa (XDH) y xantina oxidasa (XO) (Figura I.55). Ambas formas enzimáticas, son el producto del mismo gen, tienen un tamaño similar, el mismo número de subunidades y requieren los mismos cofactores (Hille y Nishino, 1995). Las dos formas catalizan reacciones con un sustrato similar, pero el aceptor de electrones durante la reacción es distinto. La XDH difiere de la XO en el sitio de unión con el NAD^+ . Siendo el potencial redox de la molécula XDH menor (unos 150mV), por lo que se diferencian en la cinética y termodinámica de esta forma (articol5-desktop)

En tejidos sanos, entre un 10 y un 30% de la actividad total de la enzima procede de la forma oxidasa (Chambers y cols., 1985).

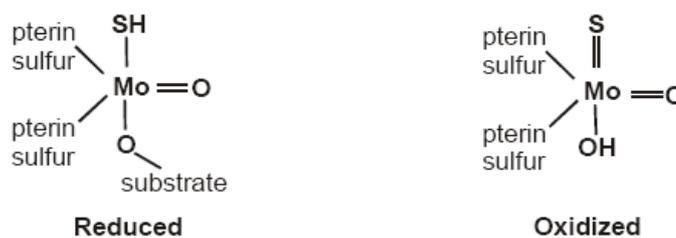


Figura I.55. Formas reducidas y oxidadas de la XOR.

La enzima, in vivo, está mayoritariamente como forma deshidrogenasa (XDH), pero se puede convertir a oxidasa (XO) de dos maneras:

- 1) Por conversión reversible mediante la oxidación de los residuos sulfidrílo
- 2) Por conversión irreversible mediante proteólisis.

1) La conversión reversible se realiza bajo ciertas condiciones (Stirpe y cols. 1969) como:

- calentamiento a 37°C.(Della Corte y Stirpe 1972)
- almacenamiento a -20°C.(Della Corte, 1969)
- anaerobiosis. .(Della Corte, 1969)
- algunos solventes orgánicos.
- incubación con fracciones subcelulares.

- reactivos sulfidrilo.(Waud y Rajagopalan, 1976)

La conversión reversible de la XDH a XO se realiza por oxidación de los grupos tiol, de los residuos de cisteína, con la formación de puentes disulfuro (Waud and Rajagopalan, 1976). Rasmussen y colaboradores en 2000 vieron que se modifican 6 de los 38 residuos encontrados: los residuos 169, 170, 535, 992, 1371 y 1325, de los cuales el 535 y el 992 sugieren que son los candidatos más firmes, mientras que otros residuos como el de cisteína se localizan demasiado lejos de los cofactores (Nishino, 1997; Rasmussen, 2000). Además de la oxidación de dichos aminoácidos, la conversión también se acompaña de pérdida de afinidad por NAD^+ (Hille y Nishino, 1995), alteración de las propiedades redox y de la cinética enzimática (Saito y Nishino 1989; Hunt y Massey, 1992).

Los cambios conformacionales en el dominio FAD (Massey y cols. 1989) (Saito, 1989), son esenciales (Figura I.55). Este dominio dicta la preferencia para el aceptor de electrones (Massey, 1989; Saito, 1989; Enroth, 2000).

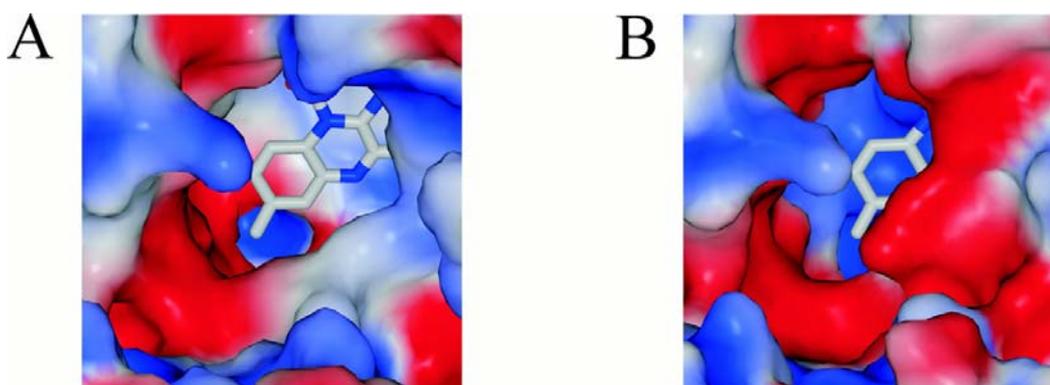


Figura I.56. Representación del cambio conformacional en el sitio FAD cuando la XDH

En la glándula mamaria la conversión XDH a XO se realiza durante la secreción de la leche y la formación de isómeros disulfido de la XO es debido a las protein-disulfito isomerasas, que se encuentran en la membrana que rodea las gotas de lípidos de la leche (McManaman, 1999).

2) La conversión irreversible de la enzima XDH a XO se produce por proteólisis (Amaya y cols., 1990; Stirpe y Della Corte, 1969; Waud y Rajagopalan 1976). La tripsina corta la enzima tras el residuo de Lys⁵⁵¹, mientras que la pancreatina corta tras los residuos Leu²¹⁹ y Lys⁵⁶⁹ (Enroth, 2000), formándose los tres dominios estructurales, de 20, 40 y 85 kDa (Figura I.57).

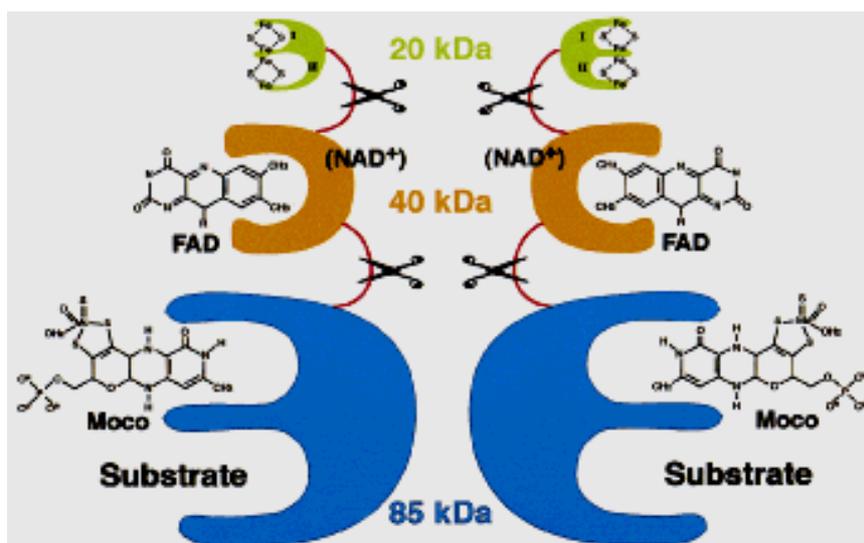


Figura I.57. Representación esquemática de los dominios cuando se cortan por proteólisis (Garattini E.- *Biochem.J.*-2003)

Se ha observado que la quimotripsina corta la cadena proteica de la enzima tras el residuo de Phe⁵⁶⁰ sólo cuando se encuentra en la forma Oxidasa, mientras que en otros puntos de la proteína corta por igual la forma Deshidrogenasa que la Oxidasa. Esto quiere decir que la conversión de la forma reducida a la oxidada implica cambios estructurales y conformacionales globales, que sacan a la superficie algunos residuos que en la forma Deshidrogenasa no eran accesibles a la quimotripsina, (McKelvey, 1988)(Figura I.58) sugieren que la conversión a Xantina Oxidasa reversible viene precedida por la depleción de GSH (McKelvey y Höllwarth, 1988).

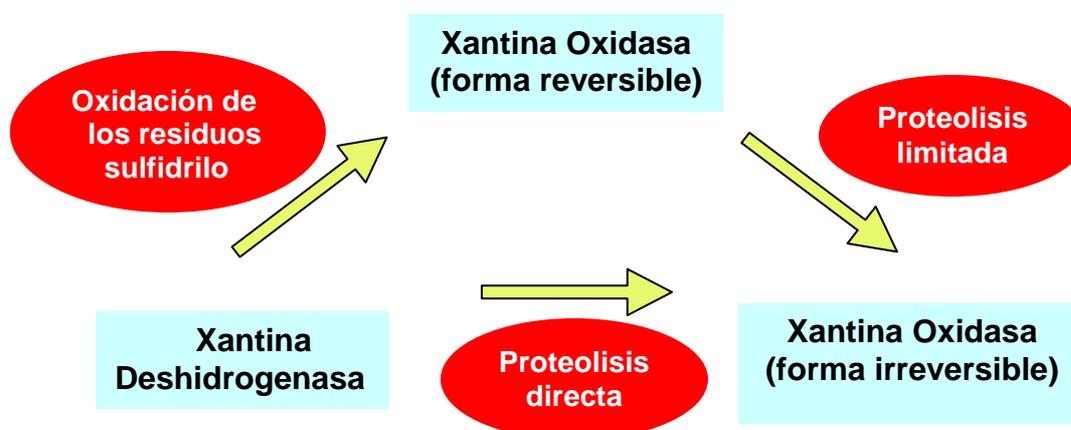


Figura I.58. Vías de conversión de la XDH en XO

5.3. Distribución de la XOR

La actividad de la XOR fue detectada desde bacterias hasta mamíferos (Parks, 1986). La mayoría de los datos obtenidos sobre la distribución de la enzima XOR en distintos tejidos y células, se han hecho en animales como ratas (Moriwaki, 1998) y ratones (Kurosaki, 1995; Terao, 1992).

La actividad enzimática varía en función del tejido (Godber, 2002). Cantidades importantes de la enzima se encuentran en el hígado (Parks, 1986) y en la porción proximal del intestino delgado, el duodeno y el yeyuno (Kurosaki, 1995). La misma distribución está demostrada en el intestino humano (Linder, 1999), pero menos en comparación con otros mamíferos.

Se ha detectado XOR en el cerebro y el corazón humano (de Jong, 1990; Hellsten-Westing, 1993) implicándose su actividad en el daño celular durante el proceso de isquemia y reperfusión cardíaco y en algunas enfermedades neuronales (Fellman, 1997; Korthuis, 1993).

En humanos la XOR ha sido detectada también en hepatocitos, células de Kupffer, en riñón y en las células epiteliales de la glándula mamaria (Linder, 1999) y del ducto biliar (Hancock, 2002).

La enzima se localiza también en líneas celulares de macrófagos y mastocitos (Hellsten-Westing, 1993).

La XOR está presente en el endotelio capilar de distintos órganos y tejidos, como yeyuno (Kooij, 1992), músculo esquelético (Hellsten-Westing, 1993), riñón (Kooij, 1992) y glándula mamaria (Jarasch, 1981). Se ha demostrado que la XOR se adhiere al endotelio capilar inerte y parece que interacciona con proteoglicanos ricos en condroitín sulfato (Battelli, 1999; 2001). Una vez unida a la membrana celular de células endoteliales, la XOR se incorpora al interior celular por endocitosis (Houston y Estevez, 1999). La unión de la XOR es inespecífica y reversible, la cinética del proceso es comparable con la de otras moléculas que se unen específicamente al endotelio (Shimada, 1981)

La unión de la enzima a la superficie celular está respaldada por la demostración tanto de la enzima como de las consecuencias de su actividad en tejidos que originalmente presentan poca actividad XOR, de forma que tras aumentar la liberación de esta enzima en otros órganos, aquellos presentan un incremento de daño producido por la XOR transportada a través de la sangre (Terada, 1991; 1992) y además estos órganos son protegidos por inhibidores de la XOR (Grum, 1986;

Zimmerman, 1988). Así pues, la XOR liberada desde órganos isquémicos es capaz de producir efectos en órganos a distancia, como el pulmón (Weinbroum, 1995).

En plasma la XOR circula como XO debido a la conversión de XDH a XO por la acción de proteasas plasmáticas. Los niveles plasmáticos de XO en condiciones normales, en los seres humanos son de 0-0,5mU/l (Shamma, 1973). Yamamoto (1996) con el método HPLC y fluorescencia establece unos niveles de 0,21 +/- 0,1mU/l. Los niveles aumentan en condiciones patológicas, relacionadas en especial con la patología de los órganos que más XO tiene, como es el hígado o el intestino. Los niveles circulantes de XO aumenta 1000 veces en la fase aguda de la hepatitis vírica (Bondarenko, 2000;2001), aumenta menos en hepatitis crónica y cirrosis.

Los niveles plasmáticos aumentan también en otras enfermedades como artritis reumatoide, esclerodermia (Miesel, 1993), aterosclerosis (Poss, 1996) etc.

La actividad de la enzima aumenta tras la isquemia-reperfusión de la región esplácnica o tras shock hipovolémico, pero si además se administra una perfusión intravenosa de heparina, aún aumenta más (Tan, 1993;1995). El desplazamiento de la unión de la XO ante la presencia de heparina, se atribuye a la capacidad de ésta para unirse a sitios catiónicos de la XO, compitiendo así la heparina con el condroitín sulfato y otros glicosaminoglicanos (Houston, 1999).

Por otra parte, la unión de la XO a la superficie celular influye en las propiedades catalíticas, en la capacidad de producir agentes oxidantes y en la estabilidad de la propia XOR (Radi, 1997). Un proceso similar sufre la enzima cuando es liberada al plasma, cambiando sus propiedades. La XOR antes de ser liberada por las células, contiene cierta actividad XDH, y al liberarse al plasma se convierte inmediatamente en XO (Tan, 1993; Kooij, 1994). Por lo tanto, tanto la liberación de la enzima a la circulación como la siguiente unión a las células promueven la producción de ROS.

Además de circular por el plasma de forma libre, la enzima circula también formando inmunocomplejos. De hecho, la actividad XO en plasma humano es escasamente detectable en condiciones normales (Giler, 1975; Grum, 1987), en parte debido a que la XOR humana forma inmunocomplejos con los anticuerpos IgM, siendo el 3% de estos anti-XOR (Benboubetra, 1997).

Distribución intracelular

Los estudios de localización intracelular de la enzima, realizados con microscopio confocal, muestran que la XOR es una enzima básicamente citosólica en las células endoteliales de capilar de vaca (Jarasch, 1981) y en células endoteliales de

hígado de rata (Angermuller, 1987; Dikov, 1988). Se distribuye en todo el citoplasma de las células endoteliales y epiteliales humanas, pero con una concentración mayor alrededor del núcleo, lo cual puede significar una localización estratégica para la activación de factores de transcripción nucleares (por ej. NF- κ B) a través de los radicales libres que producen la enzima (Rouquette y cols. 1998).

Existen estudios contradictorios sobre la presencia de la enzima en peroxisomas de hepatocitos (Angermuller, 1987; Dikov, 1988).

Se detecta la enzima en el retículo endoplásmico rugoso, lisosomas y vesículas endocitarias en las células Kupffer (Frederiks y Vreeling-Sindelanova, 2002)

La enzima se concentra en la superficie que tiene contacto con células vecinas (Rouquette, 1998), lo cual podría favorecer también la transmisión de señales entre células a través de los radicales libres formados por la enzima. La misma localización de superficie, se detecta en cultivos de células endoteliales bovinas y porcinas y en la superficie luminal del endotelio sinusoidal en hígado de rata (Vickers, 1998).

La presencia de la enzima en la superficie externa de la membrana se explica por un mecanismo de secreción no clásico propuesto también para otras proteínas. Para secretarse por el mecanismo clásico a través del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, se necesita la presencia de un péptido señal, del cual carece la XOR (Ichida, 1993; Xu, 1994), y además, por la vía clásica la proteína es glicosilada, lo que no se ha demostrado en el caso de la XOR. Rouquette y sus colaboradores explican la presencia extracelular de la enzima mediante un mecanismo de secreción no clásico y posterior unión a glicosaminoglicanos de la superficie celular (Rouquette, 1998).

5.6. Actividad catalítica de la XOR

La actividad catalítica de la enzima está dada por su estructura. La vía más conocida es la de la degradación purínica, descrita por Parks y Granger en 1986 (Figura I.59).

La XOR convierte la hipoxantina a xantina y xantina a ácido úrico, el producto final en el catabolismo purínico en humanos. En mamíferos inferiores, la uratoxidasas metaboliza el ácido úrico a alantoína, pero esta enzima es inactiva en la mayoría de los primates.

El mecanismo por el cual la XOR reacciona con la xantina no se conoce completamente. Xia en 1999 propone un esquema formada por una reacción de reducción y oxidación, como se demuestra en la Figura I.60.

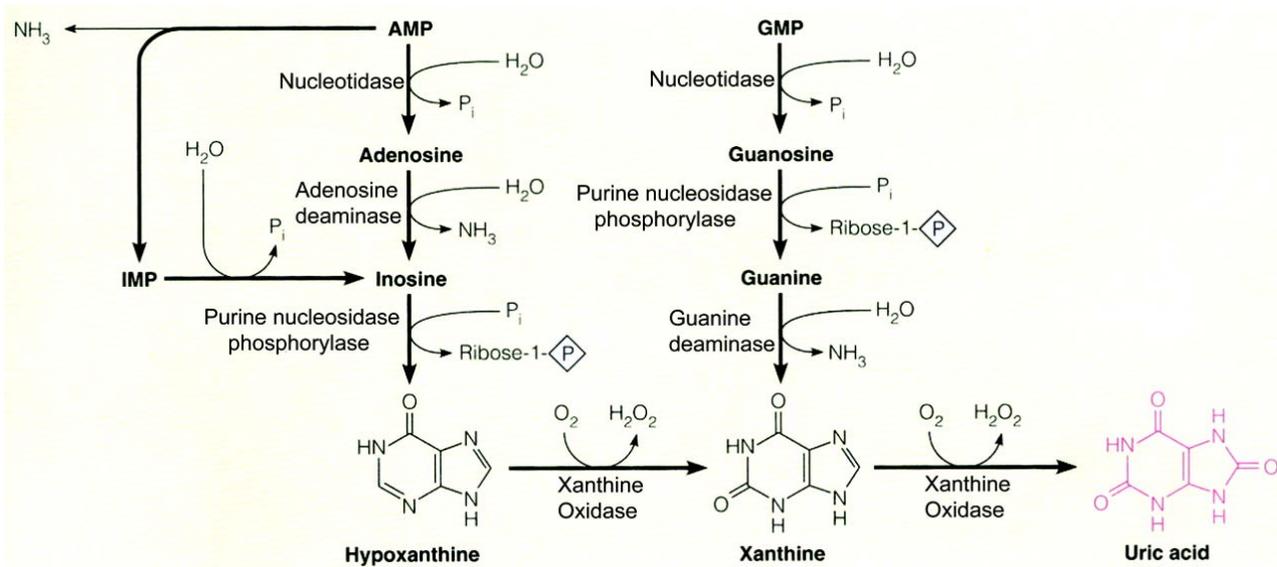


Figura I.59. Vía de degradación purínica (Mathews & Van Holde -1996)

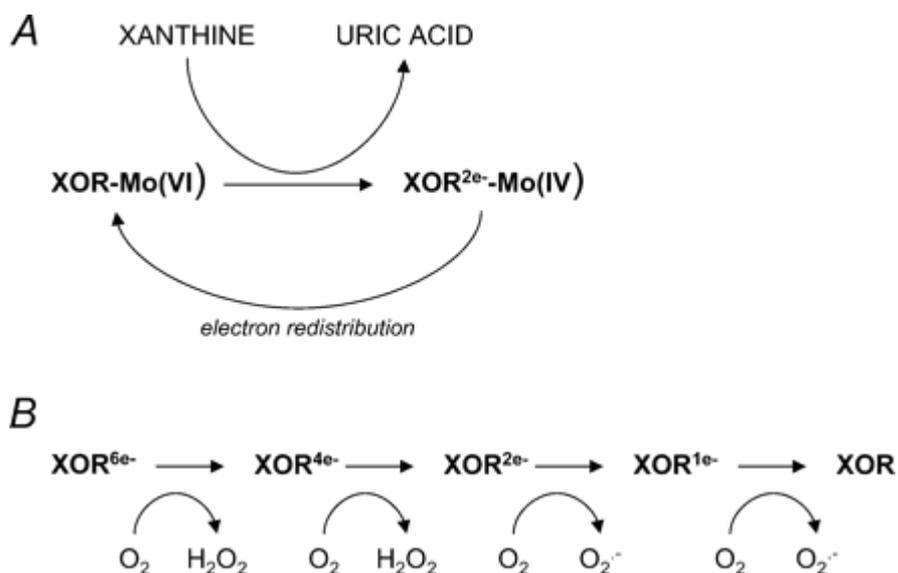


Figura I.60. Mecanismo de reacción de la XOR con la xantina (Berry C, Hare J-J.Physiol 555,3,2004)

A. La reacción de reducción, ocurre en el dominio Mo-Co, durante cual la XOR acepta 2 electrones de la xantina y el Mo (VI) se reduce a Mo (IV). El hidrogeno xantínico del carbono C8 se transfiere al átomo de azufre coordinado al Mo, y el enlace pasa de Mo=S a Mo-SH. En el mismo tiempo, el grupo hidroxilo realiza un ataque electrónico nucleófilo sobre la posición C8 vacía de la xantina y se forma el ácido úrico. El grupo hidroxilo, que ataca la xantina no se sabe muy bien que

procedencia tiene; puede ser el HO- coordinado al Mo o bien moléculas de agua (Enroth, 2000).

B. La reacción de oxidación ocurre a nivel de FAD (Hille y Nishino, 1995). La transferencia intramolecular de electrones entre el Mo-Co y FAD esta mediada por los centros Fe_2S_2 (Hille y Andreson 2001), que sirven como un almacén de electrones, que mantiene al Mo-Co como Mo(VI) y al flavin como FADH₂, por una reacción catalítica (Olson, 1974). Los electrones son transferidos de forma secuencial del FAD al NAD^+ o al oxígeno (Olson, 1974). En cada paso de oxidación la XOR genera dos moléculas superóxido y dos de H_2O_2 (Hille y Massey 1981). La forma XDH, genera más iones superóxido por mol de oxígeno que la forma XO (Saito y Nischimo, 1989). Eso es debido a la estabilidad termodinámica mayor del FAD (que reacciona con el oxígeno) en la molécula de XDH, que en la de XO (Hunt, 1992).

El mecanismo de la transferencia electrónica del XDH a NAD^+ no se conoce completamente, parece que la XDH tiene que estar reducido por 4 electrones, encontrándose en la forma XOR^{4e-} (Harris y Massey, 1997)

El radical superóxido producido, tanto por la XO como la XDH, puede reaccionar con el agua y formar H_2O_2 , o bien con el oxido nítrico (NO), producido por la misma enzima y formar el peroxinitrito, como se muestra en el siguiente esquema (Figura I.61).

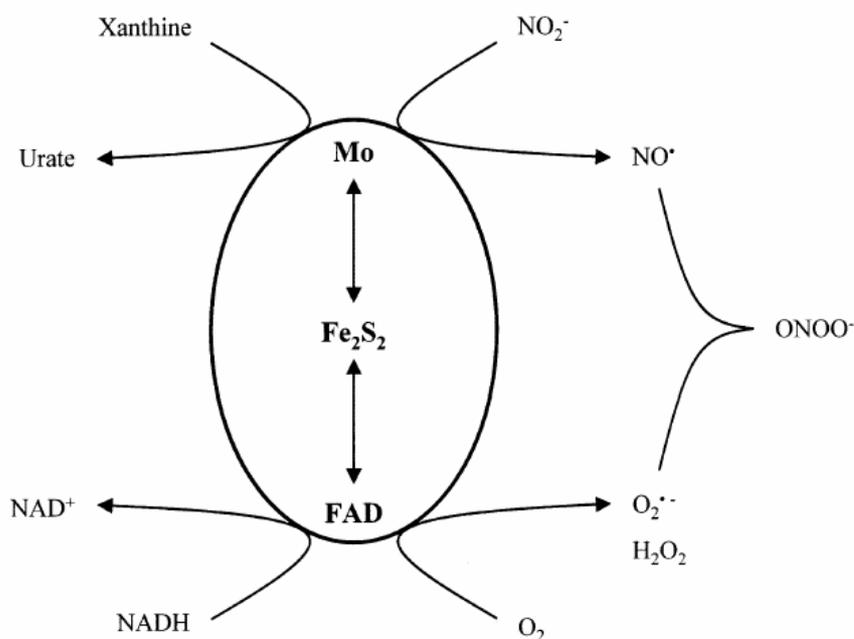


Figura I.61. La XOR cataliza la producción de NO y peroxinitrito (Harrison R-
FRBM Vol33,no6,2002)

La XOR es una fuente importante de RNS. Genera NO en especial en condiciones de hipoxia, cuando la NOS no genera NO (Li, 2003). La XOR tiene propiedades reductoras tanto para el nitrato inorgánico (Li, 2003), como para el nitrito (Zhary 98b, Godber 2000; Li, 2001) a nivel del dominio Mo-Co (Godber, 2000; Li, 2001; Li 2003).

Doel en 2000, demuestra que la XOR puede generar NO utilizando también fuentes orgánicas de nitratos como: isorbitdinitrato (Doel, 2001) o nitritos como: isoamilnitrito (Doel, 2000). Todo el proceso de reducción de nitratos y nitritos orgánicos tiene lugar a nivel del dominio FAD.

La actividad de la enzima XOR es mucho menor en humanos que en otros mamíferos (Parks y Gronger, 1986). Si se utiliza el mismo sustrato, la actividad de la XOR de leche humano es 15 veces menor que la XOR de leche de proveniencia bovina (Godber, 2005). Eso es debido a las formas inactivadas de la enzima en los seres humanos, entre cuales la forma Demolibdeno-XOR en la leche de humanos representa, por ejemplo, entre un 5% (Abadeh, 1992) y un 95% (Godber, 1997) de XOR inactiva.

La actividad de la XOR es menor en los animales viejos que en jóvenes: en nervio (Khalil, 2001), riñón (Cheng, 1999), corazón (Schoutsen, 1987), en suero (Zou, 2004).

5.7. Regulación de la actividad enzimática

La regulación de la actividad enzimática de la XOR se realiza tanto a nivel génico como al nivel transcripcional.

a) Regulación génica

La expresión génica de la XOR es mediada por distintos factores de transcripción como: C/EBP, ETS-1, AP-1, AP-2, TFHD (Xu, 1996), o por el factor nuclear Y (Martelin, 2000).

En humanos, en condiciones normales, la expresión es menor que en otras especies. Además, Hoidal en 1997 y Xu en 2000, demuestra que las células endoteliales en comparación con las células epiteliales, utilizan regiones promotoras distintas para la transcripción de la XOR; por lo tanto la expresión génica es específica para cada tipo de célula.

La presión de oxígeno, es un factor regulador importante. La hipoxia activa la expresión génica de la XOR, mientras la hiperoxia la inhibe, en las células endoteliales (Hassoun, 1996; Terada 1997; Kayyali, 1998). Este efecto puede ser mediado por el factor HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1).

La concentración de hierro intracelular regula la transcripción y la actividad de la XOR (Martelin, 2002).

La tabla siguiente demuestra los factores implicados en la expresión génica de la XOR en humanos, Tabla I.15.

Tabla I.15. Factores transcripcionales en la expresión de XOR en humanos

REGULADOR POSITIVO	REGULADOR NEGATIVO
Hipoxia	
Lipopolisacáridos	
Interferón γ	
IL-1	
IL-6	
TNF α	
Dexametasona	
Cortisol	
Prolactina	
	Hiperoxia

Los corticosteroides, como dexametasona o cortisona, aumenta la expresión génica de la XOR en células epiteliales de riñón humano (Pfeffer, 1994), o en células epiteliales de glándula mamaria de rata (Rouquette, 1998). La cortisona es una hormona lactogénica, un agente anti-inflamatorio y es el estímulo primordial en la inducción de XOR durante la lactancia en la glándula mamaria. La prolactina, otra hormona lactogénica, tiene un papel accesorio en la inducción de la enzima.

Es muy curioso como compuestos anti-inflamatorios (corticoides) y pro-inflamatorios (citocinas) son capaces de inducir la misma enzima, XOR.

b) Regulación post-transcripcional

En la regulación post-transcripcional intervienen distintos factores tales como: los cambios en la presencia del oxígeno, los ROS y RNS, cambios en el ratio NAD^+/NADH , corticosteroides, flavonoides y distintos factores externos.

24 horas de hipoxia aumenta la actividad de la XOR sin ningún cambio en la expresión del mRNA, tanto en células endoteliales aórticas bovinas (Poss, 1996), como en fibroblastos (Terada, 1997). La hiperoxia inactiva la enzima por vías post-transcripcionales. El mecanismo por el cual el oxígeno regula la actividad enzimática parece ser la fosforilación de la XOR (Kayyali, 2001). Lo interesante es que la fosforilación de la enzima se bloque parcialmente con inhibidores de p38, y dado que p38 aumenta en hipoxia, es posible su implicación en la regulación post-transcripcional de la XOR (Kayyali, 2001).

El óxido nítrico (NO) puede regular la actividad de la XOR. Se ha demostrado que la enzima se inactiva progresivamente durante la reducción intrínseca de nitratos y nitritos (Doel, 2000,2001; Godber, 2000) y también mediante NO exógeno (Ichimori, 1999). Otros autores opinan que es el peroxinitrito el que regula la actividad de la XOR (Lee, 2000). La regulación por NO explica el fenómeno clínico de tolerancia, que ocurre en los pacientes expuestos a un tratamiento con nitratos orgánicos a largo plazo.

Por sulfuración se puede activar las formas inactivas Desulfo-XOR, convirtiéndolas en activas (Ichimori, 1999; Doel, 2000,2001; Godber, 2000).

Reguladores negativos de la actividad XOR son: el propio ión superóxido (Terada, 1997), H_2O_2 (Terada, 1991) y el radical hidroxilo (Terada, 1991).

Cambios del ratio NAD^+/NADH constituyen otro factor regulador. El incremento de los niveles de NADH en isquemia puede ser un “trigger” en el aumento de ROS por la vía NADP-oxidación favoreciendo la conversión de la forma XDH a la XO (Sanders, 1997; Harrison, 2004). El incremento de NADH durante la isquemia, inhibe preferentemente a la XDH, desviando el flujo de producción de electrones de las purinas hacia la XO, lo que tiene como resultado un aumento en la producción de ROS (Harrison, 2002).

La isquemia-reperfusión se considera un otro factor en la regulación de la enzima, habiéndose demostrado que ésta provoca un aumento de la actividad de la XOR (Hassoun, 1994; Terada, 1997), así como un aumento en los niveles mRNA (Hassoun, 1994; Terada, 1997) y de la expresión de la proteína *in vivo* (Hassoun, 1998) e *in vitro* (Terada, 1997). Durante el proceso de isquemia los niveles celulares de ATP disminuyen, tanto por el descenso en su producción como por su rápida defosforilación a ADP. Éste es degradado vía adenosina e inosina a hipoxantina. Debido a la depleción del ATP se produce una desregulación de los canales ATP-dependientes y un aumento del Ca^{+2} intracelular. Como consecuencia de este incremento, se produce la activación de proteasas dependientes de Ca^{+2} responsables de la conversión de la XDH en XO (Della Corte y Stirpe, 1968). Durante la reperfusión y debido a la acumulación del sustrato y de la xantina oxidasa en los tejidos isquémicos, se inicia una cascada de reacciones cuyo resultado es un gran aumento en la formación de radicales libres (Figura I.62).

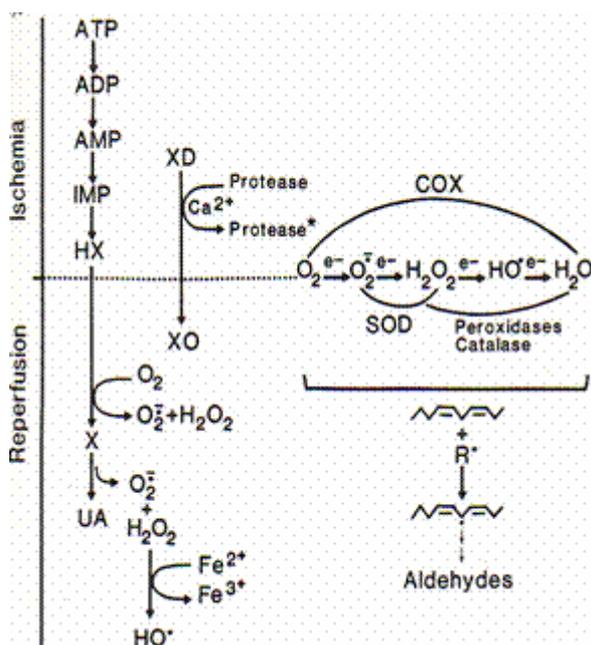


Figura I.62. Esquema simplificado de la producción de radicales libres durante el proceso de isquemia- reperfusión (Saussi B., VID Goteborgs Uniersitet, Wallenberg Laboratory)

Se conocen más de 4000 flavonoides que inhiben la actividad de la XOR. Los flavonoides se fijan del dominio Mo-Co en la estructura de la enzima (Kim y Hille, 1993; Lorigan, 1994). Parece que la estructura plana y el grupo hidroxilo de la posición 7 en la estructura de los flavonoides, es la clave para inhibir la actividad de la XO.

El alopurinol (Figura I.63A.) es un análogo estructural de la hipoxantina (Figura I.63B), conocido desde hace 30 años como inhibidor de la XDH (Elion, 1966), siendo hoy en día utilizado en el tratamiento de la hiperuricemia en gota. Su administración previene el daño tisular postisquémico, inhibiendo la actividad de la XOR. El alopurinol se fija del dominio Mo-Co de la enzima e inhibe la reacción de la misma con el sustrato (Massey, 1970; Truglio, 2002).



Figura I.63. Estructura comparativa del Alopurinol (A) y Hipoxantina (B)

La tabla siguiente contiene distintos inhibidores y su efecto sobre la XOR:

Tabla I.16. Inhibidores de la XOR.

Inhibidor	Modificación	sitio	Efecto	Referencia
Alopurinol	Modificación	sitio	Inhiben las reacciones de la enzima con la xantina, hipoxantina y nitritos	(Massey y cols., 1970)
Amflutizol	Modificación	sitio	Inhiben las reacciones de la enzima con la xantina, hipoxantina y nitritos	(Werns y cols., 1991)
BOF-4272	Modificación	sitio	Inhiben las reacciones de la enzima con la xantina, hipoxantina y nitritos	(Okamoto y cols., 1995)
Tungsteno	Modificación	sitio	Inhiben las reacciones de la enzima con la xantina, hipoxantina y nitritos	(Johnson y cols., 1974)

5.8. Importancia e implicaciones de la XOR

La XOR es una enzima con actividad pro y antioxidante, de ahí su importancia fisiológica y fisiopatológica. Es una enzima indispensable en la homeostasis del organismo humano.

5.8.1 Papel fisiológico de la XOR

El papel fisiológico de la enzima reside en su implicación en el catabolismo purínico. Al final del catabolismo purínico se produce ácido úrico, un importante agente antioxidante (Becker, 1993). La concentración plasmática de ácido úrico en humanos es mucho más alta que en otros primates dado que tenemos inactivada la urato oxidasa (Usuda, 1988). Waranabe 2002 postula que la mayor supervivencia de los seres humanos frente a otros mamíferos es la hiperuricemia. El ácido úrico protege el endotelio vascular del daño oxidativo durante la inflamación (Christen, 2001). En los pacientes con enfermedad Alzheimer (Hensley, 1998) o Parkinson (Church, 1994), los niveles de ácido úrico son muy bajos.

La XOR es capaz de reducir el citocromo c. La reducción se realiza en condiciones de aerobiosis, sin la necesidad de fijarse a algún sitio en la molécula de XOR, mientras que la mioglobina y anhidrasa carbónica compiten con el citocromo c en reducir las especies generadas por el sistema XO (McCord, 1968)

Harrison en su review (2004) subraya el papel antimicrobiano de la XOR, debido a la propiedad citotóxica de los ROS y RNS producidos, tanto en la leche como en el intestino.

En papel antimicrobiano de la XOR en la leche se debe en parte a la producción de H₂O₂ (Harrison, 2004) y por otra a los radicales peroxinitrito (Harrison, 2004). La actividad de la XOR humana en leche alcanza el máximo en la primera semana post-partum (Godber, 2005), su papel probablemente consiste en su acción antimicrobiana en el intestino del neonato (Godber, 2005). El papel antimicrobiano de la leche se debe a los peroxinitrito producido por la XOR. Además, parece que los agentes bacterianos están en contacto físico con la XOR, que está presente en la MFGM. Las MFGM provienen de la membrana apical de las células secretorias mamarias, y por lo tanto tiene en su superficie algunos antígenos específicos. El agente microbiano tiene como diana la MFGM. La XOR está en contacto directo con los ácidos polisacáridos que existen en la cápsula bacteriana.

5.8.2 Papel de la XOR en fisiopatología

La implicación de la XOR en distintos mecanismos fisiopatológicos es debido a la capacidad de producir radicales libres, tanto de oxígeno como de nitrógeno.

Durante la isquemia-reperusión parece que la primera fuente de ROS son los neutrófilos y la XOR media la adhesión de los neutrófilos al endotelio vascular durante este proceso (Harrison, 2002). El alopurinol, inhibidor de la XOR, atenúa la infiltración de los neutrófilos después de reperusión. Parece que el aumento en la producción de los iones superóxido durante la isquemia, no es debido tanto a la conversión de la enzima en su forma XO, como a la actividad NADH oxidasa de la forma XDH. Durante la isquemia los niveles de NADH aumentan de 2-6 veces (Varadarajan, 2001) y la XOR en este proceso tiene más prevalencia para la NADH que para la xantina (Harrison 1997) y parece que para la producción de iones superóxido la conversión de la enzima no es necesaria. Lo que realmente ocurre es que por la acumulación de NADH en el tiempo, se inhibe la XDH antes que la conversión enzimática de inicio.

Debido a su actividad reductasa, durante la isquemia, la XOR reduce el nitrato y el nitrito, tanto el orgánico como el inorgánico, a óxido nítrico (NO). El NO en condiciones de isquemia, cuando la NOS no es activa (Harrison, 2002), produce la nitrovasodilatación local.

En condiciones de hipoxia la XOR cataliza también la reducción del gliceril trinitrato (GTN) a NO en presencia de NADH (Harrison, 2002). Pero los NO van a reaccionar con los iones superóxido formando el peroxinitrito. Lo que explicaría la implicación de la enzima en distintas enfermedades.

La XOR relacionada con en distintos procesos fisiopatológicos de las enfermedades cardiovasculares.

Esta implicada en la disfuncionalidad endotelial. El superóxido producido por la enzima, inactiva el NO, inhibiendo la vasorelajación. Además la combinación del ión superóxido con el NO para formar el peroxinitrito, tiene una velocidad 3 veces más alta que la capacidad del SOD en neutralizar al ión superóxido. La XOR al fijarse al endotelio vascular, inhibe la producción de NO vía cGMP en las células musculares lisas, de esta forma se impide el efecto relajante local.

La actividad de la enzima se correlaciona en enfermedades como obesidad e hipercolesterolemia. Se ha visto, que en los conejos obesos la producción de iones superóxido aumenta unas tres veces en sus vasos sanguíneos, en comparación con los vasos de animales normales. La producción disminuye si se administra heparina o heparina con SOD. Se ha colocalizado colesterol y XOR en las placas ateroscleróticas en los pacientes endarterectomizados, la concentración del ácido úrico en estas placas estaba aumentada unos 5-6 veces más de lo normal (Patetsios, 2001). De aquí la implicación de la enzima en la hipertensión arterial (HTA). En los pacientes con insuficiencia cardíaca la XOR disminuye la contractilidad miocárdica. La administración

de alopurinol a los pacientes con insuficiencia cardíaca, determina un aumento en el consumo de oxígeno y en la contractilidad miocárdica (Werner, 2004). Además, se han detectado niveles altos de XOR en procesos de infarto miocárdico y en isquemia cerebral (Werner, 2004).

La XOR ha sido estudiada también, como mecanismo patofisiológico en el fallo renal (Paller, 1991), en el daño endotelial provocado por lipopolisacárido (Rinaldo, 1990), en la neumonía de origen viral (Akaike, 1990) en la sepsis (Galley, 1996), en la fotosensibilidad cutánea a hematoporfirinas (Athar, 1989), en la hepatitis, en el síndrome de distrés respiratorio del adulto (Grum, 1991) y en el edema pulmonar (Jackson, 1989). En enfermedades neurológicas como: esclerosis múltiple, enfermedad Alzheimer, Parkinson y esclerosis lateral amiotrófica (Harrison, 2002).

5.9. Deficiencia de la XOR

En humanos el déficit genético de la XOR (xantinuria tipo I) es una patología rara y benigna. El único síntoma descrito en estos pacientes es el cólico, resultado de la formación de cálculos de hipoxantina en riñón y hígado (Garattini, 2003).

Recientemente se han conseguido producir ratones XOR knock-out (Garattini, 2003). En estos animales los homocigotos con depleción del gen XOR son incompatibles con la vida. Los ratones XOR^{-/-} mueren después de 6 semanas de vida, las hembras XOR^{+/-} tiene una deficiencia en la lactogénesis, lo que muestra la importancia de la enzima en la homeostasis de la glándula mamaria. Además, parece que el papel de la enzima en la lactogénesis es independiente de su actividad enzimática (Garattini, 2003).

En fisiopatología se describen enfermedades relacionadas con la deficiencia de algunas de las enzimas implicadas en la biosíntesis del cofactor Mo-Co. Se describe en humanos la enfermedad autosómica recesiva denominada "human molybden cofactor deficiency"(Harrison, 2002). Es una enfermedad muy rara, con 80 casos descritos en el mundo (Garattini, 2003). Los pacientes neonatos presentan: anomalías neurológicas severas, lentes oculares dislocadas, dificultad en alimentarse, alteraciones del cerebro y de la caja craneal y mortalidad prematura (Garattini, 2003). Hasta ahora no existe un tratamiento adecuado contra los síntomas de esta enfermedad.

Se conocen pacientes con deficiencia de las enzimas MOCS1 y MOCS2 (Garattini, 2003), pero no se han encontrado casos con deficiencia de la MOCS3.

5.10. XOR en la glándula mamaria

La glándula mamaria es un ejemplo de tejido que expresa la XOR en distintas fases de su desarrollo. En condiciones normales, los niveles bajos de mRNA, la presencia y la actividad de la XOR están asociados con el mioepitelio mamario (Garattini, 2003). Durante la última fase del embarazo y de toda la lactancia, se induce la actividad de la XOR como resultado del aumento de su transcripción. Tras el destete el nivel de la XOR disminuye.

La localización intracelular de la XOR en las células mioepiteliales de la glándula mamaria, parece que no es totalmente citoplasmática. En cultivos de células epiteliales de glándula mamaria humana, la enzima fue detectada tanto intracelularmente como en la superficie (Garattini, 2003).

Durante la lactancia, la XOR es una proteína componente de las gotas de grasas secretadas y es asociada con otras proteínas de mayor importancia de la leche (Harrison, 2002).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo general de la presente tesis consiste, en estudiar el papel regulador de la enzima Xantina Oxidoreductasa (XOR) como fuente principal de radicales libres en el proceso apoptótico inducido, durante la involución fisiológica de la glándula mamaria de rata.

Objetivos específicos

Los objetivos específicos son:

1. Mostrar la presencia de la actividad de la enzima XOR en la glándula mamaria de rata durante el pico de la lactancia (día 14) y su inducción en la involución fisiológica tras el destete.
2. Estudiar parámetros de estrés oxidativo en la glándula mamaria de rata durante la involución fisiológica y correlacionarlos con la actividad de la enzima XOR como fuente importante de radicales libres durante el destete.
3. Estudiar la implicación de la XOR en el proceso de muerte celular por apoptosis en la glándula mamaria tras el destete.
4. Estudiar el mecanismo de acción de la XOR sobre distintas vías en la regulación de la apoptosis en la glándula mamaria.
5. Evidenciar la presencia y la actividad de la forma oxidada de la XOR (Xantina Oxidasa-XO), en la mitocondria de glándula mamaria.
6. Estudiar el papel de la XO sobre el estado redox de la mitocondria en la glándula mamaria.

Objetivos

Estos objetivos son los que fundamentalmente perseguimos en el desarrollo de la presente tesis, y cuyas observaciones mostramos en los siguientes apartados de la misma.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales de experimentación

Se han utilizado ratas Wistar hembra de entre 250 y 300 gramos de peso primíparas. Los animales fueron alimentados “*ad libitum*” con una dieta de mantenimiento manufacturada por PANLAB S.L. (Barcelona) cuya composición y valor calórico fue el siguiente: proteínas 17,9%; grasas 3,1%; fibra 3,8%; glúcidos 58,5%; minerales 5,2%. El valor calórico de este pienso es de 3100 kCal/kg. El acceso al agua fue siempre libre.

Los animales tuvieron un ciclo lumínico de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, y se mantuvieron a una temperatura constante de 22°C y fueron tratados de acuerdo con las recomendaciones de los convención de Helsinki en el animalario de la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina de Valencia. La utilización de estos animales para los experimentos expuestos en este trabajo fue aprobada por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia.

Las ratas hembra de 10-14 días de vida poseen seis pares separados de glándulas mamarias: tres torácicos, uno abdominal y dos inguinales. La mayor separación se da entre el tercer par torácico y el par abdominal. En la edad correspondiente a la pubertad, entre las seis y nueve semanas, hay un marcado incremento de su desarrollo, y son muy notables cuando la rata queda preñada y durante la lactancia. En el animal adulto, las unidades separadas de la glándula son indistinguibles. Durante la lactancia la glándula aparece como una lámina prácticamente continua bajo la piel.

Para los experimentos de la presente tesis, he utilizado las glándulas mamarias de la región inguinal de la rata 14 días después del alumbramiento. El número de crías que amamantaron las ratas durante ese periodo fue de 7 para cada rata hembra.

Se ha trabajado con los siguientes grupos de ratas:

1. Ratitas controles - ratas en el 14 día después del alumbramiento, como ratas no destetadas
2. Ratitas destetadas

- a) ratas en el 14 día después del alumbramiento y destetadas a las 6 horas
- b) ratas en el 14 día después del alumbramiento y destetadas a las 12 horas
- c) ratas en el 14 día después del alumbramiento y destetadas a las 24 horas
- d) ratas en el 14 día después del alumbramiento y destetadas a las 48 horas
- e) ratas en el 14 día después del alumbramiento y destetadas a las 72 horas

3. Ratas destetadas con alopurinol.

Hembras en el 14 día después del alumbramiento, a las cuales a partir del día 11 del parto se le ha administrado en la bebida 190 mg de alopurinol para cada 500ml de agua del biberón y además una cantidad de 1 ml alopurinol (0,48 mg/ml) intraperitoneal dos horas antes de sacrificarlas. Con éste protocolo a cada rata se le ha administrado una cantidad media de 0.43 mg (+/- 0,16) alopurinol/g peso de rata p.o. y unos 0,48mg alopurinol i.p.

2. Aparatos

2.1. Agitador magnético

Marca Selecta, modelo Agimatic-S.

2.2. Agitador orbitales

Agitador orbital no termostatizado marca Hoefer Scientific Instruments, modelo Red Rotor

2.3. Autoclave

Marca IKA-WERK, modelo Janke y Kunkel RW 20 DZH

2.4. Balanzas

- Balanza de precisión Sartorius modelo Tecator 6110.

- Balanza Sartorius modelo PT 1200.

-

2.5. Baños

- Baño SBS con termostato de inmersión, modelo TFB provisto de agitación magnética automática regulable.
- Baño termostático SBS, modelo BT, con bomba de circulación BC-01.

2.6. Camara fotográfica

Polaroid MP4 Land Camera

2.7. Centrífugas

Las centrifugaciones a baja velocidad se realizaron en una centrífuga marca Selecta S. A., modelo centronic COD. 7000577.

Las centrifugaciones a alta velocidad se realizaron en dos centrífugas:

- Centrífuga refrigerada Heraeus, modelo Sepatech Biofuge 17 RS.
- Centrífuga refrigerada Heraeus, modelo Sepatech Megafuge 1.0 R.

2.8. Cubeta de electroforesis

- Para geles horizontales, la cubeta Bio Rad DNA subCell TM
- Para geles verticales, marca Hoefer Scientific Instruments, modelo Mighty Small-250

2.9. Cubeta de electrotransferencia

Marca BIORAD, modelo Mini Trans Blot Cell

2.10. Espectrofotómetro

Kontron modelo Uvikon 922 termostatizado

2.11. Espectrofotómetro capilar

Genequant (Amersham Biosceinces)

2.12. Equipo de H. P. L. C. (cromatógrafo líquido de alta eficacia)

El equipo utilizado para la determinación del glutatión es de la marca Waters y está compuesto por:

- Dos bombas Waters, modelo 510.
- Un inyector automático modelo 2157, Pharmacia LKB.
- Un detector UV $\lambda = 365$ nm, de Waters, modelo 441.
- Un ordenador IBM XT modelo 286 con integrador que procesa los datos y controla el equipo.
- Una columna cromatográfica Waters, modelo Spherisorb aminada, de dimensiones 20 x 0.46 cm de diámetro y 5 μ m de diámetro de partícula.

2.13. Fluorímetro

Perkin Elmer, modelo LS 50B.

2.14. Fuentes de alimentación de electroforesis

Marca SIGMA, modelo PS 250 -2, y marca G.R.O.C.INSTRUMENTS, modelo G-201-B.

2.15. Fuente de alimentación de electrotransferencia

Marca SIGMA TECHWARE, modelo PS 250-2

2.16. Homogenizador

- UltraTurrax T 25, Janke and Kunkel, IKA Biotechnik.
- Homogenizador marca Ika-Werk, modelo Janke y Kunkel, RW 20 DZM.

2.17. Microscopio

Microscopio óptico marca Nikon

2.18. pHmetro

Crison modelo Microph 2001, con un electrodo incorporado INGLOD.

2.19. Cajas de relevado

Marca Kodak, X-Omatic

2.20. Sistema de purificación de agua

Marca MILLIPORE, modelos Mili-Q y Mili-RO

2.21. Ultramicrotomo

Para la obtención de cortes ultrafinos de tejido para la microscopía se utilizó un aparato marca Reichert-Jung Ultracnt E.

2.22. Transiluminador

CE Durviz S.L

Todos estos equipos se encuentran en el Departamento de Fisiología, en la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina de Valencia, o en Departamento de Patología de la Facultad de Medicina de Valencia.

3. Reactivos

3.1. Determinación del NF κ Bp65

Se utilizó el kit Trans AM NF κ Bp65/ NF κ Bp50 Transcription Factor Assay Kits.

El kit contiene los siguientes reactivos:

- NF κ Bp65 antibody
- Anti-rabbit HRP-conjugated IgG
- NF κ B wild-tipe oligonucleotide
- NF κ B mutated oligonucleotide
- Jurkat nuclear extract
- Dithiothreitol (DTT)
- Protease Inhibitor Cocktail
- Herring sperm DNA

- Lisis Buffer AM2
- Binding Buffer AM3
- 10X Washing Buffer AM2
- 10X Antibody Binding Buffer AM2
- Developing Solution
- Stop Solution

3.2. Detección de células apoptóticas

Se utilizó el kit Neuro TACS kit de la firma R&D Systems que contiene los siguientes reactivos:

- Proteínasa K
- TdT dNTP Mix- mezcla de la enzima TdT con deoxinucleotidilfosfat conjugado a la biotína
- TdT Enzyme- deoxinucleoditil terminal transferasa
- NeuroPore- agente de permeabilizar a la membrana celular
- TACS-Nuclease – endonucleasa artificial
- TACS-Nuclease Buffer
- Labelling Buffer
- Stop Buffer
- Streptavidin-HRP – anticuerpo antibiotína conjugado a peroxidasa
- DAB Solución -diaminobensidina
- Mn²⁺

3.3. Determinación del DNA marcado con la sonda biotinilada

El kit ABCComplex - Avidina-HRP de la firma DAKO que contiene:

- Solución A – Avidina
- Solución B - HRP (horseradish peroxidase)

3.4. Determinación de proteínas por quimioluminiscencia aplicando el método de Western blottings

Para evidenciar las proteínas transferidas en las membranas de nitrocelulosa de los Western Blotting se utilizó el kit “Phototope – HRP Western Blot Detection System” de la firma Cell Signaling. El kit contiene los siguientes reactivos:

- Anticuerpo secundario anticonejo IgG, HRP-conjugado
- Antibiotina, HRP conjugado- para detectar el marcador de peso molecular
- Marcador de peso molecular. Una mezcla de proteínas purificadas con biotina, que al revelarlo expone 10 bandas entre 10-200kDa
- El sistema LumiGLO que contiene: reactivo Lumi GLO y H₂O₂

3.5. Stripping restore Western blot stripping buffer de la firma Pierce

3.6. Anticuerpos

- Anti Xantina Oxidasa - anticuerpo policlonal, anticonejo de la casa Chemicon Internacional, Inc.
- PhosphoP53- anticuerpo policlonal, anticonejo de la casa Santa Cruz Biotechnology, Inc
- SAPK/JNK- anticuerpo policlonal, anticonejo de la casa Cell Signaling Technology
- Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) anticuerpo policlonal, anticonejo de la casa Cell Signaling Technology
- P38 MAPK-asa- anticuerpo policlonal, anticonejo de la casa Cell Signaling Technology
- Phospho-P38MAPK-asa (Thr180/Tyr182)- anticuerpo policlonal, anticonejo de la casa Cell Signaling Technology
- 3-NITROTIROSINA- anticuerpo monoclonal , antiraton ,de la casa HyCult Biotechnology B.V.
- Alfa Tubulina (B-7) : sc-5286-anticuerpo monoclonal, antiraton de la casa Santa Cruz Biotechnology, Inc

3.7. Enzimas

- Glutación transferasa (E.C.2.5.1.18) de la firma Sigma-Aldrich Química
- Glutación reductaza de la firma Sigma –Aldrich Química
- Xanthine oxidase de la firma Sigma –Aldrich Química
- Galactosa dehidrogenasa de la firma Sigma-Aldrich Química
- B-Galactosidasa de la firma Sigma –Aldrich Química
- Ribonuclease A de la firma Sigma-Aldrich Química
- Rnase,Dnase-free de la firma Boehringer Mannheim
- Protease Inhibitor Cocktail de la casa Sigma –Aldrich Química

3.8. Coenzimas

- NAD
- NADPH

3.9. Determinación de proteínas

Se utilizó el “Protein ASSAY Kit” de la firma Sigma-Aldrich Química. Este kit contiene los siguientes reactivos:

- Reactivo de Lowry modificado
- Reactivo de Folin-Ciocaltau

Todos los reactivos químicos de uso general (ácidos, bases y sales) se obtuvieron de Merck, Sigma Chemical Co., Boehringer-Mannheim y Panreac, con un grado de pureza suficiente para análisis.

4. Métodos

4.1. Extracción de muestras biológicas de glándula mamaria y de sangre

Tras anestesiar la rata con una inyección de 200µl/100g de peso de Tiopental Sódico (50mg./1,6ml agua bidestilada.), se realizó una incisión longitudinal a lo largo de la cavidad abdominal y torácica de la rata; se separó la piel de dicha zona y se procedió a continuación a la extracción de las glándulas mamaria de la zona inguinal derecha e izquierda.

Parte de tejido, 2-2.5g se ha sacado y guardado en formaldehído durante 24h a 4°C, incluido después en parafina y cortado con micrótopo en cortes microscópicos, para su utilización en el estudio morfológico de la apoptosis tisular.

Otra parte de tejido se ultracongeló mediante la técnica de “freeze-clamping” en nitrógeno líquido y se conservó a –80°C hasta su posterior utilización para homogenados .

Luego se procedió a abrir la cavidad abdominal mediante laparotomía amplia que permite obtener un plano adecuado para rechazar el paquete intestinal hasta visualizar el retroperitoneo, donde se accedía con una jeringa de 5 ml. a la vena cava inferior para obtener la sangre.

Parte de la sangre (1 ml.) era colocada en un tubo de ensayo heparinizado, que posteriormente era centrifugado a 2000g durante 10 minutos a temperatura ambiente, para separar el plasma de los elementos formes. El plasma era recogido en una alícuota e inmediatamente era conservada a –80 °C para la posterior medición de la Xantina Oxidoreductasa.

Otros 0,5 ml. de sangre se depositaban en una alícuota con 0,5 ml. de ácido perclórico al 12 %, BPDS 2 mM., NEM 40 mM. en un tubo Eppendorff. La mezcla se agitó en vortex durante 30 segundos. Seguidamente se centrifugo a 15000 g durante 5 min. a 4 °C. El sobrenadante se recogió y se congeló a –20 °C. Este sobrenadante se utilizó para la determinación de GSSG en sangre.

Para la determinación de GSH en sangre se necesitaban 0,5 ml. de sangre que se depositaban en una alícuota con 0,5 ml. de ácido tricloroacético al 12%, BPDS 2 mM., en un tubo Eppendorff. La mezcla se agitó en vortex durante 30 segundos. Seguidamente se centrifugo a 15000 g durante 5 min. a 4 °C. El sobrenadante se recogió y se congeló a –20 °C.

Por último se procedió al sacrificio del animal debidamente anestesiado.

4.2. Detección y cuantificación de la apoptosis

4.2.1. Aislamiento y cuantificación de DNA genómico

El aislamiento y posterior electroforesis de DNA se realizó por el método descrito por Strange (Strange y cols, 1995), con ligeras modificaciones.

4.2.1.1. Principio del método

Para aislar el DNA genómico situado en el núcleo, se debe primero realizar una ruptura o lisis de las membranas celulares (membrana citoplasmática y nuclear). Por tanto se utiliza un detergente aniónico (SDS) capaz de lisar la membrana celular, con lo que puede liberarse proteínas y ácidos nucleicos. Para evitar la degradación del DNA (por la acción de DNAasas) o la contaminación por iones divalentes, se añade en el tampón de lisis un agente quelante (EDTA).

El paso siguiente es la purificación del DNA, eliminar del medio las proteínas. La proteínasa K que se añade tiene éste papel, dando lugar a pequeños péptidos que serán más fácilmente extraídos con disolventes orgánicos. Para eliminar las moléculas de RNA del extracto celular, se utiliza la Ribonucleasa A, que las degradan rápidamente en ribonucleótidos. La eliminación de las proteínas del medio se finaliza mediante extracciones sucesivas con tres disolventes orgánicos: fenol, cloroformo e isoamilalcohol, los cuales desnaturalizan y precipitan las proteínas, apareciendo en la interfase una masa coagulada y blanquecina, mientras que en la solución acuosa quedan contenidos los ácidos nucleicos (DNA y RNA).

Se procede a la concentración del DNA, se utiliza normalmente etanol para precipitar los ácidos nucleicos poliméricos en presencia de sales (cationes monovalentes como el de Na^+ , ya que los ácidos de cadena corta o los monoméricos no precipitan).

El paso siguiente en nuestro protocolo es la purificación del DNA de RNA. Se añade y se incuban los ácidos nucleicos con RNA-sa sin DNA-sa. De éste modo los ribonucleótidos se pierden.

La pureza y la cuantificación del DNA se realizaron por el método espectrofotométrico valorando la absorbancia en UV: a 280-260 nm que resulta directamente proporcional a la cantidad de DNA de la muestra. Un valor de absorbancia de 1.0 a 260 nm corresponde a 50 μg de DNA de doble cadena. Para controlar la

pureza de la preparación de DNA se utiliza la relación A_{260}/A_{280} . Para una muestra pura de DNA, la relación de absorbancia a 260-280 nm es 1,8. Valores menores de 1,8 indican que la preparación está contaminada, ya sea por proteínas o fenol.

4.2.1.2. Reactivos

- Tampón de lisis: NaCl 10mM, EDTA 10mM, 1% SDS, Tris-HCl 100mM, pH 7,5. Se guarda a 4°C.
- Mezcla de fenol-cloroformo-isoamil alcohol (25:24:1)
- Mezcla de cloroformo-isoamil alcohol (24:1)
- Tampón 1 (TE): Tris 10mM, EDTA 1mM
- Acetato sódico 2,5M; pH 5,2. Se guarda en frío
- Etanol 95% frío
- Etanol 70% frío
- Proteínasa K
- RNasa A libre de DNAsas

4.2.1.3. Procedimiento

- a) El tejido congelado a -80°C se saca en nitrógeno líquido y se pesó aprox.0,5 g
- b) Se trocea muy finamente en el tampón de lisis, para cada 0.5g de tejido se añaden 2 ml de tampón.
- c) Se incuba durante 4 horas en un baño a 56°C .
- d) Seguidamente se realiza dos lavados del lisado, utilizando en el primer lugar dos volúmenes de la mezcla fenol-cloroformo-isoamil alcohol y la segunda con un volumen de la mezcla de cloroformo-isoamil alcohol. Las fases orgánica (inferior) y acuosa (superior, que contiene el DNA) se separaron por centrifugación a 3500 rpm durante 15 minutos.
- e) Al sobrenadante acuoso se le añade 0.1 volúmenes de acetato sódico y dos volúmenes de etanol 95% frío, produciéndose la precipitación. Se deja toda la noche en la nevera.
- f) El día siguiente se centrifuga a 15.000g durante 20 min., de ésta forma se recogen todos los fragmentos de DNA.

- g) Se procede después a lavarlo varias veces con etanol de 70% frío. Se seca con helio hasta que el DNA se desprege de la pared del eppendorf.
- h) Se disuelve completo en tampón 1 (TE) y se apuntan los volúmenes de TE añadidos para cada tubo eppendorf.
- i) Una vez resuspendido, se tratan las soluciones con RNA-sa, 0,2mg/ml, y se incuba a las 37°C durante 30 minutos.
- j) El siguiente paso es la cuantificación de la concentración de DNA en la solución. Para ello, se midió la absorbancia de una dilución 1/400 de la solución madre por el método espectrofotométrico, a las longitudes de onda de 260nm y 280 nm. La medida de la absorbancia a 260 nm es representativa de la concentración de ácido nucleico en la muestra. El cociente de absorbancia a 260 y 280 nm, estima la pureza del ácido nucleico y el grado de contaminación por proteínas, de manera que en preparaciones puras de DNA el valor de éste cociente debe ser próximo a 1,8.

4.2.1.4. Cálculos

Si se utiliza el espectrofotómetro capilar, el resultado se muestra directamente en $\mu\text{g/ml}$ de DNA toda la muestra

Si se utiliza el fluorímetro con cubeta de cuarzo se utiliza:

$$[\text{DNA}] = A_{260} \times \text{Factor de dilución} \times \epsilon$$

$$\text{Donde: } \epsilon = 50 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{Factor de dilución} = \text{Vol. final cubeta} / \text{Vol. muestra}$$

$$\text{Cantidad total de DNA en la muestra} = [\text{DNA}] \times V \text{ total de solución madre}$$

4.2.2. Electroforesis de DNA

4.2.2.1. Reactivos

- Agarosa
- Tampón de electroforesis
- Tampón de carga: Azul de Bromofenol 0,25%, Xylene Cianol FF-0,25% y Glicerol 30%.
- Bromuro de etidio

4.2.2.2. Procedimiento

- 1) Se prepara el gel de agarosa con una concentración de 3% en tampón de electroforesis.
- 2) Se calienta a 100°C. Cuando se ven las primeras burbujas, se quita.
- 3) Se deja que se enfríe hasta de la cara dorsal de la mano aguanta la temperatura del vaso.
- 4) Se añade el bromuro de etidio en una concentración de 0.3 µg/ml.
- 5) Se vierte el gel líquido en el molde preparado anteriormente con el peine, en la cubeta de electroforesis. Se deja que se polimeriza durante una hora.
- 6) Se prepara las muestras de DNA. Se carga una cantidad total de 17µl de volumen que contiene 5µg y 7,5 µg de DNA. A cada muestra se le pone la misma cantidad de tampón de carga. Se prepara de la misma manera el marcador de peso, para un volumen final igual que el de las muestras.
- 7) Una vez el gel polimerizado, se carga los pocillos
- 8) Se pone el tampón de electroforesis hasta que cubre el gel completamente y se aplica un voltaje de 80V durante 90 minutos.
- 9) El gel después se saca y se visualiza y fotografía bajo luz ultravioleta.

4.2.3. Detección de la fragmentación del DNA por el método TUNEL

Para realizar la detección de la fragmentación del DNA nuclear que tiene lugar a nivel internucleosomal durante la última fase del proceso apoptótico, se utilizó el kit NeuroTACS. Un kit que detecta *in situ* las células apoptóticas mediante la técnica de “terminal deoxyribonucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labelling” o TUNEL.

La técnica consiste en marcar los extremos 3'OH libres del DNA genómico cortado durante la apoptosis, utilizando una enzima de transfer. La enzima deoxinucleotidil terminal transferasa (TdT) es utilizada para agregar dUTP que se encuentra conjugado con una molécula de detección (tal como biotina, digitoxina o fluoresceína) al extremo 3'-terminal de un DNA de simple hebra. Una vez marcado, el DNA se expone a un anticuerpo antibiotina o antidigitoxina conjugado con una

peroxidasa, cual nos permite visualizar los núcleos apoptóticos mediante una técnica inmunohistoquímico; o bien por exposición fluorescente en caso de la fluoresceína.

Una esquema del principio será la siguiente, donde:

“h” – es la histona con el segmento 3’ libre del DNA

TdT –es la enzima deoxinucleotidil transferasa terminal

“B” - Biotina que marca el dUTP

“A” – Avidina, la antibiotina conjugada con la “H”

“H” – es la HRP (horseradish peroxidase)- peroxidasa

DAB – diaminobenzidina, el sustrato cromogénico

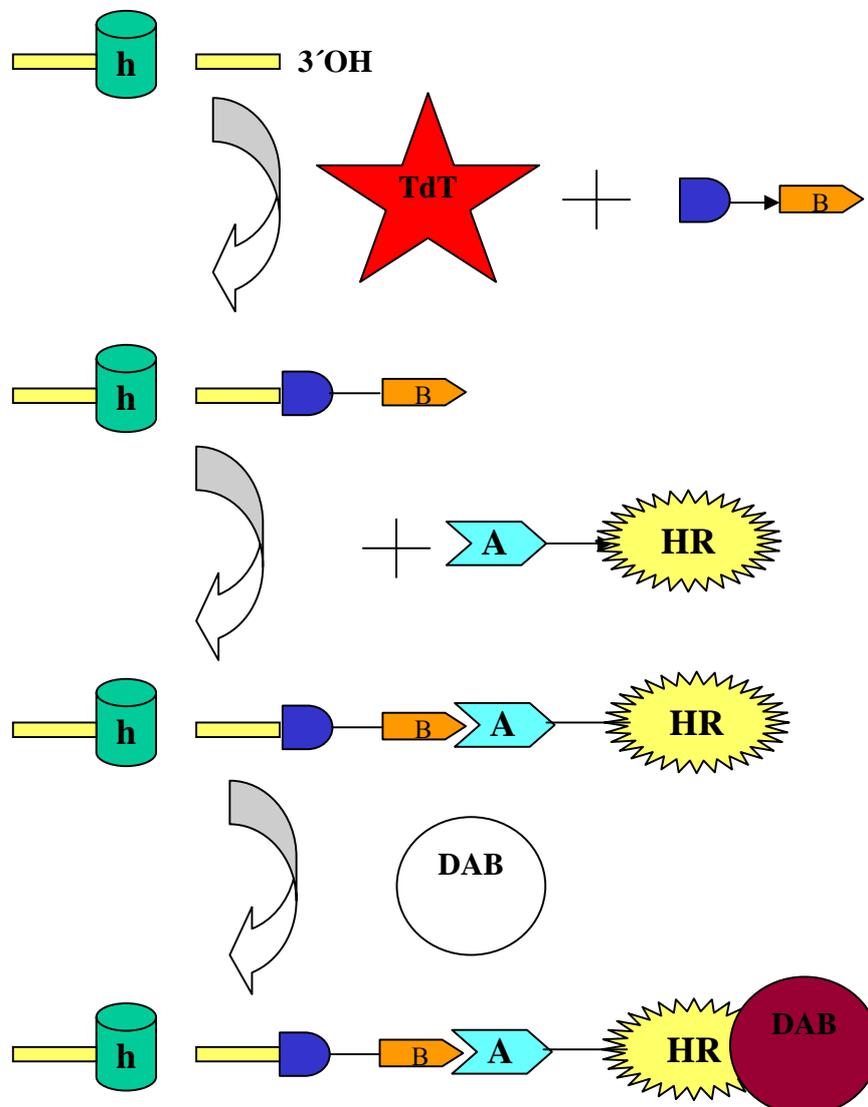


Figura M.1. Esquema de la técnica TUNEL

El kit Neuro TACS utilizado tiene algunas ventajas, como: el reactivo especial NeuroPore, que permeabiliza la membrana celular antes de empezar toda la técnica. Contiene H₂O₂ que elimina la actividad de las peroxidasas endógenas. Utiliza Streptavidina conjugada a peroxidasa (HRP), que luego va a precipitar de color marrón en presencia de diaminobenzidina (DAB). Las muestras se examinan al final con un microscopio óptico.

Otra ventaja que tiene el kit, es el reactivo TACS-Nuclease, el cual nos permitió realizar muestras Control positivas (C+). Tratando muestras controles con ésta nucleasa, la enzima va produciendo la fragmentación virtual del DNA nuclear, mimando un proceso apoptótico en todas las células. La coloración marrón de todos los núcleos celulares para éstas muestras tenía que estar presente y nos indicaban una técnica de trabajo correcta, fundamental para después interpretar de forma adecuada los resultados finales.

4.2.3.1. Reactivos

El Neuro TACS kit contiene los siguientes reactivos:

- Proteínasa K. Se prepara una solución de Proteínasa K: 1µl Proteínasa K del kit con 200µl agua bidestilada
- TdT dNTP Mix. Es una mezcla de la enzima TdT con deoxinucleotidilfosfato conjugado a la biotina
- TdT Enzyme- deoxinucleoditil terminal transferasa
- 50X Mn²⁺
- 10X TdT Labelling Buffer. Se va a utilizar una solución 1X

Se prepara de estos últimos reactivos la Solution Reaction Mix: 1µl de TdT dNTP Mix + 1µl TdT Enzyme + 1µl 50X Mn²⁺ + 1X TdT Labeling Buffer

- NeuroPore- agente de permeabilización a la membrana celular
- TACS-Nuclease – endonucleasa artificial. Se va utilizar una solución
- TACS-Nuclease Buffer

Se va a utilizar una solución preparada con: 1µl TACS-Nuclease + 50µl TACS-Nuclease Buffer para cada porta

- 10X Stop Buffer. Se va a utilizar una solución de 1X
- Streptavidin-HRP – anticuerpo antibiotina conjugado a peroxidasa

- DAB Solution –diaminobenzidina. Se va a utilizar una solución que contiene:
50µl 30% H₂O₂ + 250µl DAB + 50ml 1X PBS

El kit ABCComplex- Avidina-HRP que contiene Avidina y peroxidasa HRP

Otros reactivos adicionales utilizados:

- 30% H₂O₂
- 10X y 1X Tampón Fosfato (PBS), pH 7,4 (libre de Ca²⁺ y Mg²⁺).
Para preparar 1l de 10X PBS se utiliza: NaH₂PO₄ –3,45g; Na₂HPO₄ –10,65g;
NaCl – 86,19g
- Solución 3,7% Formaldehído
- etanol 100%, 95%, 80%, 70%
- xileno 100%
- metanol
- Entelan

4.2.3.2. Procedimiento

- a) En una primera fase se desparafiniza los cortes sumergiéndolos en los siguientes disolventes:
 - xileno ,dos veces, durante 10 minutos y 5 minutos respectivamente
 - etanol 100%, una vez, durante dos minutos
 - etanol 95%, una vez, durante 2 minutos
 - etanol 80%, una vez, durante 2 minutos
 - etanol 70%, una vez, durante 2 minutos
 - agua destilada ,una vez , 2 minutos
- b) Una vez finalizada la fase de lavados, se sumergen las portas en PBS 1X durante 10 minutos a 18-24°C.
- c) Se sacan y se ponen encima solo del corte, 50µl NeuroPore que va a permeabilizar la célula. Se cubre con un cubrecristal y se deja unos 30 minutos a 18-24°C
- d) Se saca, se limpia con agua bidestilada tres veces y se le añade 50 µl de la solución de Proteínasa K que va a digerir las membranas celulares. Se deja unos 15 min. a 37°C.
- e) Se saca y se limpia con agua bidestilada dos veces.

- f) El paso siguiente es realizar los controles positivos (C+) utilizando la endonucleasa del kit.
- g) Se limpia con agua bidestilada dos veces
- h) Se ponen los cubres en una cubeta con la mezcla de Metanol - 45 ml y 30% H₂O₂ - 5ml recientemente preparada. Se dejan unos 5 minutos máximo a la temperatura ambiente. Con éste paso se realiza la inhibición de las peroxidasas endógenas. Si se deja más tiempo se puede producir daño al nivel del DNA.
- i) Se saca y se limpia con agua bidestilada 2 veces
- j) Se ponen unos 2 minutos en una cubeta con PBS 1X
- k) Se sumergen en una cubeta con 1X TdT Labeling Buffer, durante unos 5 minutos a la temperatura ambiente.
- l) Se sacan y se le ponen encima unos 50µl de la Solución Reaction Mix. En éste paso se realiza la transferencia del nucleotidil conjugado al 3'-OH terminal del DNA apoptótico. Se deja una hora a 37°C.
- m) Se saca y se le ponen solución de 1X TdT Stop Buffer que va a interrumpir la reacción. Se deja 5 minutos a temperatura ambiente.
- n) Se lava con PBS 1X unas veces, durante unos 2 minutos cada lavado.
- o) Se añade ahora el anticuerpo antibiotina que está conjugado con peroxidasa HRP. Hemos sustituido la Streptavidina del kit con Avidina por tener una afinidad más grande a la biotina que la Streptavidina del kit. Se cubre los cortes y se dejan unos 10 minutos a la temperatura ambiente.
- p) Se limpia dos veces con PBS1X
- q) Se añade la solución de DAB-diaminobenzidina, se deja unos 5-10 minutos protegido a la luz. Por la oxidación de la benzidina aparece el color marrón en los sitios de DNA fragmentado, apoptótico.
- r) Se limpia 2 minutos con agua bidestilada a temperatura ambiente.
- s) Se pasa unos 2 minutos por una solución de hematoxilina.
- t) Se limpia con agua bidestilada 3 veces.
- u) Se deja en alcohol 70% unos 5 minutos, alcohol 90% unos 3 minutos, alcohol 100% unos 2 minutos y después en xileno 100% 5 minutos.
- v) Se pone una gota de Entelan y se cierra la preparación con un cubrecristal largo.
- w) Se examina con el microscopio de luz. Los elementos apoptóticos aparecerán en marrón. El preparado de C+ nos servirá para demostrar la eficacia de la técnica utilizada.

Para cuantificar se van a contar los núcleos apoptóticos de diez campos distintos y se va hacer una media para cada porta.

4.3. Determinación de la concentración de proteínas

En éste trabajo he utilizado para medir la concentración de las proteínas el kit "Protein Assay Kit" de la casa Sigma. Tiene como protocolo de base el método de Lowry pero modificado por Peterson (Lowry y Peterson, 1977). Al reactivo Lowry se le añade dodecilsulfato sódico, que facilita la disolución de las proteínas parcialmente insolubles y tartrato cúprico alcalino que se une a las proteínas. La concentración de las proteínas se determina por una curva de calibrado construida con una solución de 1mg/ml de proteína estándar de albúmina bovina (BSA).

4.3.1. Reactivos

El kit contiene los siguientes reactivos:

- Reactivo Lowry modificado
- Solución de deoxicolato (DOC) –1,5 mg/ml agua
- Solución de ácido tricloracético 72% (TCA)

Los últimos dos productos eliminan las interferencias con otras sustancias de tipo Tris, Sulfato de amonio, EDTA, Sucrosa, Citratos, amino ácidos, péptidos.

- Reactivo Folin-Ciocalteu
- Proteína estándar -Solución de BSA –1mg/ml

4.3.2. Procedimiento

- a) En un tubo de ensayo se ponen unos 20µl de muestra. Si es necesario se va a diluir la muestra. Las muestras utilizadas fueron: homogenados de glándula mamaria utilizados para medir la actividad enzimáticas o bien plasma.
- b) Se añade agua bidestilada hasta 1 ml. Se agita en el vortex.
- c) Se prepara un tubo como blanco, con 1 ml agua bidestilada.
- d) Se le añade 1 ml Reactivo Lowry del kit a cada tubo, se agita y se incuba unos 20 minutos en oscuridad a temperatura ambiente.

- e) Se sacan y se le añade 500µl del reactivo Folin-Ciocaltau, se agita y se incuba 30 minutos en oscuridad.
- f) Se realiza una lectura espectrofotométrica a una longitud de onda de 660nm.

4.3.3. Cálculos

Se resta a cada muestra el valor del blanco y se determinan los valores de la absorbancia para cada muestra en función de una recta patrón construida con seroalbumina bovina en cantidades comprendidas entre 0,005 y 0,18mg/ml. Siendo “V” éste resultado. La concentración final de proteínas será:

$$[\text{Conc.Prot}] \text{ en } \mu\text{g prot/ml muestra} = V \times \text{Dilución}$$

4.4. Determinación de la actividad de Xantina Oxidasa, Xantina Deshidrogenasa y Xantina OxidoReductasa

4.4.1. Determinación de la actividad de Xantina Oxidasa, Xantina Deshidrogenasa y Xantina OxidoReductasa en homogenados de glándula mamaria

Para medir la actividad enzimática de la Xantina Oxidasa (XO), Xantina Deshidrogenasa (XDH) y Xantina Oxidoreductasa (XOR) es necesario realizar homogenados con los tejidos congelados a -80°C . En el siguiente paso, después de una centrifugación previa, se pasa las muestras por unas columnas de Sephadex G25. Se va a proceder después a la medida de la actividad enzimática. El protocolo entero se realiza en el mismo día, para evitar la posible pérdida de actividad enzimática durante una posible congelación y descongelación posterior.

4.4.1.1. Protocolo para realizar homogenados de glándula mamaria

Las muestras congeladas a -80°C , se saca en nitrógeno líquido y se pesa unos 0,2g de tejido. La homogenización se realiza en frío con ultra Turrax a una velocidad de 22.000 durante unos 2 minutos utilizando 3ml de tampón para cada 0,2g de tejido. El tampón tiene la siguiente composición:

- Tampón fosfato potásico (Kpi) 50mM con un pH = 7,4.
- Una solución de fluoro fenilmetisulfonil (PMS) 0,2mM, preparada solo antes de hacer los homogenados y guardada todo el procedimiento en hielo. La solución madre se prepara a una concentración de 100mM (0,035g) disuelto en 2 ml etanol absoluto. El PMS es un inhibidor de proteasas .
- EDTA 0,1 mM
- Sacarosa 0,5mM
- Solución de dithiothreitol (DTT) 10mM. El DTT evita la oxidación de grupos sulfhidrilico, por lo que previene el paso de la forma deshidrogenasa a la oxidasa de la enzima en el homogenado.

Después de la homogenización, las muestras se centrifugan a 15.000g durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante resultado, se purifica pasándolo por las columnas de Sephadex G25.

4.4.1.2. Principio del método

Se sigue un método fluorimétrico descrito por Beckman y cols. (1989). Este método está basado en la monitorización fluorimétrica de la formación de isoxantopterina a partir de pterina. Para la determinación de la forma oxidasa se utiliza como aceptor de electrones al oxígeno. Para la determinación conjunta de la oxidasa y deshidrogenasa se utiliza el azul de metileno como aceptor de electrones.

La formación de isoxantopterina se mide fluorimétricamente a 345 nm de extinción y 390 nm de emisión.

4.4.1.3. Reactivos

- Tampón fosfato potásico (Kpi) 50mM, EDTA 0,1mM a un pH = 7,4.
- Pterina (2-amino-4-hidroxipteridina) 1 mM. Se pesan 4 mg. de pterina y se resuspenden inicialmente en 100 µl. de NaOH 1 M. Una vez disuelta se le añade agua necesaria para alcanzar una concentración de 1 mM.
- Isoxantopterina 1 mM. Se pesan 4 mg. de isoxantopterina y se resuspenden inicialmente en 100 µl. de NaOH 1 M. Una vez disuelta se le añade el agua necesaria para alcanzar una concentración de 1 mM. A partir de esta

solución de diluye hasta alcanzar una concentración de 10 μM . La concentración exacta de isoxantopterina se determina espectrofotométricamente a 336 nm., debiendo estar entre 8 y 13 μM .

- Azul de metileno 1 mM. en agua. Esta solución se puede conservar congelada.
- Alopurinol 1 mM en agua. Esta solución se realiza directamente a 1 mM. Para conseguir una perfecta disolución se ha de preparar en agitación y calentándose. Una vez disuelta se separan alícuotas que se pueden conservar congeladas.

4.4.1.4. Procedimiento

Todo el proceso se realiza con el fluorímetro termostatzado a 37 °C.

- a) En una cubeta de cuarzo 25 μl . de muestra y tampón fosfato 50 mM., EDTA 0.1 mM., pH 7,4, hasta un volumen final de 2 ml. Se sigue la emisión de fluorescencia a 345 nm. de excitación y 390 nm. de emisión durante un minuto.
- b) Luego se añaden 20 μl . de una solución de pterina 1 mM. y se sigue la emisión de fluorescencia durante 2 minutos. Esta pendiente nos indica la actividad xantina oxidasa.
- c) Se añade 20 μl . de una solución de azul de metileno 1 mM. y se sigue la emisión de fluorescencia durante dos minutos. Esta pendiente nos indica la actividad total xantina oxidoreductasa.
- d) Añadimos 20 μl . más de una solución de Alopurinol 1 mM. y se sigue la emisión de fluorescencia durante un minuto. No debe variar la fluorescencia, pues el Alopurinol inhibe tanto la xantina oxidasa como la deshidrogenasa.
- e) Después se realiza una medida puntual que se utilizará como blanco para la calibración de la isoxantopterina. Se añaden 20 μl . de una disolución de isoxantopterina 10 μM . Se realiza otra medida puntual. Obtendremos el incremento de fluorescencia debido a la isoxantopterina. La isoxantopterina se utiliza como patrón interno en esta determinación.

4.4.1.5. Cálculos

La unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de un μmol . de isoxantopterina por minuto. En el homogenado de glándula mamaria la expresamos en miliunidades por miligramo de proteína.

Para la actividad xantina oxidasa:

$$U = (\Delta F/\text{min.}) \times \frac{[\text{Isoxantopterina}] \times 0.02 \quad V_{\text{final}}}{2.08 \times 1000 \times F_{\text{isoxantopterina}} \quad V_{\text{muestra}}}$$

Siendo:

$\Delta F/\text{min.}$ es la variación de fluorescencia observada por minuto tras añadir la pterina.

[Isoxantopterina] es la concentración de isoxantopterina.

$F_{\text{isoxantopterina}}$ es el incremento inmediato de fluorescencia que se produce tras añadir la isoxantoptrina.

V_{final} es el volumen de la cubeta una vez añadida la disolución de pterina (2,02 ml.).

V_{muestra} es el volumen de muestra añadido (0,025 ml.).

Para la actividad total xantina oxidoreductasa:

$$U = (\Delta F/\text{min.}) \times \frac{[\text{Isoxantopterina}] \times 0.02 \quad V_{\text{final}}}{2.08 \times 1000 \times F_{\text{isoxantopterina}} \quad V_{\text{muestra}}}$$

Siendo:

$\Delta F/\text{min.}$ es la variación de fluorescencia observada por minuto tras añadir el azul de metileno.

[Isoxantopterina] es la concentración de isoxantopterina.

$F_{\text{isoxantopterina}}$ es el incremento inmediato de fluorescencia que se produce tras añadir la isoxantoptrina.

V_{final} es el volumen de la cubeta una vez añadida la disolución de pterina (2,04 ml.).

V_{muestra} es el volumen de muestra añadido (0,025 ml.).

Para la actividad xantina deshidrogenasa:

La actividad xantina deshidrogenasa se calcula restando la actividad xantina oxidasa a la actividad total xantina óxidoreductasa.

4.4.2. Determinación de la actividad de la Xantina Oxidasa en plasma

Para determinar la actividad de la XO en plasma he utilizado el plasma guardado a -80°C . El procedimiento es lo mismo descrito anteriormente pero utilizando $25\mu\text{l}$ de plasma. En los cálculos la expresión de la actividad enzimática se hace expresándolo por ml de plasma.

4.5. Determinación de la expresión de Xantina OxidoReductasa en homogenados de glándula mamaria

La presencia de la enzima Xantina OxidoReductasa (XOR) fue determinada utilizando el método Western blot. Técnica que permite detectar y separar las proteínas tras una electroforesis, seguida del método de Immun-Blot assay.

4.5.1. Procedimiento

En la técnica de Western blotting utilizada en éste trabajo he utilizado una electroforesis desnaturizante en sistema discontinua de PAGE-SDS.

4.5.2. Protocolo para realizar homogenados de glándula mamaria para Western blot

Del tejido congelado se rompe un fragmento aproximado de 0,2 g. Se le añade, para cada 0,2 g tejido, 3 ml de tampón de homogenización. Inmediatamente se homogeniza con la maquina ultraturax a una velocidad de 22.000, durante 2 minutos, manteniendo el vaso de homogenización en hielo. El homogenado resultante se centrifuga a 15.000G durante 30 minutos a 4°C . Los sobrenadantes se recogen y se depositan en hielo hasta el momento de su análisis, y si se congelan, debe hacerse a -80°C ., ya que a -20°C se ha observado que existe conversión de XDH a XO.

Se mide la concentración de las proteínas en cada muestra con el método Lowry descrito anteriormente.

4.5.3. Preparar los geles

Todos los pasos deben realizarse bajo una campana de extracción para compuestos orgánicos debido que todos los compuestos de trabajo son neurotóxicos.

Primero se prepara el "Running Gel" al 12% con: 3.12 ml agua + 0.058 ml SDS 10% + 1.68ml Acrilamida/Bisacrilamida (29:1) + 0.74ml TRIS-TEMED + 0.021ml APS 10%. Los componentes se añaden en éste orden de forma que el iniciador y el catalizador de polimerización se ponen al final.

Se carga las placas de electroforesis verticales preparadas a una altura adecuada unos 5-6 cm teniendo en cuenta que encima se va a poner el segundo gel, el Staking Gel. Se añade después 1ml de butanol y se tapa con parafilm para a evitar la evaporación. Se deja a polimerizar unas 1-2 horas. En éste tiempo se prepara las muestras.

El "Staking Gel" un gel al 4,5%, se prepara mezclando en orden 3,657 ml agua + 0,05 SDS 10% + 0,563 ml Acrilamida/Bisacrilamida (29:1) + 0.73ml Tris-TEMED + 0,004ml TEMED + 0,05ml APS 10%. Cuando el Running Gel está gelificado se tira el butanol, se deja que se seque unos 15 minutos y se añade el Staking Gel colocando el "peine" que va a modelar los pocillos de carga. Se dejan unos 30 minutos y se puede proceder a la carga del gel con las muestras.

4.5.4. Preparar las muestras

El sobrenadante obtenido que la centrifugación y guardado a -80°C se descongela y se calcula el volumen de muestra necesario para cargar unos 30 μl de proteínas. El doble de dicho volumen se diluye 1:1 con "SDS Sample Buffer", lo cual se calienta a 95-100 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos y se enfría rápidamente en hielo para desnaturalizar las proteínas. Se microcentrifuga durante 5 minutos para agrupar toda la muestra y de ésta se deposita en cada pocillo el volumen que contiene 30 μg . de proteínas (como lo habíamos disuelto 1:1 "SDS Sample Buffer", ahora el volumen será el doble del calculado inicialmente antes de diluirlo).

Uno de los pocillos se reservará para el marcador de peso molecular, el cual se trata como una muestra, diluyendolo 1:1 con 17 μ l. de “SDS Sample Buffer”.

La cantidad de muestra que se carga en cada pocillo es de 17 μ l.

4.5.5. Electroforesis vertical

Se cargan las muestras. El primer pocillo será con el marcador de peso.

Una vez cargados las muestras se inicia la electroforesis con el gel sumergido en “Running Buffer” a 80 mV durante una hora y media, hasta que el frente de la electroforesis se ha salido del gel, ya que las bandas que da la XOR tienen un alto peso molecular.

4.5.6. Electrotransferencia

Tras la electroforesis, se elimina el “Stacking Gel” y se sumerge el gel en “Transfer Buffer” para eliminar los restos de “Running Buffer”, de sales y detergentes generados durante la electroforesis, y para que el gel adopte su tamaño definitivo. El “Transfer Buffer” ha de estar frío a 4 °C.

Se corta una membrana de nitrocelulosa del tamaño de 8,3/6 cm y se marca con un lápiz para identificar la orientación del gel. Se moja la membrana introduciéndola lentamente con un ángulo de 45 ° en “Transfer Buffer” y se deja que se empape durante 15-30 minutos. Es importante este paso porque si la membrana se moja demasiado rápido puede atrapar burbujas de aire que pueden interferir en la transferencia. Todo este proceso se debe realizar con guantes o pinzas para evitar la contaminación de la membrana.

Se deben preparar también 2 papeles de filtro del tamaño 10/7 cm, los cuales también se deben mojar.

Antes de colocar la membrana en el “cassette” se deben mojar las láminas de fibra. Con el “cassette” abierto con su parte negra horizontal (el cátodo) se prepara el “sandwich” de transferencia. Se coloca una de las láminas de fibra mojada sobre dicha parte, luego se coloca encima uno de los papeles de filtro, mojándolo por encima con “Transfer Buffer” y pasándole cuidadosamente un rodillo para eliminar las posibles burbujas de aire. Se moja con más “Transfer Buffer” y se coloca encima el gel. Encima de éste se pone la membrana de nitrocelulosa, mojándolo más y pasando el rodillo. Se

coloca encima el otro papel de filtro, se moja y se pasa el rodillo, y por último se coloca la otra lámina de fibra que también se moja y se eliminan las burbujas.

Una vez realizado este proceso se cierra el “cassette” y se coloca en la camarilla de la electroforesis, con la parte negra de aquél en el mismo lado que la parte negra de la camarilla. Eso quiere decir: el catodo de la “cassette” al catodo de la camarilla. Se rellena la camarilla con “Transfer Buffer” frío. Todo el recipiente de electroforesis se sumerge en hielo y se inicia el paso de corriente a 100 mV. Durante 1 hora.

4.5.7. Immunoblot assay

Una vez realizada la transferencia, se extrae la membrana de nitrocelulosa y se lava con 25 ml. de TBS-T durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente se incuba con 25 ml de “Blocking Buffer” durante 1 hora a temperatura ambiente o a 4 °C durante 12 horas.

Se lava después con TBS-T tres veces cada vez unos 5 minutos.

El siguiente paso es incubar la membrana con el anticuerpo primario, en agitación, toda la noche, en la cámara fría. El anticuerpo se prepara de la siguiente manera: 10ml TBS-T con 0,5 g BSA. En éste tampón se hace una dilución 1:1000 con el anticuerpo primario. En éste caso con la antiXantina Oxidasa (5ml tampón con 5 µl Anticuerpo primario).

Se lava tres veces durante 5 minutos cada una con 15 ml de TBS-T

Se incuba la membrana con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa. Ahora se debe poner el anticuerpo secundario para el marcador de peso que conforme el kit es un anticuerpo antibiotina a una dilución de 1:1000 y un anticuerpo secundario para las muestras en una dilución de 1:2000. Así que para nuestro caso: a 7 ml de “Blocking Buffer” se le ponen 7µl de anticuerpo antibiotina y 3,5 µl de anticuerpo antirabbit para las muestras. Se deja en agitación lenta una hora a temperatura ambiente

Se lava tres veces durante 5 minutos cada una con 15 ml. de TBST.

4.5.8. Detección de proteínas

La membrana se incuba con 5 ml de Reactivo quimioluminiscente LumiGLO y peróxido disuelto en agua (0,25 ml. de Reactivo quimioluminiscente LumiGLO y 0,25 ml. de peróxido en 4,5 ml. de agua) durante 1 minuto a temperatura ambiente.

Se seca la membrana del exceso de solución, se envuelve en plástico tipo “film” y se expone a papel fotográfico durante el tiempo necesario para que se revele el éste.

Al final del trabajo se evidencia una banda de 145kDa que corresponde a la XO.

4.5.9. Striping

La solución de “Striping” viene a limpiar la membrana de transferencia de los anticuerpos primarios y secundario conjugado. Al final de ésta etapa la membrana se quedará como “nueva”. Solo con las proteínas obtenidas después de la transferencia.

Las membranas se introducen en 15-20ml de “Striping Buffer”. Se deja 5-15 minutos en agitación lenta en la temperatura ambiente. La membrana tiene que estar completamente cubierta del tampón.

Se saca y se limpia 3 veces con Wash Buffer durante 5 minutos cada lavado.

4.5.10. Western blot con el anticuerpo alfa-tubulina

Este Western Blot viene a averiguar si la cantidad de proteínas que hemos cargado para la detección de XO es la misma en todos los pocillos. Si lo es, significa que la posible diferencia de bandas obtenidas durante el proceso de Western Blot para XO es debido a un proceso supuesto al estudio y no a un fallo en la técnica de trabajo.

De nuevo se va añadir a la membrana el primer anticuerpo, que ahora es la alfa-tubulina (antimonoclonal, antiraton). Se mantiene toda la noche en frío bajo una agitación lenta.

El día siguiente se limpia y se le añade el anticuerpo secundario conjugado con HRP. Se deja que actúen 1 hora, se limpia y se detecta con el kit LumiGLO.

Se van a detectar bandas de 54kDa.

4.5.11. Cálculos

El film revelado se “escaneó” para poder analizar la densidad de las bandas con el programa TotalLab® v1.11.

4.6. Determinación de la expresión génica de fosfo-p53

Para determinar la expresión del gen P-P53 (Phospho P53 - la forma activa del gen) he utilizado el método Western Blotting

4.6.1. Reactivos

Son los mismos que los del apartado 4.5. con la diferencia que:

Tampón de extracción para realizar los homogenados:

- 10mM Tri-HCl (pH=7,5)
- 0,25M Sacarosa
- 5mM EDTA
- 50mM NaCl
- 30mM pirofosfatosódico
- 50mM sodium fluoride
- 100µM sodium ortovanato

Protease Inhibitor Cocktail

El anticuerpo primario utilizado fue el anti P-P53. Un anticuerpo monoclonal, anticonejo.

4.6.2. Procedimiento

Se sigue los mismos pasos que en el apartado 4.5. con unas pequeñas diferencias.

El tampón para homogenados es distinto.

Para realizar homogenados se rompe en trozos el tejido congelado a -80°C . Para cada 0,1 g de tejido se ponen 1ml de tampón de extracción previamente tratado con el cocktail de inhibición (5µl de proteasa para cada mililitro de tampón de extracción). Se homogeniza con el ultraturax a una velocidad de 22.000 durante uno 3 minutos. Todo el procedimiento será en frío.

Se centrifuga a 900g durante 10 minutos a 4°C . El sobrenadante se guarda a -80°C .

La cantidad de muestra cargada fue de 50µg de proteínas.

El anticuerpo primario será el de anti P-P53, antiG, anticonejo
Al final, se evidencia una banda de 53 kDa, que corresponde a la P-P53
Se realiza también un Western para alfa –tubulina para averiguar si la cantidad de proteína es la misma en todos los pocillos.

4.7. Determinar la expresión génica de MAPK-inasas implicadas en apoptosis

4.7.1. Determinar SAPK/JNK en homogenados de glándula mamaria

4.7.1.1. Principio del método

El principio es el mismo descrito en el apartado 4.5.

4.7.1.2. Reactivos

Son los mismos con los del apartado 4.5. con la diferencia que el anticuerpo utilizado es antiSAPK/JNK (*Stress-Activated Protein Kinase/Jun-terminal kinase*). Anticuerpo policlonal, anticonejo. El tampón de homogenados es el del apartado 4.5.

4.7.1.3. Procedimiento

Los pasos para seguir son los mismos con el del apartado 4.5., pero se utilizó el anticuerpo anti SAPK/JNK. Se va a detectar dos bandas: una de 46kDa y otra de 54kDa.

Se hace también un Western para alfa – tubulina para averiguar si la cantidad de proteína cargada es la misma en todos los pocillos.

4.7.2. Determinar fosfo-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) en homogenados de glándula mamaria

4.7.2.1. Principio del método

El principio es el mismo descrito en el apartado 4.5.

4.7.2.2. Reactivos

Son los mismos con los del apartado 4.5. con la diferencia que el anticuerpo utilizado es anti P-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) (AntiPhosphoStress-Activated Protein Kinase/Jun-terminal kinase). Anticuerpo policlonal, anticonejo. El tampón de homogenados es el del apartado 4.6.1.

4.7.2.3. Procedimiento

Los pasos para seguir son los mismos con el del apartado 4.5. pero se utilizó el anticuerpo anti P-SAPK/JNK. Aparecen como presencia de la proteína dos bandas: una a 46kDa y otra a 54kDa.

Se hace también un Western para alfa – tubulina para averiguar si la cantidad de proteína cargada es la misma en todos los pocillos.

4.7.3. Determinar p38 MAPK-asa en homogenados de glándula mamaria

4.7.3.1. Principio del método

El principio es el mismo descrito en el apartado 4.5.

4.7.3.2. Reactivos

Son los mismos con los de apartado 4.5. con la diferencia que el anticuerpo utilizado es anti P38 MAPK-ASA. Anticuerpo policlonal, anticonejo. El tampón de homogenados es el del apartado 4.6.1

4.7.3.3. Procedimiento

Los pasos para seguir son los mismos que los del apartado 4.5., pero se utilizó el anticuerpo anti P38MAPK-ASA. Se va detectar una banda de 43 kDa.

Se hace también un Western para alfa – Tubulina para averiguar si la cantidad de proteína cargada es la misma en todos los pocillos.

4.7.4. Determinar fosfo-p38 MAPK-asa (Thr180/Tyr182) en homogenados de glándula mamaria

4.7.4.1. Principio del método

El principio es el mismo descrito en el apartado 4.5.

4.7.4.2. Reactivos

Son los mismos con los de apartado 4.5. con la diferencia que el anticuerpo utilizado es anti P-P38 MAPK-asa (Thr180/Tyr182). Anticuerpo policlonal, anticonejo. El tampón de homogenados es el del apartado 4.6.1.

4.7.4.3. Procedimiento

Los pasos para seguir son los mismos que en el apartado 4.5. pero se utilizó el anticuerpo anti P-P38MAPK-ASA (Thr180/Tyr182). Se va detectar una banda de 43 kDa.

Se hace también un Western para alfa – tubulina para averiguar si la cantidad de proteína cargada es la misma en todos los pocillos.

4.8. Determinar la expresión genica de proteínas nitradas (3-nitrotirosina) en homogenados de glándula mamaria

4.8.1. Principio del método

El principio es el mismo descrito en el apartado 4.5.

4.8.2. Reactivos

Los reactivos son los mismos que los del apartado 4.5. con la diferencia que el anticuerpo utilizado es anti Nitrotirosina. Anticuerpo monoclonal, antiraton. Por los tanto, se ha utilizado como anticuerpo secundario un Anti IgG antiraton. El tampón de homogenados es el del apartado 4.6.1.

4.8.3. Procedimiento

Los pasos para seguir son los mismos que los del apartado 4.5. pero he cargado unos 30µg de proteínas y se utilizó el anticuerpo anti Nitrotirosina. Como anticuerpo secundario un anti IgG antiraton. Se van a detectar distintas bandas de proteínas nitradas de peso entre 10-100kDa

Se hace también un Western para alfa – Tubulina para averiguar si la cantidad de proteína cargada es la misma en todos los pocillos.

4.9. Cuantificación de los niveles de glutatión

4.9.1. En sangre

4.9.1.1. Determinación de glutatión total

El glutatión total se determina por H.P.L.C.(cromatografía líquida de alto rendimiento), siguiendo el método descrito por Reed y colaboradores (Reed y cols,1980).

4.9.1.1.1. Principio del método

El método de Reed se basa en la separación de los S-carboximetildinitro derivados por cromatografía y posterior cuantificación a 365nm. A todas las muestras se le añade una concentración conocida de γ -glutamil glutamato, como patron interno.

Es un método cromatográfico que nos permite determinar la concentración tanto de GSH como de GSSG de una misma muestra.

4.9.1.1.2. Reactivos

- Tampón PCA 7,25% ; BPDS 1,25mM
- γ -glutamil glutamato 1mM en PCA 0,3% - patron interno
- Ácido iodoacético 1M disuelto en púrpura de m-cresol 0,2mM
- Tampón KOH 3M CHES 0,3M
- 1-fluor dinitrobenceno 1% en etanol absoluto
- Mezcla metanol-agua (800:200)

4.9.1.1.3. Preparar las muestras

Las muestras de sangre obtenidas conforme el protocolo del apartado 4.1. se descolgelan y se mantienen en hielo.

4.9.1.1.4. Derivatización de las muestras

Se toman 200 μ l de sobrenadante ácido y se le añade 20 μ l de patrón interno. Seguimos añadiendo 20 μ l de ácido iodoacético 1M disuelto en púrpura de m-cresol 0,2mM, que es un indicador de pH, que vira a color púrpura entre 8,5-9.

La mezcla se lleva a pH 8,5-9 usando un tampón de KOH 3M; CHES 0,3M.

Se incuba durante unos 10 minutos en oscuridad a temperatura ambiente.

Se le añade 400 μ l de 1-fluor dinitrobenceno al 1% en etanol absoluto y se mantienen a 4°C y en oscuridad durante 24horas como mínimo. Llegado a éste punto las muestras son estables a 4 °C durante varias semanas.

Se centrifugan 15.000g durante 5 minutos a 4°C.

Se preparan las soluciones que serán inyectadas en el cromatógrafo. Se toman 50 μ l de sobrenadante y se le añade 270 μ l de una mezcla de metanol-agua.

4.9.1.1.5. Técnica cromatográfica

Se inyectan 80 μ l de la solución que contiene la muestra.

La fase móvil está constituida por 2 solventes:

- Eluyente A: es una solución de metanol al 80% en agua bidestilada
- Eluyente B: es una solución tampón acético/acetato 0,5M en metanol al 64%.

En la fase estacionaria se utiliza una columna Spherisorb aminada. Las dimensiones de la columna son de 20 x 0,46 cm. El tamaño de partícula de relleno es de 5 µm.

La detección de los dinitrofenil derivados se realiza con un detector ultravioleta visible a 365 nm.

El flujo de cromatografía es constante, a 1 ml./min.

Se realiza una elusión aplicando un gradiente. La fase móvil se mantiene durante 5 min. a un 80 % del eluyente A y 20% del B. En éste tiempo empieza a aumentar la cantidad del eluyente B de manera lineal. A los 15 minutos se alcanza un 99% de B y un 1% de A.

En estas condiciones se mantiene de 5 a 10 min., para cada solvente, hasta que se eluya el último compuesto. Posteriormente se recupera la columna a las condiciones iniciales (20% de eluyente B y 80% de eluyente A) durante 15 min.

4.9.1.1.6. Cálculos

La concentración de GSH y GSSG se calculan a base de la concentración conocida de patrón interno que se ha añadido a cada muestra.

El patrón interno utilizado, el γ -glutamil-glutamato ha sido calibrado frente a patrones de concentraciones conocidas de GSH y GSSG. Los dos patrones fueron calibrados por un método enzimático. El patrón de GSH se calibra por medio de la reacción de la glutatión transferasa y el de GSSG por medio de la reacción de la glutatión reductasa.

El glutatión total lo expresamos como equivalente de GSH, sumándole a la concentración de GSH 2 veces la de GSSG.

$$\text{Glutacion total} = [\text{GSH}] + (2X \text{ GSSG})$$

A.Cálculo de la concentración de los patrones de glutatión reducido por medio de la reacción de la glutatión transferasa.

A1.Principio del método

Para la determinación de la concentración de GSH se ha seguido el método de Brigelius (Brigelius y cols. 1983), basado en la determinación espectrofotométrica de la conjugación del GSH con el cloro 2,4-dinitrobenzeno. Esta reacción está catalizada por la glutatión-S-transferasa. El aducto formado, el 2,4-dinitrofenil-S-glutatión, presenta un máximo de absorción a 340 nm.



A2.Reactivos

- Tampón fosfato potásico, 0,1 M a pH 7,0 que contiene ácido diamino tetraacético (EDTA), 1 mM.
- 1-Cloro 2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 10 mM, disuelto en etanol al 100 %.
- Glutatión-S-transferasa (GST). Se prepara una solución de 500 U/ml en tampón fosfato potásico 0,1 M EDTA, 1 mM, pH 7,4. Esta solución se dializa durante 6 horas en tampón fosfato cambiando el tampón de diálisis cada dos horas. Una vez preparada la solución se conserva a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

A3. Procedimiento

En una microcubeta se añaden los siguientes reactivos:

- 825 μl . de fosfato potásico 0,1 M, EDTA 1 mM, pH 7,0.
- 25 μl . del sobrenadante ácido de la muestra.
- 10 μl . de la solución de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno.

Se realiza un autocero (ha de tenerse en cuenta que la absorbancia de la línea de base debe ser estable) y se dispara la reacción añadiendo 10 μl . de glutatión-S-transferasa. Se registra la variación de la absorbancia a 340 nm hasta el final de la reacción. La diferencia de absorbancia es proporcional a la cantidad de GSH existente.

A.4.Cálculos

Para calcular la concentración de GSH, se utilizó el coeficiente de absorción molar del 2,4-dinitrobenzil-S-glutatión a 340nm ($\epsilon = 9,6\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

$$[\text{PATRON GSH}] \mu\text{M./ml.} = (\Delta\text{OD}) \times \frac{V_{\text{final}}}{V_{\text{muestra}}} \times \frac{1}{9,6} \times 2$$

Siendo:

ΔOD es la variación de absorbancia observada tras añadir la transferasa.

V_{final} es el volumen de la cubeta una vez añadida la disolución de pterina (0,870 ml.).

V_{muestra} es el volumen de muestra añadido (0,025 ml.).

1/96 es el coeficiente del CDNB.

2 es la inversa de la dilución que hacemos al mezclar la sangre inmediatamente tras su extracción con el ácido.

Una vez hallada la concentración del patrón se realiza una curva con distintas concentraciones de GSH y con la misma de patrón interno (γ -glumatil-glutamato) con el fin de hallar el factor de respuesta o relación entre el γ -glutamil-glutamato (PI). y el GSH mediante la siguiente relación:

$$[\text{PATRON GSH}] = \frac{A_{\text{patron GSH}}}{A_{\text{PI}}} \times [\text{PI}] \times \text{Factor respuesta}$$

De aquí se saca el factor de respuesta:

$$\text{Fr} = \frac{[\text{PATRON GSH}] \times A_{\text{PI}}}{[\text{PI}] \times A_{\text{PATRON GSH}}}$$

Sabiendo ahora el factor de respuesta, podremos calcular posteriormente las concentraciones de GSH en las muestras supuestas al estudio.

$$[\text{GSH muestra}] = \frac{A_{\text{GSH muestras}}}{A_{\text{PI}}} \times [\text{PI}] \times \text{Fr}$$

B. Cálculo de la concentración de los patrones de glutatión oxidado por medio de la glutatión reductasa.

B1. Principio del método

Se sigue la reducción dependiente de NADPH del GSSG a GSH.



B2. Reactivos

- Tampón fosfato 0,2M con EDTA 2mM a pH 7
- NADPH 3mM disuelto en Tris-HCl 10mM, pH 7
- GSSG 20mM disuelto en agua

B3. Procedimiento

En una cubeta de añade 500µl de tampón fosfato, 50µ de NADPH disuelto, 50µl de GSSG y 350µl de agua. El volumen final será de 950 µl. Se mide la absorbancia a 340nm.

B4. Cálculos

La concentración de GSSG con la fórmula :

$$[\text{GSSG}]\text{U/ml} = (\Delta\text{OD})/\text{min} \times \frac{V_{\text{final}}}{V_{\text{muestra}}} \times \frac{1}{6,22} \times \text{factor de dilución}$$

Siendo:

ΔOD es la variación de absorbancia observada tras añadir la transferasa.

V_{final} es el volumen de la cubeta una vez añadida la disolución de pterina (0,950 ml.).

V_{muestra} es el volumen de muestra añadido (0,050 ml.).

1/6,22 es el coeficiente del GSH

Una vez hallada la concentración del patrón se realiza una curva con distintas concentraciones de GSSG y con la misma de patrón interno (γ -glumatil-glutamato) con el fin de hallar el factor de respuesta o relación entre el γ -glutamil-glutamato (PI). y el GSSG mediante la siguiente relación:

$$[\text{PATRON GSSG}] = \frac{A_{\text{patron GSH}}}{A_{\text{PI}}} \times [\text{PI}] \times \text{Factor respuesta}$$

De aquí se saca el factor de respuesta:

$$\text{Fr} = \frac{[\text{PATRON GSSG}] \times A_{\text{PI}}}{[\text{PI}] \times A_{\text{PATRON GSSG}}}$$

Sabiendo ahora el factor de respuesta, podremos calcular posteriormente las concentraciones de GSSG en las muestras supuestas al estudio.

$$[\text{GSSG muestra}] = \frac{A_{\text{GSSG muestras}}}{A_{\text{PI}}} \times [\text{PI}] \times \text{Fr}$$

4.9.1.2. Determinación del glutation oxidado (GSSG)

4.9.1.2.1. Principio del método

Para la determinación de la concentración de GSSG se ha seguido el método descrito por Asensi (Asensi y cols. 1994). Este método está basado en la separación por cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa de los dinitrofenil derivados y su posterior detección a 365 nm. Para evitar la autooxidación del GSH, se bloquean los grupos tioles con N-etilmaleimida (NEM).

4.9.1.2.2. Reactivos

- y glutamilglutamato 1 mM en PCA, 0,3 %. Es el patrón interno y debe estar calibrado previamente respecto a concentraciones conocidas de GSSG.
- KOH 3M, CHES 0,3 M.
- 1-fluoro-2,4-dinitrobenzono 1 % en etano absoluto.
- Eluyente A: es una solución de metanol al 80 %.
- Eluyente B: es una solución de acetato sódico 0,5 M en metanol al 64%. Se parte de una solución madre acético/acetato que se prepara disolviendo 272 gr. De acetato sódico trihidratado en 122 ml de agua y 372 ml de ácido

acético glacial. El eluyente B está formado por un 80% de eluyente A y un 20 % de la solución madre acético/acetato.

4.9.1.2.3. Preparar las muestras

Las muestras se prepara conforme el protocolo descrito en el apartado 4.4.

4.9.1.2.4. Derivatización de las muestras

Para derivatizar la muestras, a 0,2 ml. de sobrenadante ácido de la muestra se añaden 20 µl. del patron interno, la solución de γ glutamilglutamato 1 mM en PCA, 0,3 % y 20 µl de púrpura de m-cresol 0,2mM como indicador de pH.

Se lleva a pH 8,5-9 con KOH 3M, CHES 0,3 M.

A continuación se centrifuga a 15000 g durante 5 min a 4 °C.

Se toman 25 µl. de sobrenadante y se pasan a un tubo pequeño de vidrio (pico-tag) que contiene 50 µl. de la solución de fluorodinitrobenceno al 1 % en etanol absoluto.

Se incuba durante 45 min. a la temperatura ambiente y en oscuridad.

Una vez finalizada la incubación, se deseca a vacío hasta 70 miliTorr. Llegado a este punto, las muestras osn estables a -20 °C durante varias semanas. Antes de inyectarlo en el H. P. L. C., el precipitado se resuspende en 50 µl. de eluyente A.

4.9.1.2.5. Técnica cromatográfica

La técnica es la misma descrita en el apartado 4.9.

4.9.1.2.6. Cálculos

El calculo de la concentración de glutation oxidado en la muestras en función de la calibración de soluciones patrón de concentraciones conocidas de GSSG respecto alpatron interno, conforme el protocolo descrito en el apartado B4 del apartado 4.9.1.1.6.

La fórmula final será:

$$[\text{GSSG muestra}] = \frac{A_{\text{GSSG muestras}}}{A_{\text{GSSG patrón}}} \times [\text{PI}] \times \text{Fr}$$

A_{PI}

4.9.1.3. Determinación de glutation reducido (GSH)

La concentración del GSH de la muestra se obtiene restando del valor de Glutation total, el valor de Glutation oxidado (GSSG).

4.9.2. En homogenados de glándula mamaria

4.9.2.1. Determinación del GSH

El principio del método, los reactivos, derivatizar las muestras, técnica cromatografica, los calculos son es el mismo como para medir GSH de sangre del apartado 4.9.1.1. La que difera es el protocolo de preparar las muestras.

Reactivo para homogenados:

- Tampón ácido perclórico (PCA) al 6%, EDTA 1mM

El tejido congelado a -80°C se rompe un fragmento aproximado de 0,1 g.

Se pesa y se deposita en un mortero con poco nitrógeno. Antes de que se evapore el nitrógeno se machaca de forma que el tejido congelado se convierte en polvo.

El polvo se deposita en un vaso de homogenización junto con ácido perclórico (PCA) al 6 %, EDTA 1 mM. a razón de 1 ml. de ácido por cada 0,1 g. de tejido. Inmediatamente se homogeniza a 980 r. p. m. manteniendo el vaso de homogenización en hielo.

El homogenado resultante se centrifuga a 15.000g durante 15 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes se recogen y se depositan en hielo hasta el momento de su análisis.

4.9.2.2. Determinación de GSSG

El método tiene el mismo principio, reactivos, protocolo de derivatizar las muestras, técnica cromatografica, los calculos identicos con los de capitulo de GSSG en sangre 4.9.1.2. Que difera es el protocolo de preparar las muestras.

El proceso es similar al apartado anterior con la diferencia de que para hacer el homogenado el ácido utilizado es PCA al 6 % con BPDS 1 mM. y NEM 20 mM. Los sobrenadantes se recogen y se congelan a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su análisis.

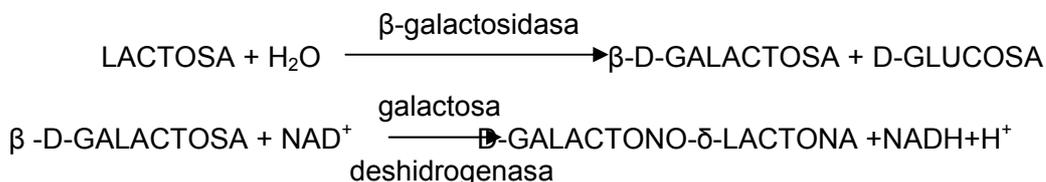
4.10. Determinación de los niveles de lactosa en glándula mamaria

4.10.1. Principio del método

Para la determinación de los niveles de lactosa en la glándula mamaria se utilizó un método enzimático acoplado descrito por Gerhart Kurz y Kurt Wallenfels (Bergmeyer, 2a ed 1974).

Este método acopla la transformación de la lactosa en β -D-Galactosa y D-glucosa catalizada por la β -D-galactosidasa con la oxidación de la β -D-galactosa catalizada por la galactosa deshidrogenasa. En ésta última reacción se genera NADH, por lo que se puede seguir el incremento de la absorbancia a 340nm debido al NADH generado y relacionarlo con los niveles de lactosa existentes en la muestra.

El principio será esquematizado así:



4.10.2. Reactivos

- Tampón fosfato potásico 0,1M pH 7,5
- NAD 15mM. Se disuelve 10mg NAD en 1 ml agua destilada
- Galactosa deshidrogenasa (25U/ml)
- β -galactosidasa (5mg proteína/ml)
- KOH 4N
- Sol. Ácido perclórico 1M

4.10.3. Procedimiento

- a) Se pesa unos 0,5 tejido congelado a -80°C . A cada g de tejido pesado se le añade unos 10ml de ácido perclórico 1M. Se hacen homogenados con ultraturax.
- b) Se centrifuga a 3000rpm unos 10 minutos a 4°C .
- c) Se recoge el sobrenadante y se ajusta el pH con KOH 4N hasta un pH 7,5. Es el pH optimo de acción de las enzimas implicadas en reacción.
- d) Una vez alcanzado el pH se centrifuga de nuevo a 3000rpm durante 2 minutos.
- e) En una macrocubeta de espectrofotómetro se ponen: 3ml de tampón fosfato potásico con 0,1 ml sol. NAD y unos 0,2 ml de sobrenadante neutro. Se mide la absorbancia y se anota con E_1 .
- f) Se añade 0,02ml de galactosa deshidrogenasa. Se mezcla y se deja que actúe unos 25 minutos. Se mide la absorbancia E_2 .
- g) Se deja otros 15 minutos y se vuelve a medir E_3 . Si $E_2 = E_3$ se sigue el protocolo si no, se espera hasta que la reacción se pare.
- h) Se añade 0,02 ml de β -galactosidasa. Se mezcla y se espera unos 30 minutos. Se mide la absorbancia y se anota con E_4 .
- i) Se deja otros 10 minutos y se vuelve a medir. Se anota con E_5 . Si E_4 no es igual al E_5 , se espera hasta que la reacción finaliza.

4.10.4. Cálculos

La concentración de la lactosa se calcula aplicando la fórmula:

$$[\text{LACTOSA}] \text{ mg/ml} = (E_5 - E_3) \times 0,919$$

El resultado final se expresa por gramo de tejido. Por tanto el valor obtenido se va a expresar en función del peso de tejido homogenizado en cada muestra.

4.11. Aislamiento de mitocondrias de glandula mamaria

4.11.1 Reactivos

Los reactivos necesarios para el aislamiento de mitocondrias están representados en la siguiente Tabla M1:

REACTIVO	CANTIDADES
Sacarosa	89g
EGTA	0,0768g
MOPS	0,209
BSA	0,200g
KH ₂ PO ₄	0,136g
H ₂ O	c.s.p 200ml
pH	7,4

Tabla M1. Composición del tampón para el aislamiento de mitocondrias

El ajuste de pH se realiza con KOH al 20%.

4.11.2 Procedimiento

1. Una vez aislada la glándula mamaria se coloca en una placa Petri que contenga
 - 1) NaCl al 0,9% a 4°C y se trocea. Se pasa a otra placa con las mismas condiciones y se realizan varios lavados para eliminar toda la sangre. A continuación, el tejido troceado y lavado se coloca sobre un papel secante para eliminar el exceso de líquido y después se pesa.
2. Una vez seco y pesado, se coloca en un homogenizador de vidrio introducido en hielo y se añade tampón de aislamiento (que figura en la tabla precedente) 2ml

- por cada gramo de tejido; se procede a la homogenización del tejido, a una velocidad de 980 rpm.
3. El homogenado se dispone en uno o varios tubos de centrifuga y se realiza una centrifugación a 1000g 10 minutos y a 4°C. Se recoge el sobrenadante en otro tubo y el precipitado se resuspende en 3 ml de tampón. Se centrifuga nuevamente a 1000g durante 10 minutos a 4°C. Se desecha el precipitado y este sobrenadante y el obtenido anteriormente se recogen disponiéndolos en uno o varios tubos.
 4. Los sobrenadantes obtenidos en el paso anterior se someten a una centrifugación a 10.000g durante 10 minutos y a 4°C. A continuación, el precipitado obtenido se resuspende en 3 ml de tampón y se vuelve a centrifugar a la misma velocidad y temperatura, volviéndose a desecha el sobrenadante y a resuspender el precipitado con 3 ml de tampón.
 5. Llegado este punto, el precipitado convenientemente resuspendido, se pasa a un tubo de centrifuga del cual conocamos su peso, y se realiza un último paso de centrifugación a 10.000g durante 10 minutos y a 4°C. Se desecha el sobrenadante y el peso del precipitado se calcula por diferencia de pesos entre el tubo con el precipitado y el peso del tubo vacío.
 6. Finalmente, el precipitado se resuspende bien a razón de 2µl de tampón de aislamiento por cada mg de peso del precipitado o bien a razón de 20 µl de tampón para la determinación de peróxidos por cada mg de peso del precipitado, obteniendo de este modo una suspensión mitocondrial.

4.12. Determinación de la tasa de producción de peróxido de hidrógeno

4.12.1. Principio

El método utilizado es una modificación del publicado por Barja (Barja, 1998). Se mide la producción de peróxido de hidrógeno siguiendo la reacción catalizada por la peroxidasa entre el ácido homovanílico (ácido 4-hidroxi-3-metilfenilacético) y el peróxido de hidrógeno, reacción que da lugar a la formación de un dímero que emite fluorescencia a una longitud de onda de 420nm cuando es excitado por un haz de luz de una longitud de onda de 312nm. Las mitocondrias se incuban en estado 4, que es cuando la producción de peróxidos es máxima.

Las mitocondrias se incuban con los correspondientes sustratos. Se añaden piruvato 5mM y malato 2,5mM como sustrato del complejo I, mientras que como sustrato del complejo II se le añade succinato 10mM. Para cada sustrato ensayado, se realizan determinaciones por duplicado de la cantidad de dímero H₂O₂-ácido homovanílico a los 5, 10 y 15 minutos.

4.12.2. Reactivos

Para la determinación de peróxidos necesitamos la solución tamponada de la Tabla M2.:

REACTIVOS	CANTIDADES
EGTA	0.1 mM
KH ₂ PO ₄	5mM
MgCl ₂	3mM
KCl	145mM
HEPES	30mM
H ₂ O	c.s.p. 200ml

Tabla M2. Composición del tampón peroxidosis

4.12.3. Procedimiento

4.12.3.1. Producción de peróxido de hidrógeno utilizando como dador de equivalentes reductores succinato

- 1) Se prepara 6 tubos (preferiblemente de vidrio para uso en centrifuga), conteniendo cada uno de ellos 5µl de peroxidasa de rábano 6U/ml, 20µl de succinato 0,1M pH 7,4 preparado en el mismo tampón, y 1455 µl del tampón. La solución tampón se burbujea con aire con una pipeta Pasteur durante 5 minutos, antes de añadirlo a los tubos.

- 2) A continuación, se añade a cada tubo 500 µl de la suspensión mitocondrial y se inician las incubaciones (a 37°C y en agitación) que serán de 5, 10 y 15 minutos. Antes de añadir la suspensión mitocondrial debe tenerse la precaución de tener, tanto en la suspensión mitocondrial como los tubos con los reactivos, a 37°C durante 5 minutos.
- 3) La reacción se para añadiendo 1000 µl de solución glicina-EDTA (la composición se indica en la Tabla M3) y sumergiendo rápidamente los tubos en hielo.
- 4) Una vez terminadas las incubaciones, se centrifugan los tubos a 13.000g durante 15 minutos a 4 °C y se recogen los sobrenadantes. Se mide la fluorescencia de los sobrenadantes obtenidos en una macrocubeta ($\lambda_{exc} = 312\text{nm}$, $\lambda_{em} = 420\text{nm}$)

REACTIVO	CANTIDADES
GLICINA	2 mM
EDTA	50mM
NaOH	2.2mM
H ₂ O	c.s.p.50ml

Tabla M3. Composición de la solución glicina-EDTA para detener la reacción.

4.12.3.2. Producción de peróxido de hidrógeno utilizando como dador de equivalentes reductores piruvato y malato

Se produce de igual modo que en el caso anterior, con la salvedad de los reactivos que deben ponerse en cada tubo, que son los siguientes: 5 µl de peroxidasa de rábano, 20 µl de ácido homovanílico, 20 µl de piruvato sódico 50mM en tampón para la determinación de peróxidos, 20 µl de malato 25mM a pH 7,4 preparado en el mismo tampón y 1435 µl del tampón.

4.12.4. Cálculos

La fluorescencia emitida por los sobrenadantes se valora frente a una recta patrón construida con peróxido de hidrógeno en presencia de ácido homovanílico y peroxidasa. La recta patrón se realiza añadiendo a una misma cantidad de ácido homovanílico, distintas cantidades de peróxido de hidrógeno, como se indica en la tabla M.4.

Tabla M4. Reactivos utilizados para la realización de la recta patrón del nivel de peróxidos

TUBO	PEROXIDASA (μ l)	AC. HOMOVANILICO (μ l)	TAMPÓN PERÓXIDOS (μ l)	H ₂ O ₂ (nmol/ml)
1	5	20	1975	0
2	5	20	1975	1.0
3	5	20	1975	1.5
4	5	20	1975	2.0

Para realizar la determinación fluorimétrica, se añaden los reactivos que indica la tabla adjunta a los tubos, y a continuación se añaden 1000 μ l de tampón glicina-EDTA a cada uno de los tubos y a partir de ese momento se procede igual que con las muestras.

Los patrones de H₂O₂ se realizan a partir de una solución comercial de peróxido de hidrógeno al 33,3%p/v. Primero se realiza una dilución 1/10³ del peróxido de hidrógeno comercial en el mismo tampón que utilizamos para las muestras, y a partir de ésta se obtiene una dilución 1/10⁵ de la comercial (también en este tampón). Esta será la solución que se utilizará para realizar los patrones de H₂O₂

Para calcular con exactitud la concentración de la solución comercial de peróxido de hidrógeno debe medirse la absorbancia de la dilución 1/10³ a una longitud de onda de 230nm(A₂₃₀) y utilizando el coeficiente de extinción molar del H₂O₂ a esa longitud de onda (72,4mM⁻¹ x cm⁻¹), y mediante la siguiente ecuación, puede conocerse la concentración de H₂O₂ en cada tubo de la recta patrón:

$$\frac{A_{230} \times \mu\text{l H}_2\text{O}_2 \times 10^4}{\epsilon \text{ H}_2\text{O}_2 \times 1000 \mu\text{l}} = \text{nmol H}_2\text{O}_2 / \text{ml}$$

4.13. Extracción de proteínas nucleares a partir de la glándula mamaria

4.13.1. Principio

Para llevar a cabo la valoración de la activación de NF-κB en la glándula mamaria, es necesaria la obtención de extractos de proteína nuclear.

4.13.2. Procedimiento

- a) Se parte de fragmentos de glándula mamaria de 100 mg., a los que se le añaden 35 mL de Tampón 1 (10mM Hepes pH 7.5; 10 mM MgCl₂; 5mM KCl; 0,1 mM EDTA; 0,1% Triton X-100; 1 mM DTT; 0,1 mM PMSF; 2 μg/mL Aprotinina; 2 μg/mL Leupeptina (Blough y cols., 1999).
- b) El tejido se desmenuza minuciosamente y se transfiere a un Falcon de 50 mL donde se homogeniza utilizando un Ultra Turrax T25 Polytron (Janke and Knukel, Germany) a velocidad media durante 45 segundos.
- c) Se centrifuga durante 5 minutos a 3.000 xg y a 4°C.
- d) El precipitado se resuspende en 500-1000 μL de Tampón 2 (20mM Hepes pH 7.9; 25% Glicerol; 500mM NaCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,2 mM EDTA; 0,5 mM DTT; 0,2 mM PMSF; 2 μg/mL Aprotinina; 2 μg/mL Leupeptina)
- e) Incubar en hielo la mezcla durante 30 minutos agitando de forma intermitente la suspensión.
- f) Centrifugar durante 10 minutos a 12.000 xg.
- g) Pasar el sobrenadante a una unidad (4mL Ultrafree Filter Unit. Millipore) y añadir un volumen idéntico de Tampón 3 (20mM Hepes pH 7.9; 10% Glicerol; 40mM NaCl; 2 mM MgCl₂; 0,5 mM DTT; 0,2 mM PMSF; 2 μg/mL Aprotinina; 2 μg/mL Leupeptina)

- h) Centrifugar durante 60 minutos a 12.000 xg y a 4°C (el volumen normalmente desciende en un 30%)
- i) Añadir 500-1000 μ L de Tampón 3 y se centrifuga de nuevo durante 60 minutos a 12.000 xg y a 4°C.
- j) El sobrenadante que contiene extractos proteicos nucleares es almacenado a – 80°C hasta su valoración y utilización.

4.13.3. Cuantificación

En los extractos nucleares los valores de concentración de proteínas fueron obtenidos por el método de Bradford (Bradford, 1976). Para ello se preparan diluciones 1/400 de los extractos para un volumen final de 800 μ L de agua. A este volumen se le añaden 200 μ L de colorante de Bradford (Biorad, USA). Los valores de absorbancia, a una longitud de onda de 595, son interpolados en una curva patrón previamente obtenida mediante dilución seriada de BSA de concentración inicial conocida. Con ello podemos conocer el valor de concentración en proteínas de la muestra original.

4.14. Medir actividad del factor de transcripcion NF- κ B (subunidad p65)

4.14.1. Principio

El kit TransAM NF- κ B p65 que lo estamos utilizando contiene una placa con 96 pocillos en cual esta inmobilizado el oligonucleótido que contiene el sitio de reconocimiento para el NF- κ B (5'-GGACTTTCC-3'). Las muestras si tienen al NF- κ B se unen de forma específica al oligonucleótido. Después, se utiliza un anticuerpo primario que reconoce al epitopo p65 del NF- κ B que es accesible solo cuando el NF- κ B está activado y fijado al DNA. Añadiendo el anticuerpo secundario, que tiene conjugado al HRP, se produce el efecto colorimétrico cuantificable espectrofotométricamente.

4.14.2. Procedimiento

- a) Se prepara el “ Complete Lysis Buffer”

5µl DTT 1M + 10 µl Protease Inhibitor Cocktail/ml Lysis Buffer AM2

- b) Se prepara el "Complete Binding Buffer"
2 µl DTT1M + 10 µl Herring sperm DNA (1 µg/ µl)/ml Binding Buffer AM3
- c) Se prepara el "Washing Buffer" (WB)
Se prepara una solución de 1X WB AM2 de la solución 10X que la tiene el kit
- d) Se prepara el "Antibody Binding Buffer" 1X de una solución 10X que la tiene el kit.
- e) Se preparan las soluciones para la curva estándar de 0 mg/ µl, 0,008; 0,0156; 0,0312; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5mg/ µl
- f) En la placa se sitúa el extracto nuclear de glándula mamaria, un control positivo y el blanco en un volumen de 10 µg de extracto nuclear, 2,5 µg del extracto nuclear de Jurkat para el control positivo en un volumen total de 20 µl de "Complete Lysis Buffer".
- g) Se deja 1 hora a la temperatura ambiente, la placa cubierta por folio adhesivo, protegido de la luz.
- h) Se limpia 3 veces con 200 µl de WB1X.
- i) Se añade 100 µl del anticuerpo NFκB diluido (1:1000 en antibody Binding Buffer 1X) en cada pocillo
- j) Se incuba tapado en la temperatura ambiente 1 hora sin agitación.
- k) Se limpia 3 veces con 200 µl WB1X
- l) Se añade 100 µl de anticuerpo secundario conjugado con HRP (diluido 1:1000 en 1X "Antibody Binding Buffer")
- m) Se incuba tapado a temperatura ambiente 1 hora sin agitación.
- n) Durante la incubación de la placa se atempera la solución de revelado.
- o) Se limpia 4 veces con 200 µl WB1X
- p) A temperatura ambiente se añade 100 µl "Sol. Developing"
- q) Se incuba la placa unos 2-10 minutos protegida de la luz. El control positivo y las muestras que tengan al NFκB activo se van a colorear de azul.
- r) Se añade 100 µl de "Stop Solution". En el medio ácido de esta solución el color azul se convierte en amarillo.
- s) Se lee la absorbancia en un espectrofotómetro durante 5 minutos a 450nm.
- t) Los valores de la cubeta estándar nos permite cuantificar de forma cuantitativa la fracción p65 del NFκB

4.15. Determinación de citocromo c en mitocondrias

4.15.1. Principio del método

El principio es el mismo descrito en el apartado 4.5.

4.15.2. Reactivos

Son los mismos que los del apartado 4.5. con la diferencia que el anticuerpo utilizado es anti citocromo c. Anticuerpo policlonal, anticonejo. El tampón de homogenados es el del apartado 4.6.2.

4.15.3. Procedimiento

Los pasos para seguir son los mismos que los del apartado 4.5., pero se utilizó el anticuerpo anti citocromo c. Se va detectar una banda de 15 kDa.

4.16. Análisis estadístico de los resultados

Todos los resultados presentados en esta tesis se expresan como valores de la media y la desviación típica, indicando el número de observaciones.

El tratamiento estadístico de los resultados obtenidos, al tratarse de más de dos grupos y con un nº de observaciones menor de 30, ha sido realizado utilizando pruebas no paramétricas para muestras independientes. Se realizó mediante dos pasos. En primer lugar se estudiaba si había algún grupo experimental que presentaba diferencias estadísticamente significativas con la prueba H de Kruskal-Wallis, y en caso de demostrarse diferencia por parte de alguno de los grupos, se utilizaba la prueba U de Mann-Whitney. Se compararon los grupos considerando dos niveles de significación: uno cuando $p < 0,05$ y otro cuando $p < 0,01$.

RESULTADOS

RESULTADOS

I. XANTINA OXIDASA Y APOPTOSIS

1. XOR fuente de radicales libres en la glándula mamaria de rata

El papel de los radicales libres, tanto de oxígeno como de nitrógeno en el proceso apoptótico representa un tema de interés hoy en día.

Nuestro grupo ha publicado en el año 1999 (Esteve, Momo et al. 1999), que el estrés oxidativo precede el proceso apoptótico utilizando un modelo *in vitro* y otro *in vivo* de glándula mamaria. Demostramos que los niveles de GSSG aumentaban en las primeras 6 horas tras el destete, tanto en fibroblastos como en el tejido mamario; mientras que el GSH disminuía. Todo el proceso del estrés oxidativo está correlacionado con un daño al nivel del DNA mitocondrial. El proceso de apoptosis en la glándula mamaria se hace evidente empezando con las 12 h tras el destete, teniendo un máximo a las 24h.

Lo que no está claro es cuál es la fuente de los radicales libres responsables de la muerte celular por apoptosis en la glándula mamaria durante su involución fisiológica. Por lo tanto, nos proponemos estudiar a la XOR como una posible fuente de estrés oxidativo en el proceso apoptótico.

1.1. Presencia de la XOR en la glándula mamaria

El primer paso fue demostrar su presencia en el tejido de glándula mamaria de rata. Para esto utilizamos homogenados de tejidos controles (que corresponden al día 14 de lactancia equivalente al pico de lactancia y por lo tanto de la madurez morfológica de la glándula) y también en muestras de tejido en involución tras 6h, 12h, 24h y 48h tras el destete.

Con la técnica de Western blot evidenciamos la presencia del monómero de la forma oxidada-XO (150kDa) y como control de carga utilizamos la alfa tubulina. Como la **Figura R.1.** demuestra la enzima se hace presente en todos los tejidos sin ningún cambio densitométrico como se observa en la **Figura R.2.**

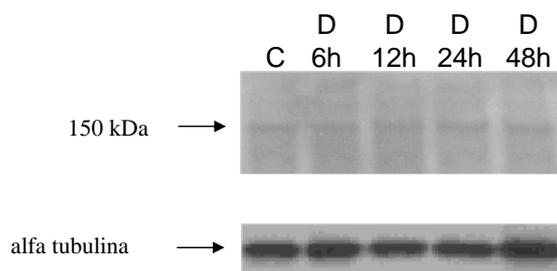


Figura R.1. Western Blot de Xantina Oxidasa en homogenados de glándula mamaria

La ilustración es una imagen representativa de Western blots realizados con homogenados de glándula mamaria en lactancia día 14, considerado como control (C) y en involución fisiológica, tras el destete a 6 horas (D6h), 12horas (D12h), 24horas (D24h) y 48horas (D48h).

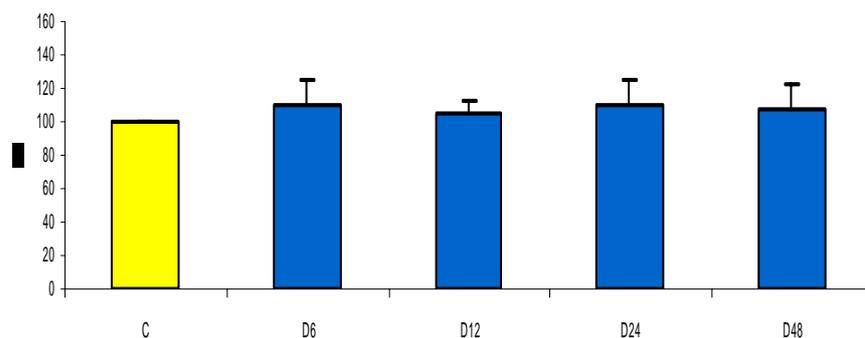


Figura R.2. Densitometria del Western blot de Xantina Oxidasa en homogenados de glándula mamaria

- La representación es:
Grafica para muestras de homogenados de glándula mamaria controles para n=7. Su valor fue considerado como 100% de intensidad de banda.
- Grafica para muestras de homogenados de glándula mamaria en involución fisiológica, tras el destete a 6 horas (D6 n=6), 12horas (D12 n=6), 24horas (D24 n=7) y 48horas (D48 n=9).

1.2. Actividad de la XOR en la glándula mamaria

La actividad de la enzima XOR la medimos tanto para la forma dehidrogenasa (XDH) como para la forma oxidasa (XO).

La actividad de la forma XDH aumenta significativamente, un 194% tras el destete, en comparación con el tejido lactante control considerado al cual consideramos como el 100% de actividad, los resultados se muestran en la **Figura R.3**.

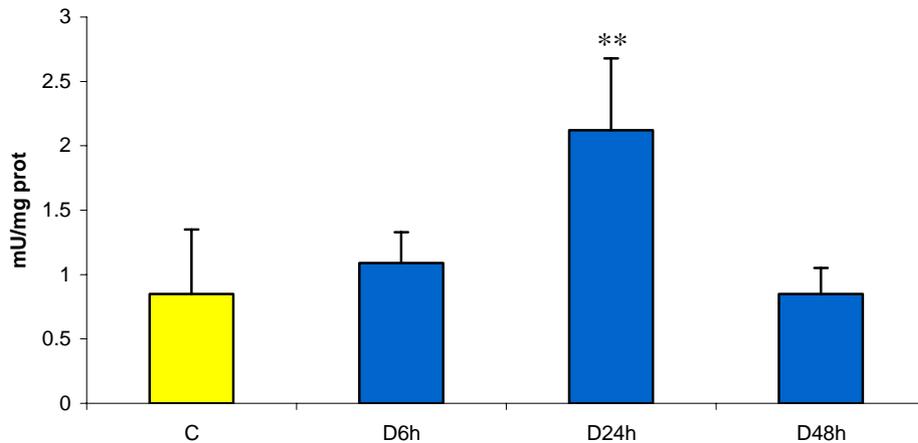


Figura R.3. Actividad de la Xantina Dehidrogenasa (XDH) en homogenados de glándula mamaria

- Representa las muestras de homogenados de glándula mamaria controles para una desviación estándar +/- correspondiente a $n=7$.
- Representa las muestras de homogenados de glándula mamaria en involución fisiológica, tras el destete a 6 horas (D6h), 24 horas (D24h) y 48 horas (D48h). Los valores se expresan como media +/- desviación estándar correspondiente a $n=4-9$. La significación estadística se expresa como (**) $p < 0.01$ frente al grupo control

La XO es la forma de la XOR que tras el destete aumenta de forma significativa a las 6 horas, teniendo un pico de actividad a las 24 horas tras quitar las crías. La **Figura R.4** demuestra el aumento de unas 2 veces a las 6 h y unas 3,3 veces a 24h del destete.

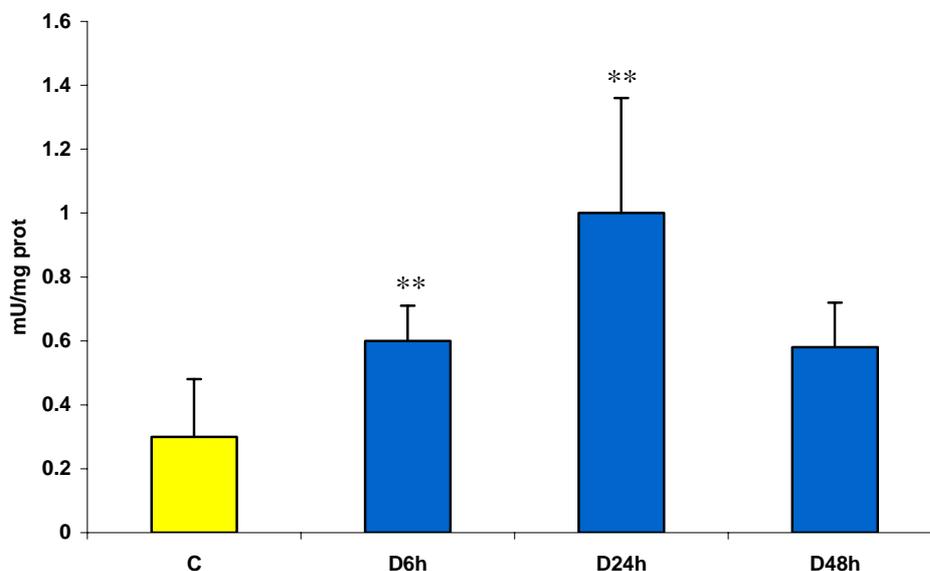


Figura R.4. Actividad de la Xantina Oxidasa (XO) en homogenados de glándula mamaria

- Representa las muestras de homogenados de glándula mamaria controles para una desviación estándar +/- correspondiente a $n=7$.
- Representa las muestras de homogenados de glándula mamaria en involución fisiológica, tras el destete a 6 horas (D6h), 24horas (D24h) y 48horas (D48h). Los valores se expresan como media +/- desviación estándar correspondiente a $n=4-9$. La significación estadística se expresa como (**) $p<0.01$ frente al grupo control

2. Concentración de lactosa tras el destete en la glándula mamaria

Se sabe que la XO se encuentra en una cantidad importante en la leche. Como estamos comparando la expresión y la actividad de la enzima en la glándula mamaria en su fase de lactancia y de involución, el siguiente paso fue eliminar la posibilidad de que lo que estamos midiendo es la XOR de la leche. Por ello medimos los niveles de lactosa en la muestras. El resultado es la **Figura R.5**.

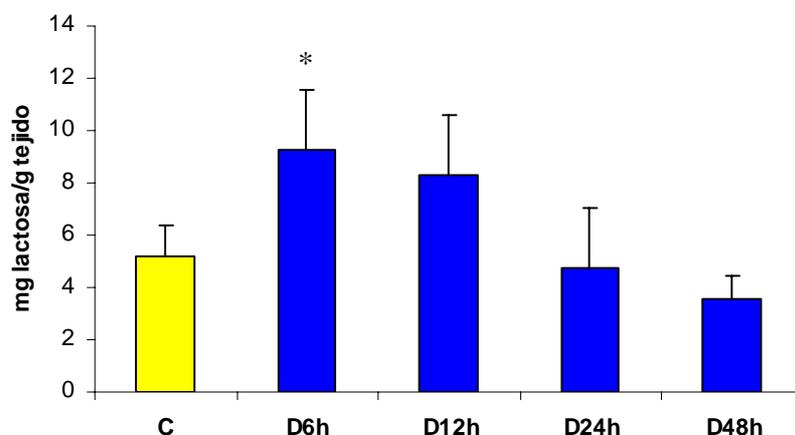


Figura R.5. Concentración de lactosa en homogenados de glándula mamaria

- Representa las muestras de homogenados de glándula mamaria controles para una desviación estándar +/- correspondiente a $n=3$.
- Representa las muestras de homogenados de glándula mamaria en involución fisiológica, tras el destete a 6 horas (D6h), 12 horas (D12h), 24 horas (D24h) y 48 horas (D48h). Los valores se expresan como media +/- desviación estándar correspondiente a $n=3$. La significación estadística se expresa como (*) $p<0.05$.

Se observa como la concentración de la lactosa aumento a las 6 horas tras el destete debido a la acumulación de la leche en la glándula mamaria, pero después va disminuyendo y la concentración reviene al normal 24 y 48 horas tras el destete justo cuando la actividad de la XOR es máximo, lo que quiere decir que la que actúa durante la apoptosis es la XOR del tejido glandular,

3. Proteínas nitradas tras el destete en la glándula mamaria

Como la XOR representa una fuente de radicales libres de nitrógeno, el paso siguiente fue mostrar la presencia de posibles proteínas nitradas. Para ello he utilizado la técnica Western blot en homogenados controles y a 6,12, 24, 48 horas tras el destete. La **Figura R.6.** muestra el aspecto de las proteínas nitradas. Como control de carga se utilizó la alfa-tubulina.

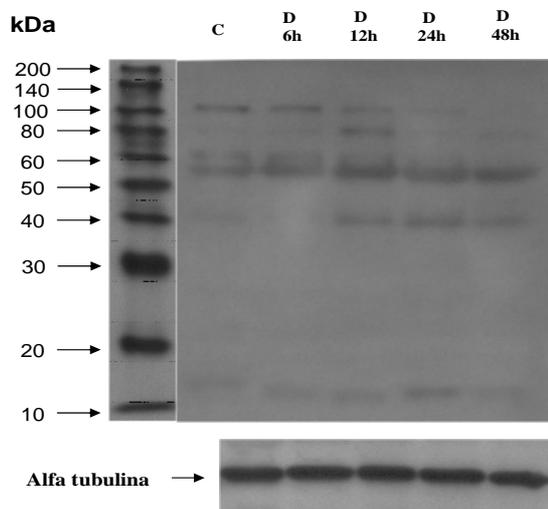


Figura R.6. Western blot de proteínas nitradas en homogenados de glándula mamaria

La ilustración es una imagen representativa de las de Western blot realizados con homogenados de glándula mamaria en lactancia día 14, considerado como control (C) y en involución fisiológica, tras el destete a 6 horas (D6h), 12horas (D12h), 24horas (D24h) y 48horas (D48h).

Realizando la densitometría del Western blot se observa un aumento significativo en la nitración de las proteínas de bajo peso molecular, con un pico a las 24h del destete, así como la **Figura R.7.** demuestra.

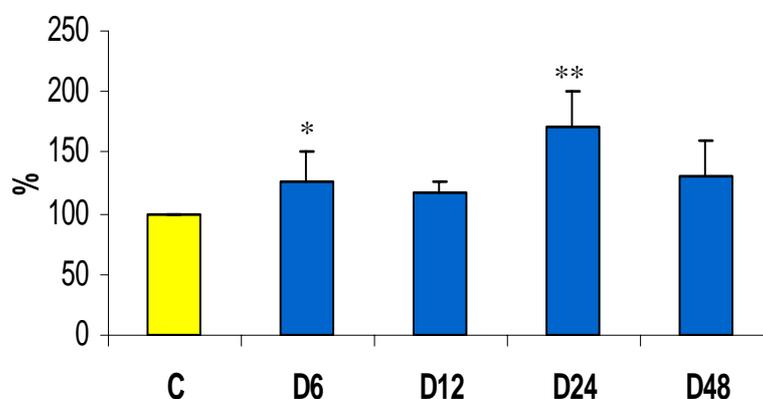


Figura R.7. Densitometria del Western blot de proteínas nitradas en homogenados de glándula mamaria

La representación es:

- Grafica para muestras de homogenados de glándula mamaria controle para $n=4$. Su valor fue considerado como 100% de intensidad de banda.
- Grafica para muestras de homogenados de glándula mamaria en involución fisiológica, tras el destete a 6 horas (D6 $n=4$), 12 horas (D12 $n=4$), 24 horas (D24 $n=4$) y 48 horas (D48 $n=4$).

4. Marcadores del estrés oxidativo en la glándula mamaria

Determinamos la concentración de GSH, GSSG y calculamos el cociente (GSSG/GSH) x100 en homogenados de glándula mamaria en las muestras: controles y tras el destete a 24 y 48 horas correspondiente a la actividad máxima de la enzima XOR. Los resultados se demuestran en la **Tabla R.1.**:

Tabla R.1. Comparación de los niveles de GSSG (nmol/g tejido), GSH (nmol/g tejido) y del cociente GSSG/GSH x100 entre las muestras de glándula mamaria controles, 24 y 48 horas tras el destete

Resultados

GRUPO	GSSG (nmol/g tejido)	GSH (nmol/g tejido)	GSSG/GSH*100
Control	21.20 +/- 15.46	1646.56 +/- 728.13	1.28 +/- 1.9
Destete 24h	41.04 +/- 13.24*	468.22 +/- 288.39 *	8.76 +/- 9.26 *
Destete 48h	59.73 +/- 37.03*	519.57 +/- 284.07*	11.49 +/- 5.08 **

Los valores se expresan como media +/- desviación estándar $n=8$. La significación estadística se expresa como (*) $p<0.05$ y (**) $p<0.01$ frente al grupo control.

Los resultados de la Tabla 1 nos permiten generar una representación gráfica los valores (**Figura R.8A.**) y confirmar que existe una disminución significativa en los valores de glutatión reducido tras el destete. El GSH disminuye en 71,57% a las primeras 24 horas y en 68,45 % a las 48 horas tras quitar las crías.

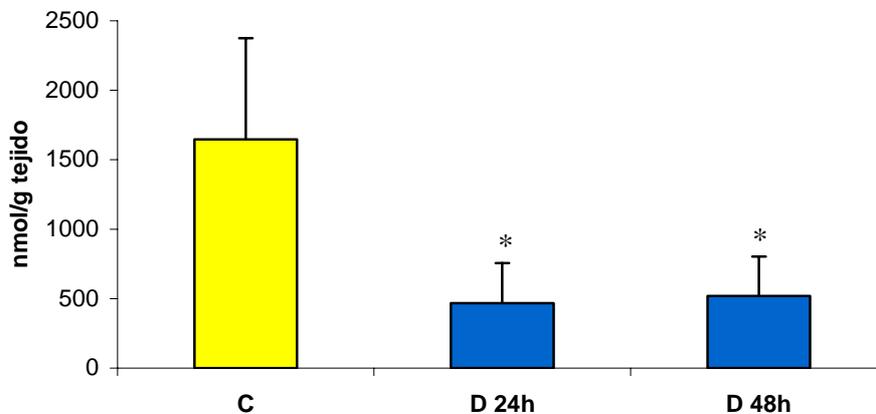


Figura R.8A. Niveles de GSH en homogenados de glándula mamaria

- Representa los valores controles para una desviación estándar +/- correspondiente a $n=8$.
- Representa los valores de las muestras de homogenados de glándula mamaria en destete a 24horas (D24h) y 48horas (D48h). Los valores se expresan como media +/- desviación estándar correspondiente a $n=8$. La significación estadística se expresa como (*) $p<0.05$ frente al grupo control

La **Figura R.8B.** muestra el aumento significativo de los niveles de GSSG con un 93,58% a las 24 horas de destete y 181,74% a las 48 horas.

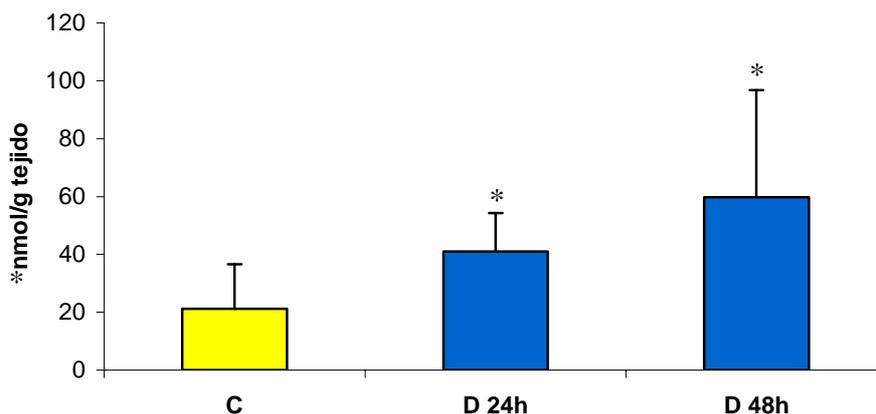


Figura R.8B. Niveles de GSSG en homogenados de glándula mamaria

- Representa los valores controles para una desviación estándar +/- correspondiente a n=8.
- Representa los valores de las muestras de homogenados de glándula mamaria en destete a 24horas (D24h) y 48horas (D48h). Los valores se expresan como media +/- desviación estándar correspondiente a n=8. La significación estadística se expresa como (*) $p < 0.05$ frente al grupo control

Si representamos el cociente $GSSG/GSH \times 100$ uno de los mejores indicadores de estrés oxidativo (**Figura R.8C.**), se puede observar un aumento significativo a las 24 y 48 horas del destete.

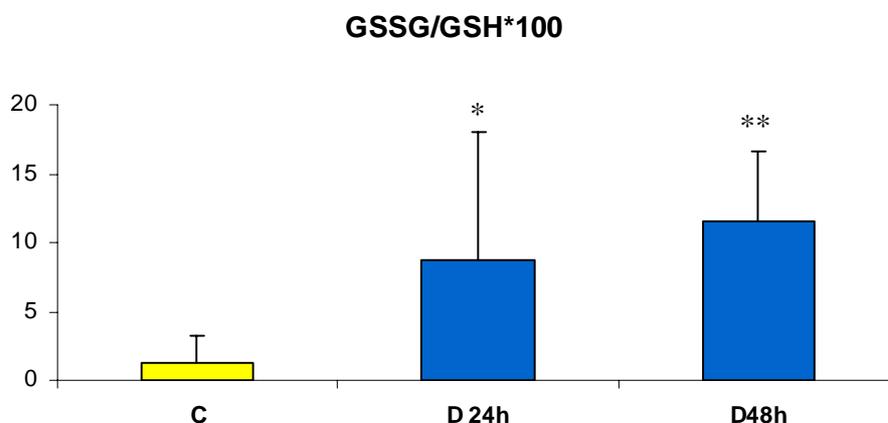


Figura R.8C. Cociente GSSG/GSH*100 en homogenados de glándula mamaria

- Representa los valores controles para una desviación estándar +/- correspondiente a n=8.
- Representa los valores de las muestras de homogenados de glándula mamaria en destete a 24horas (D24h) y 48horas (D48h). Los valores se expresan como media +/- desviación estándar correspondiente a n=8. La significación estadística se expresa como (*) $p < 0.05$ y (**) $p < 0.01$ frente al grupo control

El estudio de estos valores claramente indica que el aumento del cociente GSSG/GSH se debe fundamentalmente al descenso de la concentración tisular de GSH, y al incremento de la forma oxidada del glutati6n.

5. Estudio del efecto de la administraci6n del alopurinol sobre la XOR y al estado redox en la gl6ndula mamaria de rata

Una vez demostrado el aumento de la actividad XOR tras el destete en la gl6ndula mamaria de rata decidimos poner a prueba la importancia fisiol6gica de dicha activaci6n enzim6tica en el proceso de involuci6n de la gl6ndula. Para ello utilizamos el conocido inhibidor de la Xantina Oxidasa, alopurinol, un f6rmaco que se utiliza habitual en cl6nica para el tratamiento de la gota. El primer paso fue encontrar la dosis y la v6a adecuada de administrar el alopurinol para inhibir la actividad de la enzima XOR.

5.1. Efecto del alopurinol sobre la actividad de la XOR

Con una dosis de 0,43mg (+/- 0,16) de alopurinol/g peso rata p.o. y 0,48mg alopurinol /g pero de rata i.p, se consiguió disminuir, de forma significativa, la actividad enzimática en los homogenados de glándula mamaria, como la **Figura R.9.** demuestra. La actividad de la forma XDH (**Figura R.9A**) disminuye un 89,91% a las 6 horas y un 67,93% a las 24 horas tras el destete.

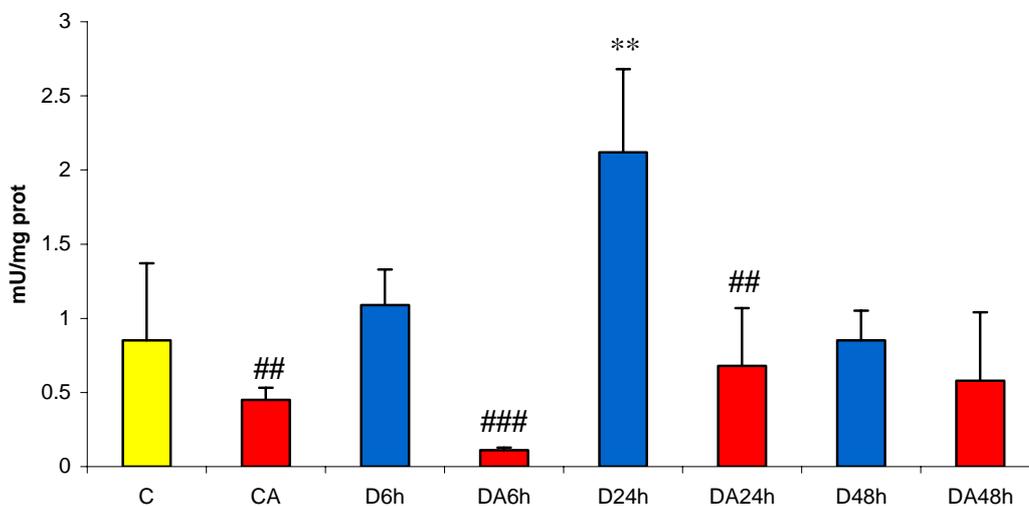


Figura R.9A Actividad de la Xantina Dehidrogenasa (XDH) en homogenados de glándula mamaria con y sin alopurinol

- Representa las muestras de homogenados de glándula mamaria controles para una desviación estándar +/- correspondiente a n=8.
- Representa las muestras de homogenados de glándula mamaria en involución fisiológica, tras el destete a 6 horas (D6h), 24horas (D24h) y 48horas (D48h). Los valores se expresan como media +/- desviación estándar correspondiente a n=4-9. La significación estadística se expresa como (**) p<0.01 frente al grupo control
- Representa las muestras con alopurinol de homogenados de glándula mamaria en involución fisiológica, tras el destete a 6 horas (DA6h), 24horas (DA24h) y 48horas (DA48h). Los valores se expresan como media +/- desviación estándar correspondiente a n=4-6. La significación estadística se expresa como (##) p<0.01 y (###) p<0.001 frente a las muestras correspondientes sin alopurinol

La actividad de la forma XO baja un 92,60% a las 6 horas tras el destete, un 74% a las 24horas y un 39,65% a las 48 horas. (**Figura R.9B**).

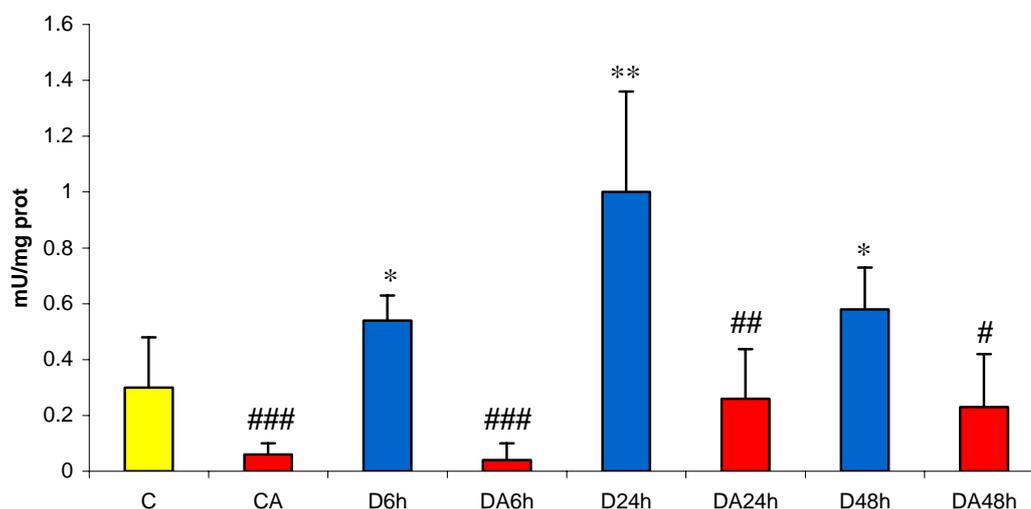


Figura R.9B Actividad de la Xantina Oxidasa (XO) en homogenados de glándula mamaria con y sin alopurinol

- Representa las muestras de homogenados de glándula mamaria controles para una desviación estándar +/- correspondiente a n=8.
- Representa las muestras de homogenados de glándula mamaria en involución fisiológica, tras el destete a 6 horas (D6h), 24horas (D24h) y 48horas (D48h). Los valores se expresan como media +/- desviación estándar correspondiente a n=4-9. La significación estadística se expresa como (*) p<0.05 y (**) p<0.01 frente al grupo control.
- Representa las muestras con alopurinol de homogenados de glándula mamaria en involución fisiológica, tras el destete a 6 horas (DA6h), 24horas (DA24h) y 48horas (DA48h). Los valores se expresan como media +/- desviación estándar correspondiente a n=4-6. La significación estadística se expresa como (#) p<0.05, (##) p<0.01 y (###) p<0.001 frente a las muestras correspondientes sin alopurinol.

El efecto inhibitor es evidente también en muestras de plasma de sangre venosa, conforme la **Figura R.10**. demuestra.

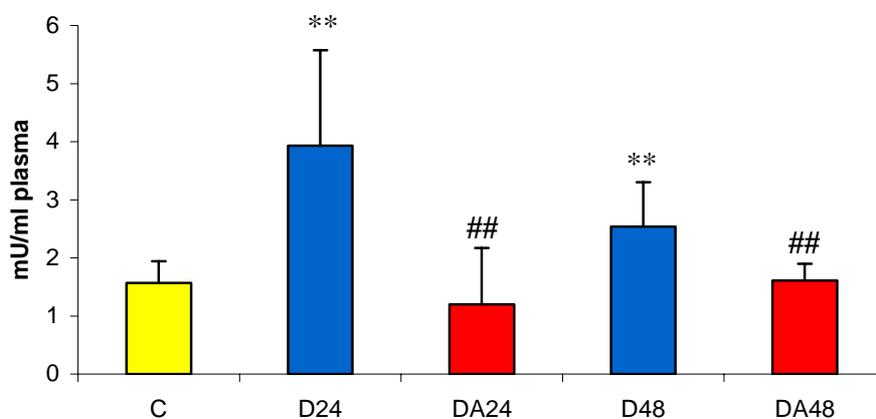


Figura R.10. Actividad de la Xantina Oxidasa (XO) en plasma de ratas, antes y después de la administración del alopurinol

- Representa las muestras de plasma en ratas controles para una desviación estándar +/- correspondiente a n=8.
- Representa las muestras de plasma sin alopurinol en ratas, tras el destete a 6 horas (D6h), 12 horas (D12h), 24horas (D24h), 48horas (D48h) y 72horas (D72h). Los valores se expresan como media +/- desviación estándar correspondiente a n=8, (**) p<0.01 frente a las muestras controles
- Representa las muestras de plasma con alopurinol en ratas tras el destete a 6 horas (DA6h), 12horas (DA12h), 24horas (DA24h), 48horas (DA48h) y 72horas (DA72h). Los valores se expresan como media +/- desviación estándar correspondiente a n=8. La significación estadística se expresa como (##) p<0.01 frente a las muestras correspondientes sin alopurinol

5.2. Efecto del alopurinol sobre la expresión de la XO

Realizando un Western blot de homogenados de glándula mamaria controles, en destete con y sin alopurinol, se observa como la administración del fármaco no cambia la expresión de la proteína XO tal y como se observa en la **Figura R.11**.

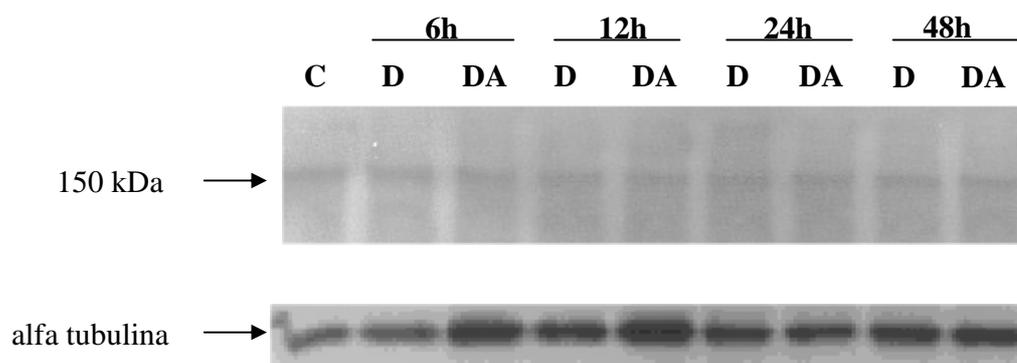


Figura R.11. Western blot de Xantina Oxidasa en homogenados de glándula mamaria con y sin alogopurinol

La ilustración es una imagen representativa de las de Western blots realizados con homogenados de glándula mamaria en lactancia día 14, considerado como control (C) y en involución fisiológica, tras el destete sin(D) y con alogopurinol (DA) a las 6,12,24,48 horas

La densitometría **Figura R.12.** confirma la imagen del Western blot. No existe ningún cambio significativo en la expresión de la proteína tras la administración del fármaco.

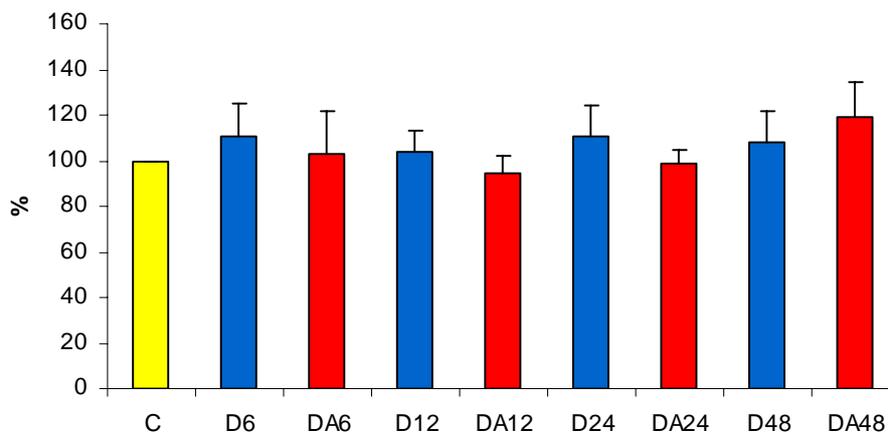


Figura R.12. Densitometria del Western blot de Xantina Oxidasa en homogenados de glándula mamaria sin y con alopurinol

La representación es:

- *Grafica para muestras de homogenados de glándula mamaria controles para n=4. Su valor fue considerado como 100% de intensidad de banda.*
- *Grafica para muestras sin alopurinol de homogenados de glándula mamaria en involución fisiológica, tras el destete a 6 horas (D6), 12horas (D12), 24horas (D24) y 48horas (D48) para n=4.*
- *Grafica para muestras con alopurinol de homogenados de glándula mamaria en involución fisiológica, tras el destete a 6 horas(DA6), 12horas (DA12), 24horas (DA24) y 48horas (DA48) para n=4.*

5.3. Efecto del alopurinol sobre el estado redox en la glándula mamaria

Para mostrar el efecto del alopurinol sobre la glándula mamaria tras el destete en comparación con el pico de la lactancia en el día 14, volvemos a medir los niveles de GSH, GSSG y el cociente $GSSG/GSH \cdot 100$. Las **Figura R.13A, B y C** muestran que el alopurinol disminuye el estado redox del tejido de forma significativa.

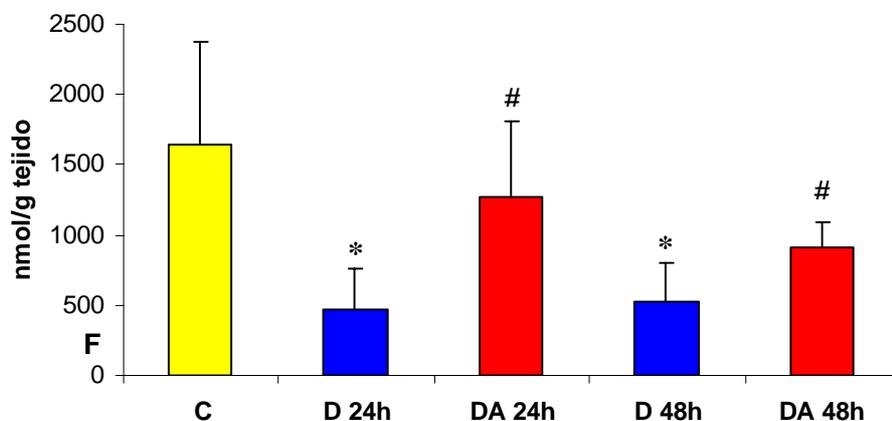


Figura R.13A. Niveles de GSH en homogenados de glándula mamaria con y sin alopurinol

- Representa las muestras en ratas controles para una desviación estándar +/- correspondiente a $n=8$.
- Representa las muestras de homogenados de glándula mamaria en destete a 24horas (D24h) y 48horas (D48h) sin alopurinol. Los valores se expresan como media +/- desviación estándar correspondiente a $n=8$. La significación estadística se expresa como (*) $p<0.05$ frente al grupo control.
- Representa las muestras de homogenados de glándula mamaria en destete a 24horas (DA24h) y 48horas (DA48h) con alopurinol. Los valores se expresan como media +/- desviación estándar correspondiente a $n=8$. La significación estadística se expresa como (#) $p<0.05$ frente al grupo control.

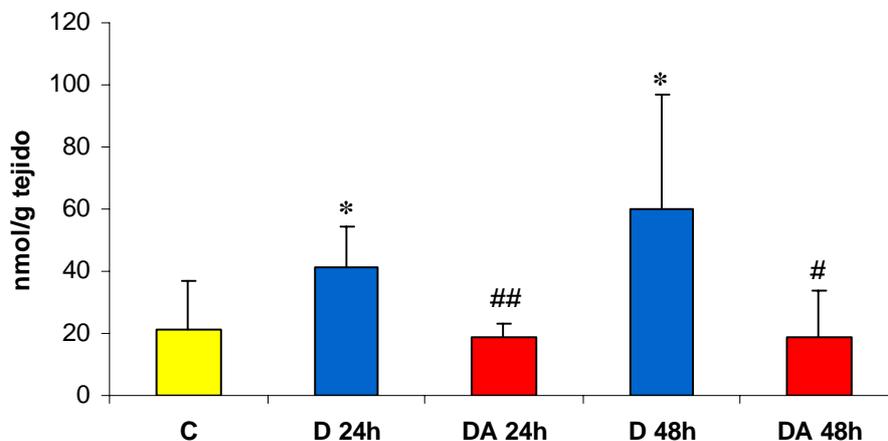


Figura R.13B Niveles de GSSG en homogenados de glándula mamaria con y sin alopurinol

- Representa las muestras en ratas controles para una desviación estándar +/- correspondiente a $n=8$.
- Representa las muestras de homogenados de glándula mamaria en destete a 24horas (D24h) y 48horas (D48h) sin alopurinol. Los valores se expresan como media +/- desviación estándar correspondiente a $n=8$. La significación estadística se expresa como (*) $p<0.05$ frente al grupo control.
- Representa las muestras de homogenados de glándula mamaria en destete a 24horas (DA24h) y 48horas (DA48h) con alopurinol. Los valores se expresan como media +/- desviación estándar correspondiente a $n=8$. La significación estadística se expresa como (#) $p<0.05$ y (##) $p<0.01$ frente al grupo control.

La representación grafica del cociente GSSG/GSH es la siguiente:

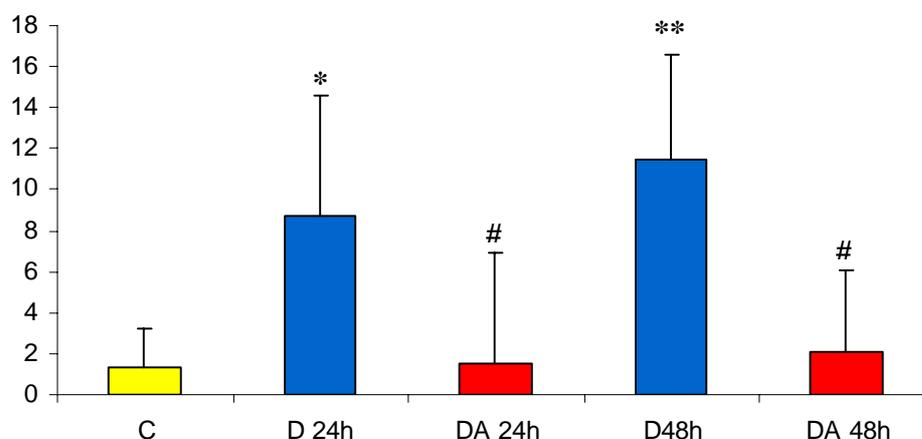


Figura R.13C. Cociente GSSSG/GSH*100 en homogenados de glándula mamaria con y sin alopurinol

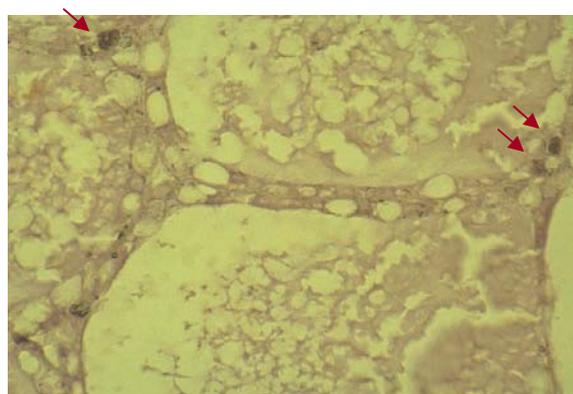
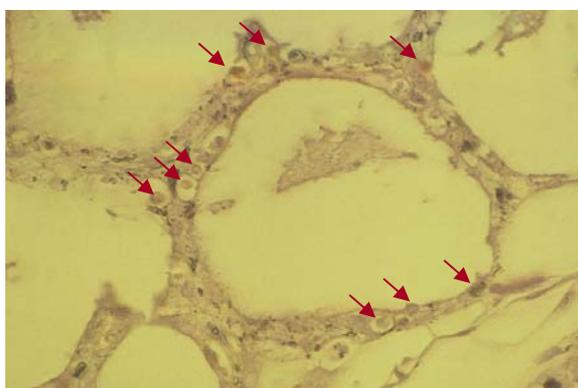
- Representa las muestras en ratas controles para una desviación estándar +/- correspondiente a n=8.
- Representa las muestras de homogenados de glándula mamaria en destete a 24horas (D24h) y 48horas (D48h) sin alopurinol. Los valores se expresan como media +/- desviación estándar correspondiente a n=8. La significación estadística se expresa como (*) $p < 0.05$ y (**) $p < 0.01$ frente al grupo control.
- Representa las muestras de homogenados de glándula mamaria en destete a 24horas (DA24h) y 48horas (DA48h) con alopurinol. Los valores se expresan como media +/- desviación estándar correspondiente a n=8. La significación estadística se expresa como (#) $p < 0.05$ frente al grupo control.

6. El efecto de la XOR sobre la apoptosis en la glándula mamaria de rata

Desde los experimentos previos del grupo, publicados anteriormente, sabemos que la apoptosis se hace morfológicamente evidenciable a las 12horas tras el destete y que tiene un máximo a las 24horas. Por lo tanto, pensamos que si la XOR tiene algo que ver con la apoptosis, la administración del alopurinol (con cual he conseguido disminuir la actividad de la enzima), debería inducir un descenso en los cambios morfológicos y en el daño nuclear celular inducido por el destete.

6.1. Efecto del alopurinol sobre el aspecto morfológico de la glándula mamaria en destete

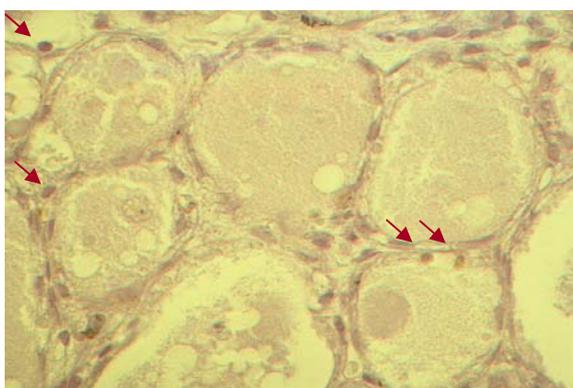
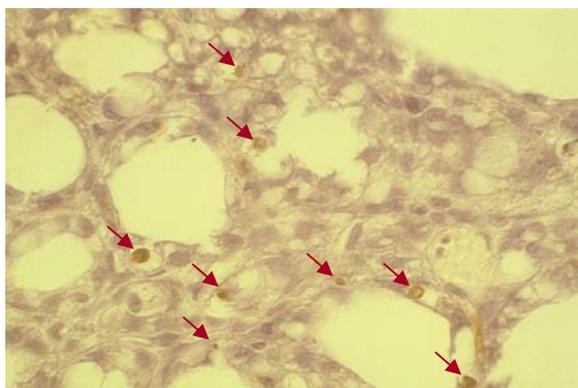
Utilizando la técnica TUNEL que nos permite visualizar las células y los cuerpos apoptóticos, comparamos las imágenes microscópicas de glándula mamaria sin y con alopurinol, en los tiempos 24 y 48 horas tras el destete, que corresponden a un máximo de la actividad enzimática de la XO. Como la **Figura R.14.** muestra, se observa una disminución en el número de células apoptóticas después de administrar el fármaco, de 66% a las 24 horas tras el destete **(A)**, y de 63,64% a las 48 horas **(B)** tras el destete.



1. Glándula mamaria sin alopurinol

2. Glándula mamaria con alopurinol

Figura R.14A. Imágenes microscópicas de glándula mamaria a las 24 horas tras el destete. Las flechas indican las células apoptóticas.



3. Glándula mamaria sin alopurinol

4. Glándula mamaria con alopurinol

Figura R.14B. Imágenes microscópicas de glándula mamaria a las 48 horas tras el

destete. Las flechas indican las células apoptóticas.

6.2. Efecto del alopurinol sobre la fragmentación del DNA nuclear en la glándula mamaria en destete

La fragmentación del DNA nuclear que define el proceso apoptótico, se realiza debido a la activación de unas endonucleasas activadas en las primeras fases del proceso apoptótico. Estas enzimas cortan el DNA en distintos pares de bases y va a dar el aspecto electroforético de “escalera apoptótica” correspondiente a fragmentos de 180-200pb o múltiplos de este valor. Al realizar la electroforesis en un gel de agarosa se observa una disminución en la digestión del DNA en los tejidos con alopurinol, tal y como la **Figura R.15.** muestra.

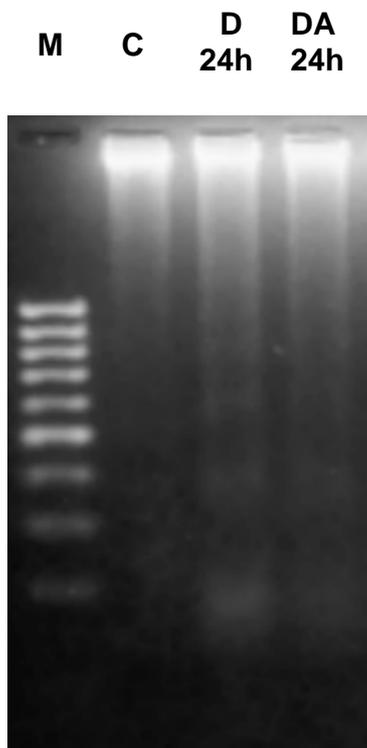


Figura R.15. Electroforesis del DNA glándula mamaria en gel de agarosa

Por lo tanto el perfil electroforético se correlaciona con el morfológico y muestra que la XO tiene un papel en el proceso apoptótico de la glándula mamaria de rata tras el destete.

7. Mecanismo de acción de la XOR sobre la apoptosis en la glándula mamaria de rata

El mecanismo del proceso apoptótico es muy amplio y todavía insuficientemente estudiado. Bastante claras son las vías extrínseca e intrínseca de desarrollo del proceso, nosotros nos propusimos estudiar algunos pasos claves de dichas vías. Utilizando un modelo *in vivo*, la glándula mamaria de rata, a diferencia de la mayoría de estudios realizados hasta la fecha que utilizan líneas celulares en cultivo.

Una de las vías de inducción de señales intracelulares mediadas por estrés oxidativo más estudiadas en la actualidad es las vías de la activación de las MAPKs. Por lo tanto nuestro primer paso en este sentido fue establecer si la XO tiene algún papel sobre las kinasas implicadas en el proceso apoptótico como es la JNK y la p38. Después, y correlacionado con dicha cascada de kinasas está el factor NF κ B, el cual puede jugar un papel pro o antiapoptótico en función de las condiciones y del tipo celular estudiado. Seguidamente estudiamos el papel de otro factor nuclear, esta vez un supresor tumoral, el p53. Esta proteína es clave en la decisión celular hacia la supervivencia o la muerte por apoptosis frente a un estímulo de estrés oxidativo que pueda producir un daño a nivel del DNA.

7.1. Efecto de la XO sobre la expresión de las kinasas JNK y p38 en el proceso apoptótico en la glándula mamaria de rata tras el destete

La kinasa JNK se hace presente en los Western blots realizados con los homogenados de glándula mamaria, tanto en los controles como en los distintos tiempos del destete (**Figura R.16A**) En las muestras con alopurinol no se observa ningún cambio en la intensidad de banda. Las densitometrías realizadas para la banda de 54kDa y 46kDa, confirma la ausencia de cambios significativos (**Figura R.16B**) bajo las distintas condiciones experimentales estudiadas. Lo cual demuestra que la cantidad de kinasa no cambia a lo largo del proceso de destete con respecto a las glándulas mamarias que no involucran y además la administración del inhibidor selectivo de la XO no produce ningún cambio sobre la expresión de dicha proteína.

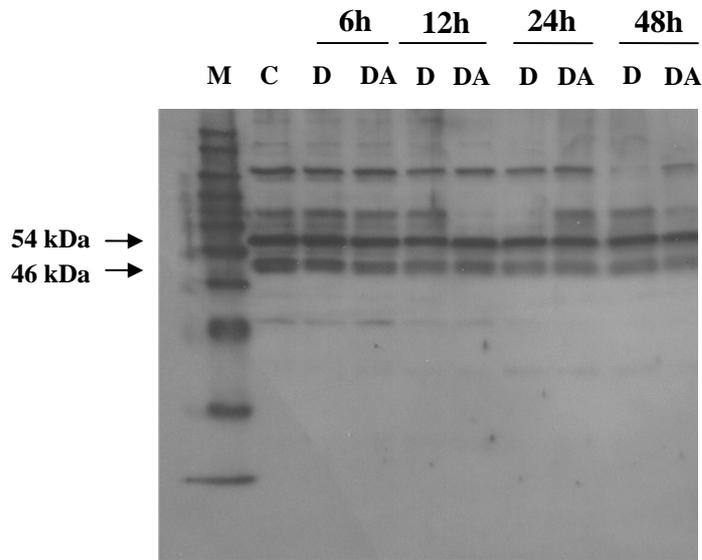


Figura R.16A. Western blot de JNK en homogenados de glándula mamaria con y sin alopurinol

La ilustración es una imagen representativa de las de Western blot realizados con homogenados de glándula mamaria en lactancia día 14, considerado como control (C) y en involución fisiológica, tras el destete a 6, 12, 24 y 48 horas sin alopurinol (D) y con alopurinol (DA). Los valores se expresan como media \pm desviación estándar correspondiente a $n=3$.

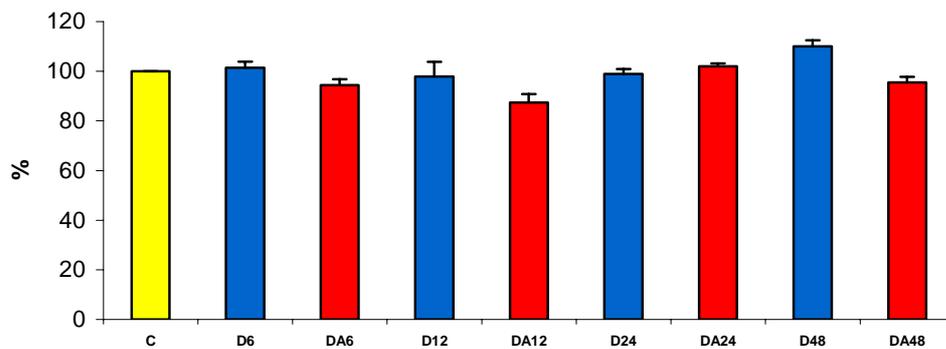


Figura R.16B. Densitometría de la banda 54kDa de JNK en homogenados de glándula mamaria con y sin alopurinol

La ilustración es una imagen representativa de las de Western blots realizadas con homogenados de glándula mamaria en lactancia día 14, considerado como control (C) y en involución fisiológica, tras el destete sin (D) y con alopurinol (DA) a las 6, 12, 24, 48 horas para un número de 3 experimentos distintos.

La forma activa de la JNK es la fosforilada, por lo tanto y ante la ausencia de cambios en la expresión de JNK decidimos estudiar su forma activa. Utilizando un anticuerpo anti-P-JNK. Los resultados expuestos en la figura 16 demuestran como se produce una temprana activación tras el destete de la forma fosforilada de JNK. Se observa como la kinasa JNK se activa a los 6 y 12 horas tras el destete y desaparece después (**Figura R.17A**). La administración del alopurinol no tiene ningún efecto sobre su activación así como la densitometría la demuestra (**Figura R.17B**). Por lo tanto la XO no tiene ningún efecto en la activación del JNK en la apoptosis de la glándula mamaria tras el destete. Recordemos que la inducción de la actividad XO tras el destete tenía lugar fundamentalmente a las 24 horas es decir después del incremento de la forma activa de JNK.

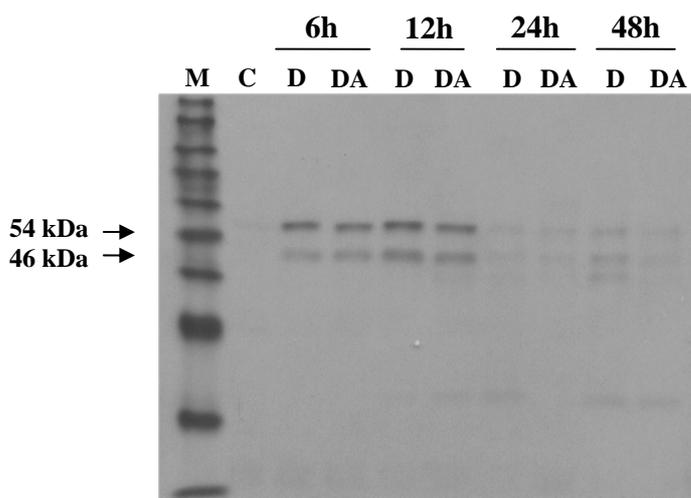


Figura R.17A Western blot de P-JNK en homogenados de glándula mamaria con y sin alopurinol

La ilustración es una imagen representativa de las de Western blot realizados con homogenados de glándula mamaria en lactancia día 14, considerado como control (C) y en involución fisiológica, tras el destete a 6, 12, 24 y 48 horas sin alopurinol (D) y con alopurinol (DA). Los valores se expresan como media \pm desviación estándar correspondiente a $n=3$.

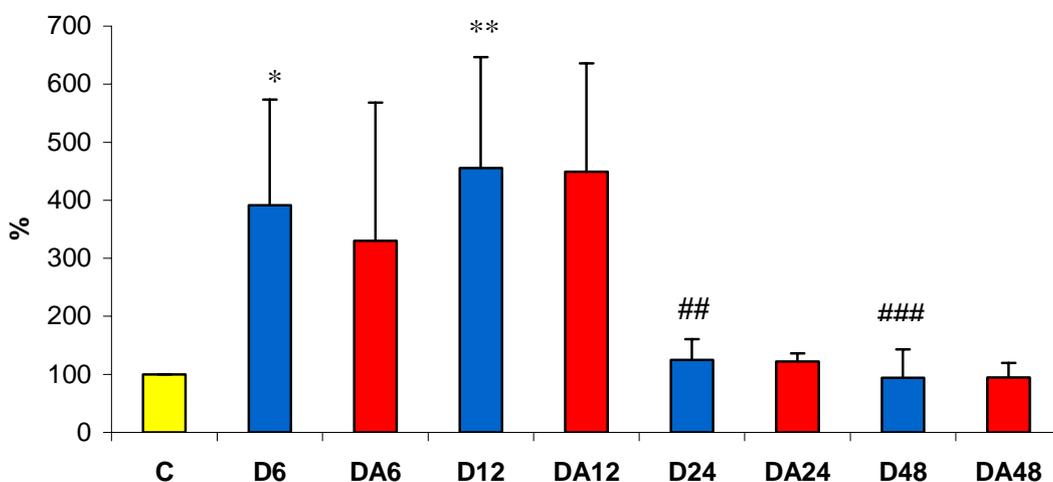


Figura R.17B Densitometría de la banda 54kDa del P-JNK en homogenados de glándula mamaria con y sin alopurinol

La ilustración es una imagen representativa de las de Western blots realizadas con homogenados de glándula mamaria en lactancia día 14 considerado como control ■ y en involución fisiológica, tras el destete sin(D) ■ y con alopurinol (DA) ■ a las 6, 12, 24, 48 horas para un número de 3 experimentos distintos. La significación estadística se expresa como () $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.001$ frente al grupo control, (##) $p < 0.01$, (###) $p < 0.001$ frente al grupo D12h.*

La otra MAPK a la cual se le atribuye un papel importante en apoptosis es la p38. Realizando el Western blot de la forma fosforilada de esta kinasa (**Figura R.18A.**) se observa como la banda se hace visible tras 48 de destete y que la administración del alopurinol disminuye de forma significativa su presencia. Por lo tanto la XO actúa sobre el p38 en las fases finales de la apoptosis. La densitometría nos ayuda a cuantificar este efecto (**Figura R.18B.**).

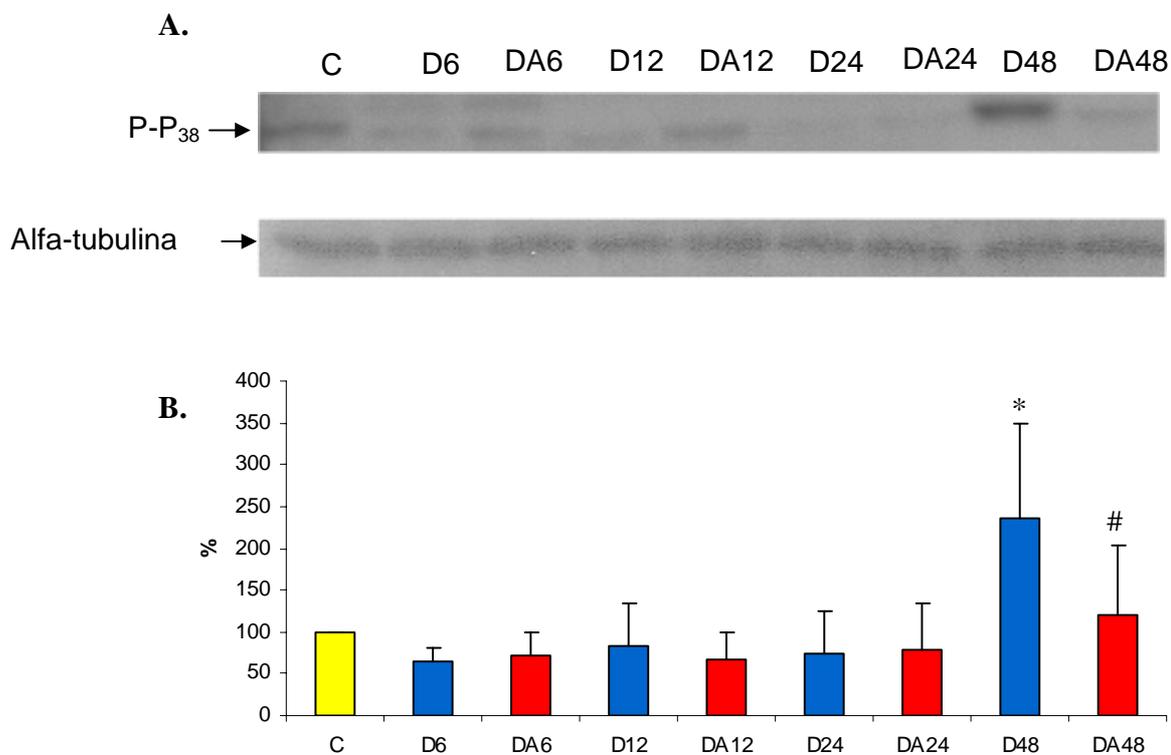


Figura R.18. Western blot (A) y densitometría (B) de P-p38 en homogenados de glándula mamaria con y sin alopurinol

La ilustración es una imagen representativa de las de Western blots realizadas con homogenados de glándula mamaria en lactancia día 14, considerado como control y en involución fisiológica, tras el destete sin(D) y con alopurinol (DA) a las 6,12,24,48 horas. Los valores se expresan como media +/- desviación estándar correspondiente a n=4-5. La significación estadística se expresa como () p<0.05 frente al grupo control, (#) p<0.05 frente al grupo D48h.*

7.2. Efecto de la XO sobre la expresión del factor nuclear NFκB en el proceso apoptótico de la glándula mamaria de rata tras el destete

Estudiamos también la activación del factor nuclear κB en extractos nucleares de glándula mamaria con la técnica ELISA, midiendo la expresión de la subunidad p65 del

factor de transcripción. Se observa como el factor se activa tras el destete y tiene un pico significativo estadísticamente a las 12 horas. La XO actúa en este intervalo de tiempo disminuyendo su expresión como se muestra en la **Figura R.19**.

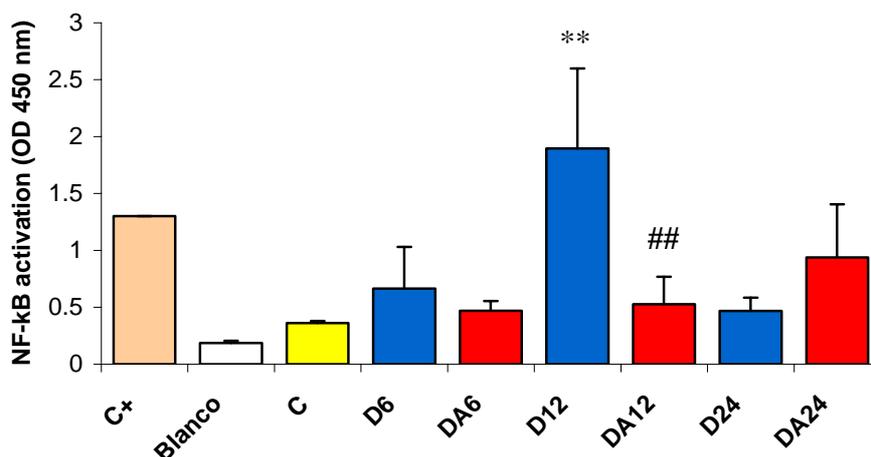


Figura R.19. Efecto de la XO sobre la expresión de la subunidad p65 del factor nuclear NFκB en homogenados de glándula mamaria con y sin alopurinol

En la grafica las muestras control son las de color ■ y las de destete sin (D) ■ y con alopurinol (DA) ■ a las 6, 12 y 24 horas. Los valores se expresan como media +/- desviación estándar correspondiente a n=4. La significación estadística se expresa como (**) p<0.01 frente al grupo control y (##) p<0.01 frente al destete correspondiente

7.3. Efecto de la XO sobre la expresión del factor p53 en el proceso apoptótico de la glándula mamaria de rata tras el destete

El gen supresor de tumores p53, tiene un papel importante en apoptosis determinando de forma dependiente o independiente la muerte celular en condiciones de estrés, como ha sido comentado en la introducción el estrés oxidativo puede inducirlo en distintas situaciones. Realizando un Western blot de este factor se constató que su forma activa (fosforilada) se expresa ya en las primeras horas tras el destete de la glándula mamaria y se mantiene con una elevada expresión incluso 48 horas

después (**Figura R.20A**). La densitometría realizada en 4 experimentos independientes, ilustra que la XO puede inhibir la fosforilación de esta proteína (**Figura R.20B**).

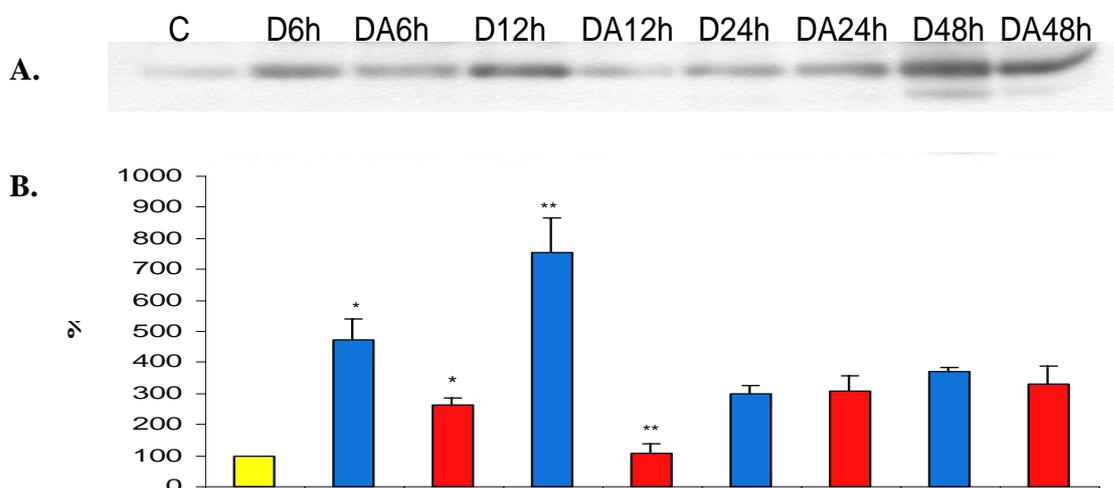


Figura R.20. Western blot (A) y densitometría (B) de P-p53 en homogenados de glándula mamaria con y sin alopurinol

La ilustración es una imagen representativa de las de Western blots realizadas con homogenados de glándula mamaria control ■ y en involución fisiológica, tras el destete sin(D) ■ y con alopurinol (DA) ■ a las 6,12,24,48 horas. Los valores se expresan como media +/- desviación estándar correspondiente a n=4. La significación estadística se expresa como () p<0.05, (**) p<0.01 frente al grupo control y (#) p<0.05, (##) p<0.01 frente al destete.*

II. XANTINA OXIDASA Y MITOCONDRIA

En estudios previos nuestro grupo demostró que el estrés oxidativo produce un daño al mDNA en la glándula mamaria durante el destete; que la mitocondria, una fuente importante de radicales libres, sufre cambios del potencial de membrana durante el destete (Esteve, Mompó et al. 1999; Sastre, Borrás et al. 2002). Por lo tanto el presente estudio se orienta hacia el papel de la mitocondria en el proceso apoptótico durante la involución de la glándula mamaria y la posible relación entre la XOR y la mitocondria en este proceso.

1. Presencia de la XO en la mitocondria

Aislado mitocondrias de glándula mamaria queremos ver la posible presencia de la enzima XO en estos orgánulos. En la **Figura R.21.** se muestra un Western blot representativo de XO de mitocondrias aisladas para distintos tiempos tras el destete, se puede observar, que la enzima se hace presente en todas las muestras de mitocondrias, pero la intensidad de la banda es máxima a las 12 y 24 horas después de retirar las crías. La densitometría confirma dichos resultados (**Figura R.22.**).

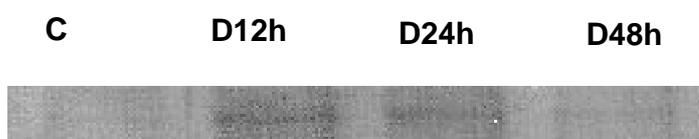


Figura R.21. Western blot de Xantina Oxidasa en mitocondrias aisladas de glándula mamaria

La ilustración es una imagen representativa de los Western blots realizados con mitocondrias aisladas de glándula mamaria controles (C) y tras el destete a 12, 24 y 48 horas (D12h, D24h, D48h) para 3 experimentos distintos.

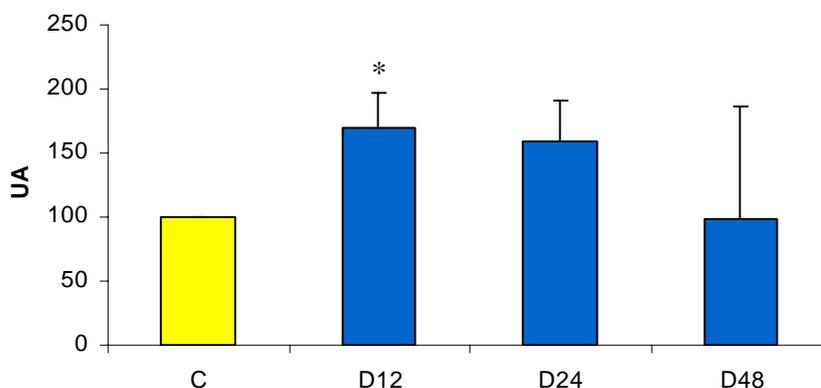


Figura R.22. Densitometria del Western blot de Xantina Oxidasa en mitocondrias aisladas de glándula mamaria

Las mitocondrias controles de glándula mamaria están representadas en ■ sus valores fueron considerados como 100% en intensidad de banda, las de destete 12, 24 y 48 horas sin alopurinol en ■ para n=3.

2. Efecto del alopurinol sobre la expresión de la XO en la mitocondria de la glándula mamaria

La administración del alopurinol no cambia, como cabría esperar, la expresión de la enzima XO. Seguidamente se presenta un experimento representativo de mitocondrias aisladas y Western blot (**Figura R.23.**) y la densitometría resumen confirmando dichos resultados (**Figura R.24.**).



Figura R.23. Western blot de Xantina Oxidasa en mitocondrias aisladas de glándula mamaria

La ilustración es una imagen representativa de los de Western blots realizados con mitocondrias aisladas de glándula mamaria controles (C) y tras el destete a 12,24 y 48 horas sin alopurinol (D12h, D24h, D48h) o con alopurinol (DA12h, DA24h, DA48h), para 3 experimentos distintos.

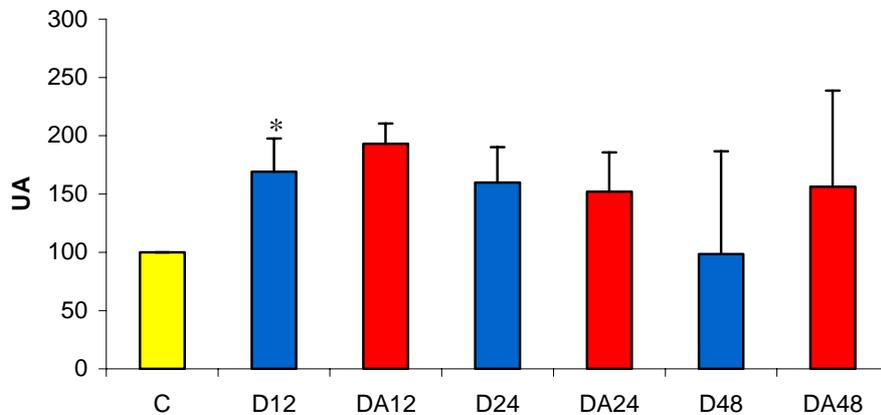


Figura R.24. Densitometría del Western blot de Xantina Oxidasa en mitocondrias aisladas de glándula mamaria

La representación grafica es ■ para las mitocondrias de glándula mamaria controles y en involución fisiológica, tras el destete sin(D) ■ y con alopurinol (DA) ■ a las, 12,24,48 horas. Los valores se expresan como media +/- desviación estándar correspondiente a n=3. La significación estadística se expresa como () $p < 0.05$ frente al grupo control.*

3. Actividad de la XO en la mitocondria de la glándula mamaria

Una vez visto la presencia de la enzima en la mitocondria, medimos su actividad en las muestras tras 24h destete, cuando la actividad de la XO en el tejido mamario es maxima. Como se puede ver en la **Figura R.25.**, la actividad enzimática es muy baja en mitocondrias controles pero aumenta de forma significativa 24 horas tras el destete.

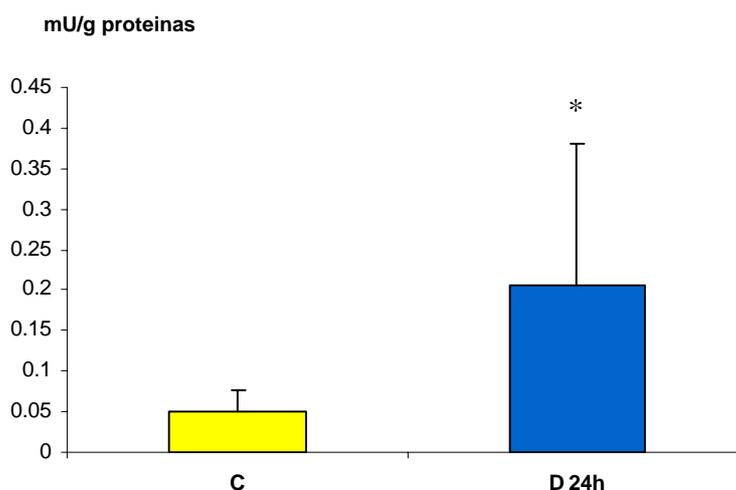


Figura R.25. Actividad de la Xantina Oxidasa (XO) en mitocondrias de glándula mamaria

- Representa las muestras de mitocondrias de glándula mamaria controles para una desviación estándar +/- correspondiente a n=5.
- Representa las muestras de mitocondrias de glándula mamaria en involución fisiológica, tras el destete a 24horas (D24h). Los valores se expresan como media +/- desviación estándar correspondiente a n=5. La significación estadística se expresa como (*) $p < 0.05$ frente al grupo control.

Para asegurarnos que las mitocondrias aisladas están sin contaminación del citosol y que lo estamos midiendo es la presencia y la actividad de la XO solo en la mitocondria, realizamos un Western Blot de la α -tubulina (54kDa). Comparando la imágenes de la proteína en las mitocondrias (**Figura R.26A**) y en el citosol (**Figura R.26B**) se observa claramente la pureza de las muestras.

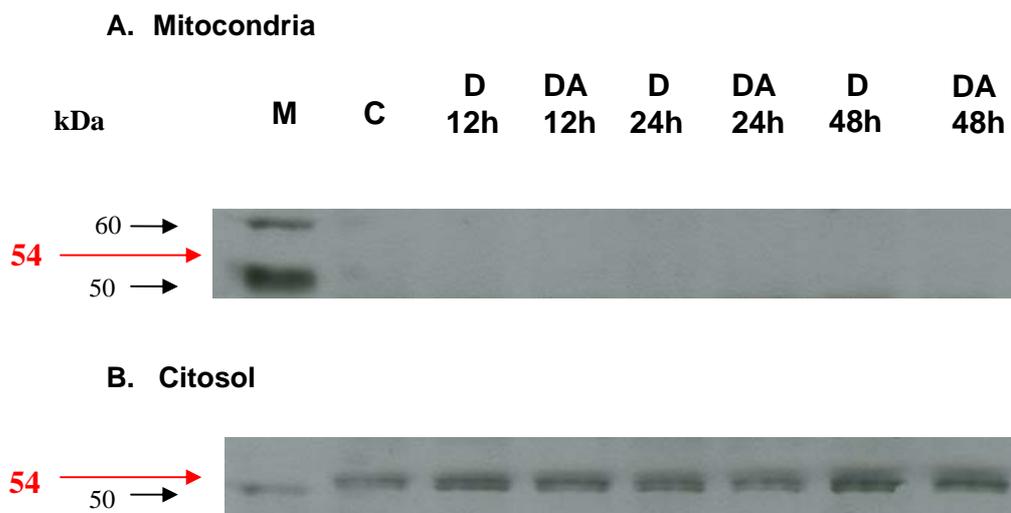


Figura R.26. Western blot de α -tubulina (54kDa) en mitocondrias aisladas(A) y citosol (B) en la glándula mamaria de rata

La ilustración es una imagen representativa de los de Western blots realizados con mitocondrias aisladas y citosol de glándula mamaria controles (C) y tras el destete a 12,24 y 48 horas sin alopurinol (D12h, D24h, D48h) o con alopurinol (DA12h, DA24h, DA48h), para 3 experimentos distintos. La M es el marcador de peso molecular.

4. Parámetros de estrés oxidativo dentro de la mitocondria de glándula mamaria

La presencia y la actividad de la XO en la mitocondria queremos correlacionarla con posibles parámetros de estrés oxidativo que aparece en la mitocondria durante el destete en la glándula mamaria. Por ello evidenciamos la presencia de proteínas nitradas.

4.1. Proteínas nitradas en mitocondrias de glándula mamaria

Realizando un Western blot con anticuerpos específicos para proteínas nitradas en muestras de mitocondrias aisladas controles y en destete de 24 horas, se puede observar una cierta tendencia de aumento en la intensidad de banda para las proteínas nitradas de bajo peso molecular en las mitocondrias destete a 24 horas **Figura R.27.**

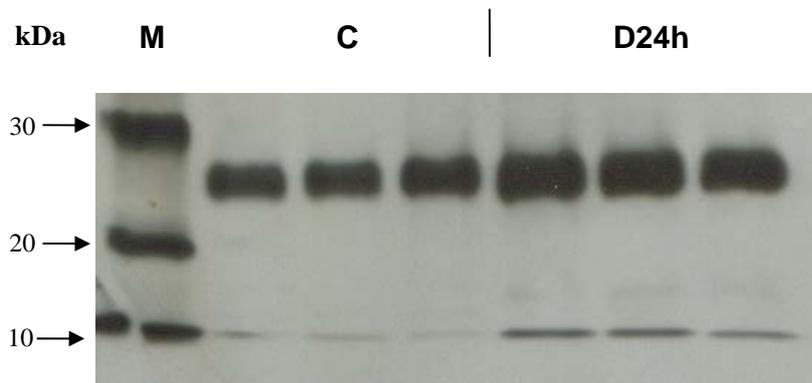


Figura R.27. Western blot de proteínas nitradas en mitocondrias aisladas de glándula mamaria

La ilustración es una imagen de los Western blots realizados con mitocondrias aisladas de glándula mamaria controles (C) y tras el destete a 24 horas (D24h), para un numero de 3 experimentos distintos.

La densitometría nos permite apreciar de forma cuantitativa la intensidad de cada banda, para las proteínas nitradas de peso molecular entre 10-20kDa (**Figura R.28A.**) y de 20-30kDa (**Figura R.28B.**). La diferencia es significativa para los dos casos.

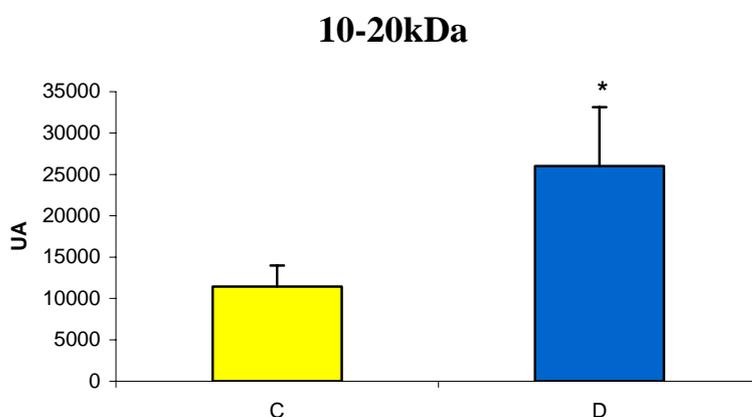


Figura R.28A. Densitometría de proteínas nitradas de bajo peso molecular entre 10-20kDa, en mitocondrias aisladas de glándula mamaria

La representación grafica es ■ para las mitocondrias de glándula mamaria controles y ■ para las de destete a 24horas. Los valores se expresan como media +/- desviación estándar correspondiente a n=3. La significación estadística se expresa como () $p < 0.05$ frente al grupo control.*

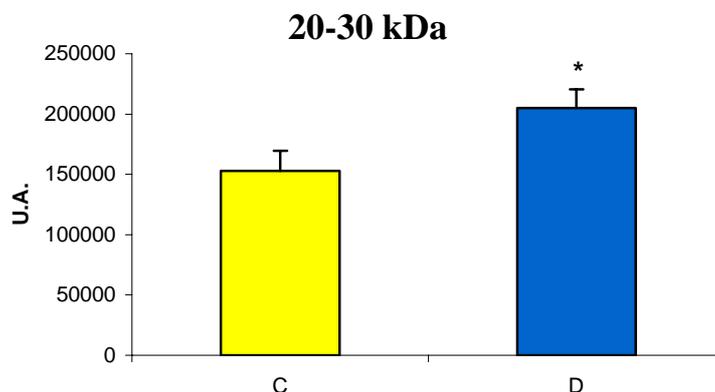


Figura R.28B Densitometría de proteínas nitradas de bajo peso molecular entre 20-30kDa, en mitocondrias aisladas de glándula mamaria

La representación grafica es ■ para las mitocondrias de glándula mamaria controles y ■ para las de destete a 24horas. Los valores se expresan como media +/- desviación estándar correspondiente a n=3. La significación estadística se expresa como () $p < 0.05$ frente al grupo control*

5. Correlación entre la actividad de la XO y la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial en la glándula mamaria

El paso siguiente fue correlacionar la actividad de la XO con los cambios funcionales mitocondriales que ocurren durante la apoptosis en la mitocondria. Por lo tanto inhibimos la actividad de la enzima y vemos después si la actividad enzimática influye la producción de peróxidos al nivel de la cadena respiratoria mitocondrial.

5.1. Efecto del alopurinol sobre la actividad de la XO en mitocondrias de glándula mamaria

Con el fin de comprobar si la actividad de la Xantina Oxidasa mitocondrial respondía a la inhibición como la XO celular, decidimos incubar mitocondrias aisladas del tejido glandular mamario con distintas soluciones de alopurinol (de 50 μ M y 100 μ M), durante unos 40 minutos a 37°C. Tras éste proceso se midió la actividad enzimática, comparándola con los valores de las mitocondrias procedentes de glándulas mamarias

no destetadas pero sometidas al mismo tratamiento con alopurinol.

La **Tabla R.2.** muestra los valores obtenidos.

ALOPURINOL	ACTIVIDAD XO EN MITOCONDRIAS CONTROLES (mU/mg proteínas)	ACTIVIDAD XO EN MITOCONDRIAS DESTETADAS 24h (mU/mg proteínas)
SIN	0.056+/- 0.048	0.205 +/- 0.085 *
50 µM	0.018 +/- 0.023	0.032 +/- 0.043 &
100 µM	0.005 +/- 0.02 #	0.02 +/- 0.01 &&

Tabla R.2. Actividad de la XO en mitocondrias aisladas controles y destetadas 24h de glándula mamaria

La significación estadística se expresa como () $p < 0.05$ D24h frente al grupo C, (#) $p < 0.05$ controles con alopurinol frente al grupo C, (&) $p < 0.05$ D24h con alopurinol frente al grupo D24h, (&&) $p < 0.01$ D24h con alopurinol frente al grupo D24h.*

Representando grafico los valores **Figura R.29.** se observa una disminución significativa tras la administración del alopurinol de 100µM para las mitocondrias control con un 91.08%, mientras para las mitocondrias en destete la concentración de 50µM alopurinol es suficiente para inhibirla de forma efectiva en 76.12%.

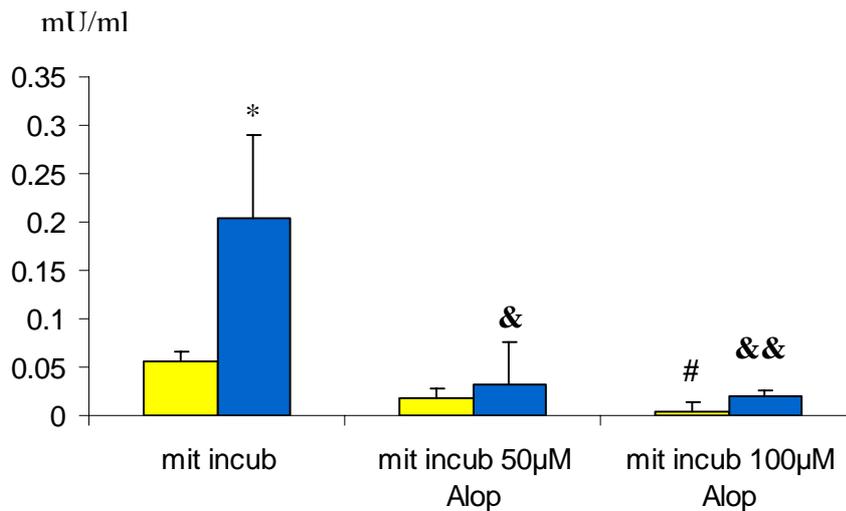


Figura R.29. Actividad de la XO en mitocondrias aisladas de glándula mamaria incubadas o no con alopurinol a una concentración de 50µM y 100µM

La representación gráfica es ■ para las mitocondrias de glándula mamaria controles (C), ■ para las de destete a 24 horas (D24h). Los valores se expresan como media \pm desviación estándar correspondiente a $n=5$. La significación estadística se expresa como (*) $p<0.05$ D24h frente al grupo C, (#) $p<0.05$ controles con alopurinol frente al grupo C, (&) $p<0.05$ D24h con alopurinol frente al grupo D24h, (&&) $p<0.01$ D24h con alopurinol frente al grupo D24h.

5.2. Efecto del alopurinol sobre la producción de peróxidos al nivel de la cadena respiratoria mitocondrial

Una vez observada la clara inhibición de la actividad XO mitocondrial por el alopurinol decidimos estudiar el posible papel de la XO en la producción mitocondrial de peróxidos. Después de incubar las mitocondrias con las mismas concentraciones de alopurinol de 50µM y 100µM medimos la producción de peróxidos tanto en las mitocondrias controles como en las procedentes de destete. Las medidas se realizan aparte para el complejo I, que tiene como sustrato al piruvato (5 mM) y malato (2.5mM), como para el complejo III teniendo como sustrato al succinato (10mM).

La **Figura R.30.** muestra como el alopurinol no influye en la producción de peróxidos al nivel del complejo I, ni en las mitocondrias controles **(A)** ni en las de destetes a 24 horas **(B)**.

nmol/min.mg prot

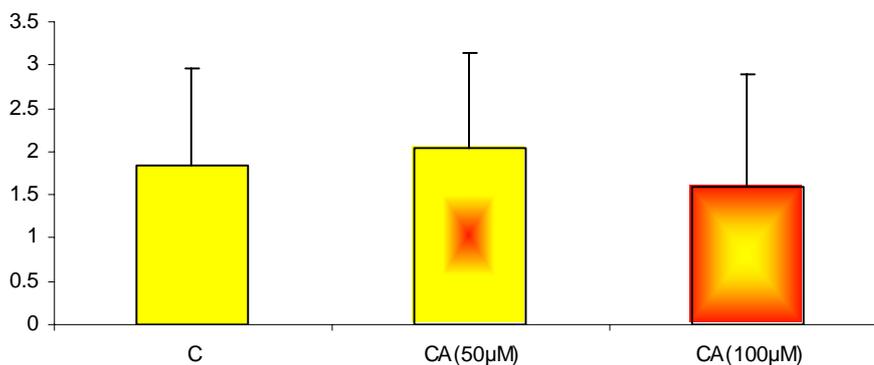


Figura R.30A Velocidad de generación de peróxidos por mitocondrias controles de glándula mamaria, incubadas con o sin alopurinol (de 50μM y 100μM), utilizando como sustrato para el complejo I el piruvato 5mM y malato 2.5 mM de 50μM y 100μM

La representación grafica es ■ para las mitocondrias de glándula mamaria controles(C) y ■ C incubadas con alopurinol 50μM y ■ 100μM. Los valores se expresan como media +/- desviación estándar correspondiente a n=5

nmol/min.mg prot

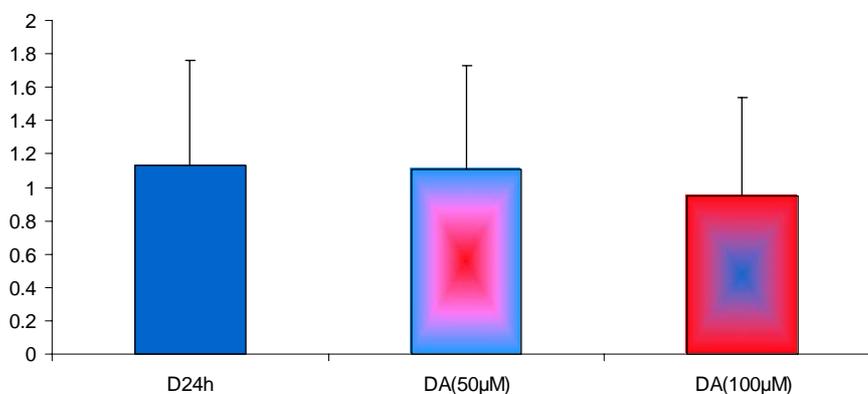


Figura R.30B Velocidad de generación de peróxidos por mitocondrias destetes 24 horas de glándula mamaria incubadas con o sin alopurinol (de 50μM y 100μM), utilizando como sustrato para el complejo I el piruvato 5mM y malato 2.5 mM de 50μM y 100μM

La representación grafica es ■ para las mitocondrias de glándula mamaria destetes 24h(D24h) y ■ destetes incubadas con alopurinol 50μM y ■ 100μM. Los valores se expresan como media +/- desviación estándar correspondiente a n=5

Lo mismo ocurre, no hay ningún cambio en la producción de peróxidos si el sustrato es el succinato 10mM para el complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial, tanto en las muestras controles **Figura R.31A**, como en las mitocondrias destetes a 24 horas (**Figura R.31B**).

nmol/min.mg prot

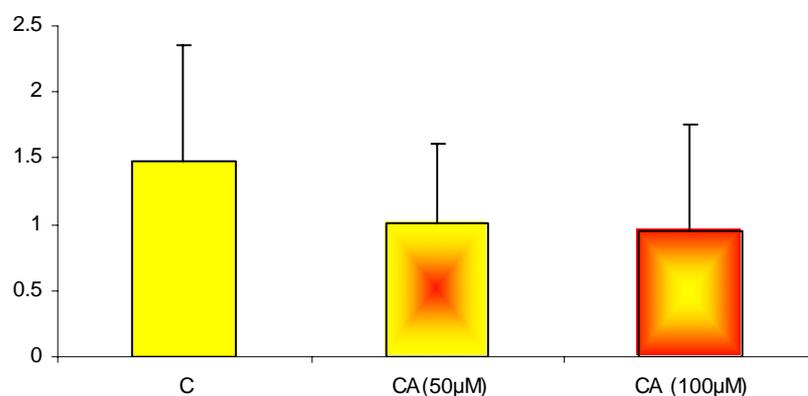


Figura R.31A Velocidad de generación de peróxidos por mitocondrias controles de glándula mamaria, incubadas con o sin alopurinol (de 50µM y 100µM), utilizando como sustrato para el complejo III el succinato10mM

La representación grafica es  para las mitocondrias de glándula mamaria controles(C) y  C incubadas con alopurinol 50µM y  100µM. Los valores se expresan como media +/- desviación estándar correspondiente a n=5

nmol/min.mg prot

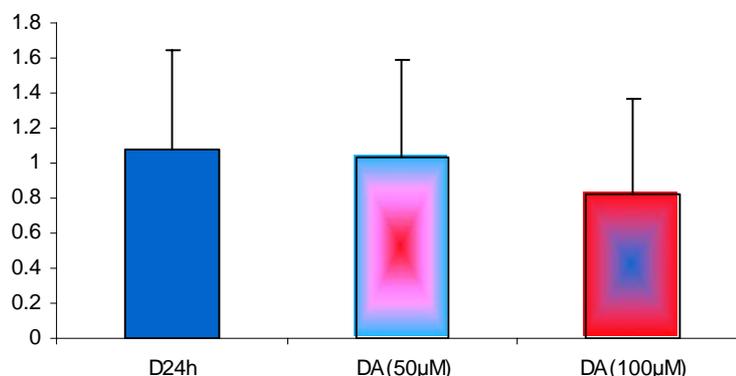


Figura.31B. Velocidad de generación de peróxidos por mitocondrias destetes 24 horas de glándula mamaria, incubadas con o sin alopurinol (de 50µM y 100µM), utilizando como sustrato para el complejo III el succinato 10mM

La representación grafica es ■ para las mitocondrias de glándula mamaria destetadas 24h(D24h) y ■ destetadas incubadas con alopurinol 50µM y ■ 100µM. Los valores se expresan como media +/- desviación estándar correspondiente a n=5

5.3. La XO fuente de peróxidos en las mitocondrias de glándula mamaria

Los resultados mostrados con referencia a la producción de peróxidos al nivel de la cadena mitocondrial nos indican que, la XO no afecta su producción.

Pero como la enzima es una fuente principal de radicales libres de oxígeno nos propusimos medir la producción específica de peróxidos debido a su actividad. Por lo tanto, incubamos las mitocondrias con la xantina 10mM, sustrato específico para la XO y después administramos el alopurinol 100µM, midiendo seguidamente la producción de peróxidos en comparación con dicho sustrato. La **Figura R.32.** demuestra los resultados tanto en las mitocondrias controles (**A**), como en las destetadas 24h (**B**).

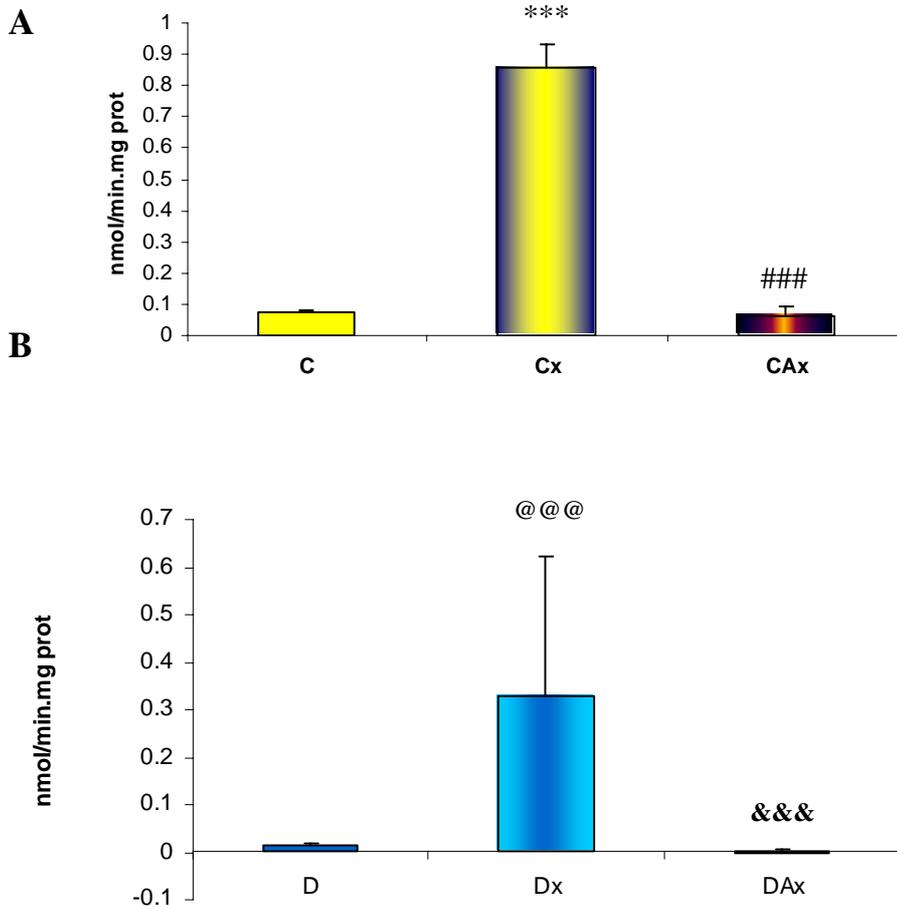


Figura R.32. Velocidad de generación de peróxidos por la XO en mitocondrias controles (A) y destetadas 24horas (B) en la glándula mamaria, incubadas con xantina y xantina-alopurinol

La representación grafica es ■ para las mitocondrias de glándula mamaria controles(C), ■ C incubadas con xantina(Cx) y ■ C incubadas con xantina y alopurinol (CAx), ■ son D) y ■ D incubadas con xantina(Dx) y ■ D incubadas con xantina y alopurinol(DAx). Los valores se expresan como media +/- desviación estándar correspondiente a n=3, donde (***) p<0.001 vs C y (###)p<0.001 vs Cx, (@@@) p<0.001 vs D y (&&&)p<0.001vs Dx.

Se observa que tanto en las mitocondrias controles como en las destetadas la administración del alopurinol disminuye la producción de peróxidos lo que significa que la XO representa una fuente de radicales libres dentro de la mitocondria.

6. Liberación del citocromo c de la mitocondria durante el destete en la glándula mamaria

Una vez demostrado su presencia, actividad y la producción de los radicales libres en la mitocondria el paso siguiente fue demostrar si la enzima XO tiene algún papel sobre la liberación del citocromo c de la mitocondria, elemento clave en la vía intrínseca de la apoptosis.

Utilizando el método Western blot he evidenciado la posible presencia del citocromo c dentro de la mitocondria en muestras controles y destetes 24 horas. La **Figura R.33.** muestra la imagen de la membrana.

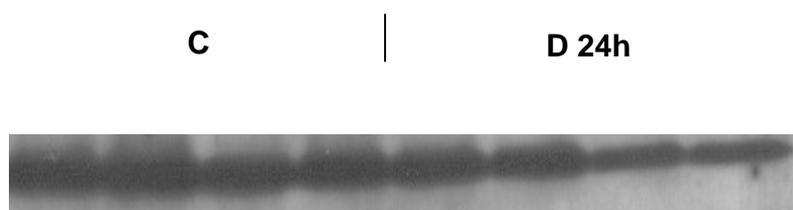


Figura R.33. Western blot de citocromo c en mitocondrias aisladas de glándula mamaria

La ilustración es una imagen de Western blots realizados con mitocondrias aisladas de glándula mamaria controles (C) y tras el destete a 24 horas (D24h), para un numero de 4 experimentos distintos.

7. Efecto de la actividad de la enzima XO sobre la liberación del citocromo c en mitocondrias de glándula mamaria durante su involución.

Para ver si la XO actúa sobre la liberación del citocromo c he repetido el Western blot, utilizando muestras de mitocondrias incubadas con alopurinol en distintos tiempos (**Figura R.34.**).



Figura R.34 Western blot de citocromo c en mitocondrias aisladas de glándula mamaria

La ilustración es una imagen representativa de los de Western blots realizados con mitocondrias aisladas de glándula mamaria controles (C) y tras el destete sin(D) y con alopurinol (DA) a 12 y 24 horas,

La imagen muestra como la cantidad de citocromo c en la mitocondria, a las 12 horas tras el destete es claramente inferior, iniciando el proceso apoptótico que se hace totalmente visible por la técnica TUNEL y electroforetico a las 24 y 48 horas. La XO actúa sobre éste proceso a las 12 horas de destete inhibiendo la liberación del citocromo c.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

I. XOR Y APOPTOSIS

La apoptosis es una forma de muerte celular fisiológica con un papel esencial en el desarrollo e involución de los tejidos, su homeostasis, en la respuesta inmune y en la regulación hormonal.

La presente tesis estudia este tipo de muerte celular durante un proceso fisiológico de la glándula mamaria de rata, la involución glandular producida tras el destete.

Nos proponemos estudiar el papel de la XOR como fuente de radicales libres en un modelo escasamente estudiado. Hasta ahora la mayor parte de los trabajos que correlacionan XOR y apoptosis se refieren a la XO como fuente inductora de radicales libres en modelos *in vitro* y normalmente utilizando la actividad XO desde un compartimiento extracelular como fuente experimental de radicales libres. Hasta la fecha no nos consta que existan publicaciones que demuestren el papel de la XOR en la involución fisiológica de la glándula mamaria de rata. Nuestros resultados representan un paso más en la descripción de la red de mecanismos apoptóticos en un modelo fisiológico, teniendo como principal ventaja la utilización del animal entero.

1. Inducción de la actividad Xantina OxidoReductasa (XOR) en la involución fisiológica de la glándula mamaria de rata

Los resultados recogidos en la primera parte del capítulo de resultados de esta tesis destacan la importancia de la XOR como fuente de radicales libres en la apoptosis en glándula mamaria de rata.

1.1. Presencia y actividad de la XOR en la glándula mamaria

Por primera vez Mather y colaboradores.(Mather, 1977) localizan la XOR en las vesículas de secreción de la glándula mamaria de vaca. Desde entonces se considera un componente importante de la leche. Después, en 1981 Jarasch localizan la enzima en el epitelio glandular y en el endotelio capilar de la glándula mamaria de vaca donde se le atribuye un importante papel redox. Poco después,

en 1983 se localizan los anticuerpos de tipo IgG antiXO tanto en humanos como en distintos animales (Bruder et al. 1983). Una vez localizada en la glándula mamaria, a la XO se le atribuye distintos papeles: el antibacteriano, en mamogénesis y lactogénesis (Hayden et al. 1991). Sin embargo no se concede ninguna importancia a la XO en la involución glandular, incluso su preeminencia en la mamogénesis y lactogénesis siempre viene de la mano de su papel como constituyente fundamental de la leche.

Los resultados obtenidos por nosotros demuestran la presencia de la enzima en la glándula mamaria de rata en involución. Los resultados que se recogen en la Figura R.1. y Figura R.2. del capítulo de resultados, demuestran que la enzima se encuentra presente en la glándula mamaria, tanto en la glándula mamaria control como tras los destetes en las distintas horas estudiadas. Estos resultados, sobre todos los de la glándula mamaria control, ya habían sido publicados por varios autores en distintas especies (Mather et al. 1977, Jarasch et al. 1981). Esta falta de diferencia en la expresión de la enzima entre el control y el destete contrasta con el importante aumento en la actividad, esta aumenta significativamente tanto a las 6 como a las 24 horas tras el destete, como se recoge en la Figura R.4., en el capítulo de resultados. También se produce un aumento significativo de la actividad de la forma deshidrogenasa de la enzima a las 24 horas tras el destete. El hecho de que se produzca un aumento de la actividad, pero no de la expresión de la enzima nos indica que el aumento específico de la actividad podría ser debido a un aumento de la fosforilación de la forma oxidada de la enzima (Kayyali, 2001).

Sin embargo la falta de disponibilidad de un anticuerpo específico para la forma fosforilada de la enzima, nos ha impedido hacer estudios específicos sobre la causa de este aumento de la actividad de la XO. Como se recoge en el capítulo de introducción no ha sido descrito este aumento de la actividad XO tras el destete. Si que han sido publicados aumentos o fluctuaciones en la actividad de la XO tanto durante el proceso de mamogénesis como durante la lactancia (Hayden TJ, 1991). Esto contribuye a destacar la importancia de esta enzima en el proceso completo de la glándula mamaria, el proceso de mamogénesis y de lactogénesis ya descrito en la bibliografía y recogido en el capítulo de introducción, como en esta tesis en la parte correspondiente a la involución de la propia glándula mamaria.

Las causas del aumento específico de la actividad XO tras el destete pueden ser debidas a procesos de proteólisis inespecífica debidos al aumento de dicha actividad durante los procesos de apoptosis de la glándula mamaria de rata (Mazurek, 1999). Distintos autores han demostrado que durante la involución de la

glándula mamaria se produce un incremento muy importante del índice de células apoptóticas. Este es máximo, como se ha demostrado por distintos autores entre ellos nosotros (Esteve, 1999; Quarrie 1995, 1996, Blatckford,1999; Motyl, 2001) a las 24 horas tras el destete.

Con el fin de demostrar que el aumento de la actividad XO descrito anteriormente era debido al propio proceso de involución de la glándula y no una consecuencia del aumento de la concentración de leche tras el destete, decidimos determinar la concentración de lactosa tras el destete en la glándula mamaria. En la Figura R.5. se demuestra un aumento significativo de la concentración de la lactosa a las 6 horas tras el destete, la cual progresivamente va disminuyendo, alcanzando concentraciones inferiores a las del control, a las 24 horas. La **Figura D.1.** muestra la correlación entre la actividad de la XO y la concentración de lactosa en las muestras.

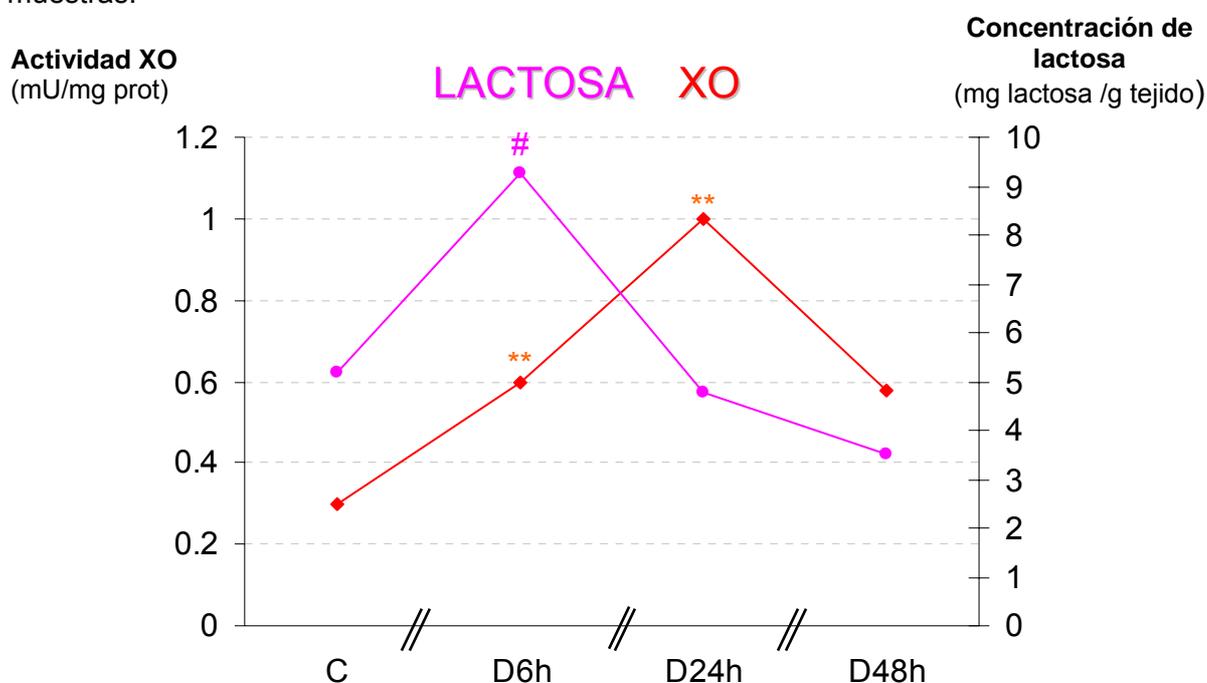


Figura D.1. Correlación entre la actividad de la XO y la concentración de lactosa en los homogenados de glándula mamaria

- Representa la actividad de la XO en las muestras de homogenados de glándula mamaria controles (C), destetadas a 6, 24 y 48horas (D) para una desviación estándar +/- correspondiente a n=4-9. La significación estadística se expresa como (**) $p < 0.01$ vs control.
- Representa la concentración de lactosa en las muestras de homogenados de glándula mamaria en involución fisiológica. Los valores se expresan como media +/- desviación estándar correspondiente a n=3. . La significación estadística se expresa como (#) $p < 0.05$ vs control.

Estos resultados demuestran que el aumento de la actividad XO que, recordemos que era máxima a las 24 horas tras el destete, es decir cuando la concentración de la lactosa es inferior a la del control, no es debida a la acumulación de la leche si no a un efecto específico del proceso de involución de la glándula mamaria (Marti, 1997).

2. La actividad de la enzima XO como fuente importante de estrés oxidativo durante el destete

Una vez determinado que el incremento de la actividad XO que se produce tras el destete es un efecto específico y no debido a la acumulación de leche y que este aumento es significativo tanto a las 6 horas como a las 24 horas tras el destete, decidimos determinar si el aumento de la actividad generaba una situación de estrés oxidativo en la glándula mamaria. En primer lugar realizamos un Western blot de proteínas nitradas, dado que los sitios activos de la enzima, el molibdeno y el FAD, son unas fuentes de producción de óxido nítrico. Los resultados que se recogen en la Figuras R.6. y R.7. demuestran como se produce tras el destete un aumento de la cantidad de proteínas nitradas, que es específicamente significativa a las 6 y 24 horas tras el destete; es decir cuando se produciría los picos máximos de actividad XO. La **Figura D.2.** muestra esta correlación.

Además de determinar la presencia de proteínas nitradas como marcador de estrés oxidativo, también determinamos otro parámetro clásico de estrés oxidativo, como es el cociente de glutatión, de forma que se determinó la concentración de GSH, GSSG y se calculó el cociente GSSG/GSH. En la Tabla R.1. se recogen las variaciones observadas así como en la Figura R.8. Como puede apreciarse tanto en la tabla como en la figura, se produce un marcado incremento del estrés oxidativo evidenciado por el cociente GSSG/GSH a las 24 y a las 48 horas tras el destete.

Este incremento del estrés oxidativo es debido de forma coordinada al mismo tiempo por una disminución de la concentración del GSH en la glándula y por un aumento de la forma oxidada GSSG, como la **Figura D.3.** muestra.

Dicha situación de estrés oxidativo observada tras el destete, ha sido observada repetidas veces en la literatura en situaciones de apoptosis (Stefanon, 2002; Su, 2002; Kohlhoff 2000). Es muy común que las células en cultivo cuando entra en apoptosis generan una situación de estrés oxidativo en la que igual que

vemos en nuestro modelo (recordemos que es *in vivo* y no *in vitro*) se observa una disminución de la concentración de GSH y un aumento de la forma oxidada GSSG. Estos resultados indican que la XO podría ser una de las causas del estrés oxidativo que se observa en la glándula mamaria tras el destete.

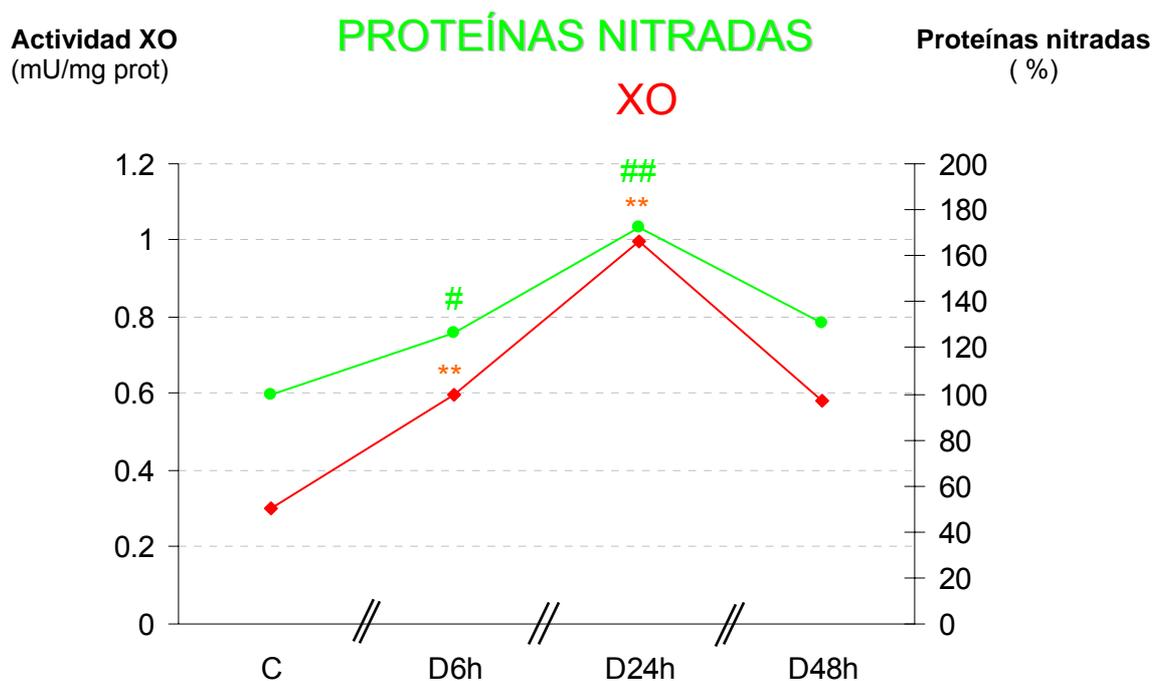


Figura D.2. Correlación entre la actividad XO y densitometría del Western blot de proteínas nitradas de bajo peso molecular en los homogenados de glándula mamaria de rata

- Representa la actividad de la XO en las muestras de homogenados de glándula mamaria controles (C), destetadas a 6, 24 y 48 horas (D) para una desviación estándar +/- correspondiente a n=4-9. La significación estadística se expresa como (**) $p < 0.01$ vs control.
- Representa los valores de la densitometría de los Western blot de proteínas nitradas de bajo peso molecular en las muestras de homogenados de glándula mamaria en involución fisiológica. Los valores se expresan como media +/- desviación estándar correspondiente a n=4. La significación estadística se expresa como (#) $p < 0.05$ y (##) $p < 0.01$ vs control.

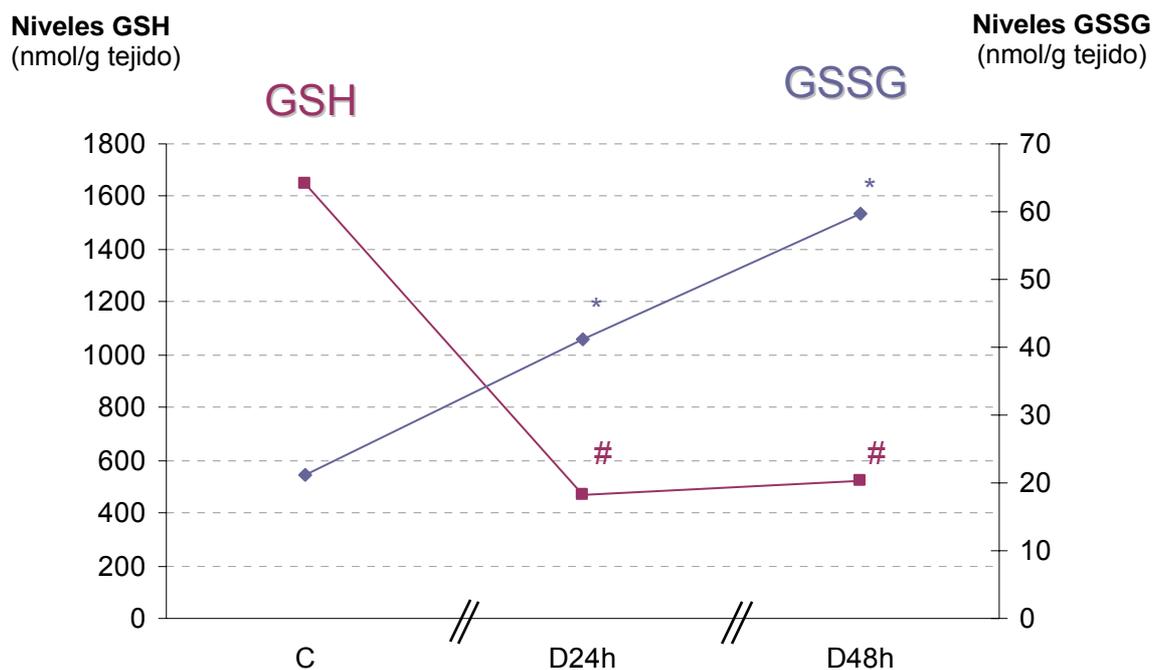


Figura D.3. Correlación entre los niveles de GSH y GSSG en los homogenados de glándula mamaria de rata

- Representa los niveles de GSH en los homogenados de glándula mamaria controles (C), destetadas a 24 y 48 horas (D) para una desviación estándar +/- correspondiente a n=8. La significación estadística se expresa como (*) $p < 0.05$ vs control.
- Representa los niveles de GSSG en los homogenados de glándula mamaria en involución fisiológica. Los valores se expresan como media +/- desviación estándar correspondiente a n=8. La significación estadística se expresa como (#) $p < 0.05$ vs control.

Es conocido que el sistema xantina-xantina oxidasa es utilizado habitualmente *in vitro* para generar situaciones de estrés oxidativo con fines experimentales. Lo que observamos aquí es una situación fisiológica del mismo tenor, en la cual la enzima XO tras el destete produce una situación de estrés oxidativo que podría inducir la vía apoptótica.

Con el fin de demostrar que la XO es realmente la fuente de los radicales libres y que el efecto de la XO es realmente de importancia fisiológica, utilizamos al inhibidor específico de la xantina oxidasa alopurinol como herramienta para tratar de dilucidar la importancia del papel de dicha enzima en la involución de dicha glándula.

El resultado de la Figura R.9. nos indican como la actividad de la XDH y XO disminuyen de forma radical tras la administración del alopurinol según el protocolo descrito en el capítulo correspondiente tanto en la glándula mamaria de ratas no destetadas, control, como en los distintos tiempos tras el destete. Similares resultados también se observan en plasma de sangre venosa, como se recoge en la Figura R.10.

Como habría que esperar no existe ningún cambio en la expresión de la enzima XO cuando se utiliza como inhibidor el alopurinol. Es decir que el alopurinol tiene un efecto específico sobre la actividad enzimática.

Seguidamente determinamos el cociente GSSG/GSH como parámetro de estrés oxidativo dado que queríamos demostrar, si la XO era realmente la fuente de estrés oxidativo que se inducía durante el destete. Como denota la Figura R.13C. el alopurinol produce una disminución significativa del cociente GSSG/GSH, es decir que la actividad XO era una de las causas que inducía el estrés oxidativo de la glándula mamaria tras el destete. Existen algunos trabajos en la literatura que correlacionan los procesos de isquemia –reperfusión con la inducción de apoptosis en distintos tejidos (Quindry, French et al. 2005) (Zhang, Fong et al. 2005). Sin embargo, en nuestro entender esta es la primera situación en la cual se demuestra que la XO desarrolla un efecto fisiológico de inducción de la apoptosis y por lo tanto de involución tisular en un tejido estudiando el animal entero.

Algunos autores han demostrado que el alopurinol es capaz de inhibir en los procesos de isquemia reperfusión, o en los procesos de aterosclerosis el aumento de la actividad XO desarrollado en dichos procesos fisiopatológicos (Tsutsumi Z. 2004, Guthikonda., 2003, 2004). La utilización del alopurinol para explicar los efectos de la XO es una herramienta muy útil y denota en nuestro caso como la XO puede jugar un papel fisiológico de relevancia en la regulación del proceso apoptótico. Así por ejemplo en la encefalopatía isquémica perinatal, la utilización de alopurinol a 22 niños con asfixia perinatal, administrado intravenoso en una dosis de 40mg/kg durante 4 horas, redujo sensiblemente la mortalidad con respecto al grupo control (Legido, 2000). De la misma forma en ensayos clínicos realizados en niños sometidos a cirugía cardiaca en los cuales se sometía a hipotermia circulatoria, se demostró que la utilización del alopurinol mejoraba en mas de un 55% las probabilidades de éxito en la operación, reduciendo de forma especialmente notable las pérdidas de conciencias posteriores y las complicaciones cardiacas posteriores a la intervención quirúrgicas (Legido, 2000).

3. Implicación de la enzima XO en el proceso de muerte celular por apoptosis en la glándula mamaria de rata tras el destete

Dado que la XO era una de las posibles causas del estrés oxidativo observado por nosotros y otros autores en la glándula mamaria tras el destete y en vista de que el alopurinol era un efectivo inhibidor de la actividad de la XO tanto sistémica como en la propia glándula mamaria, decidimos poner a prueba nuestra teoría y tratar de demostrar si la actividad XO tenía una relevancia fisiológica y era la causa del proceso de apoptosis en la glándula mamaria de rata. Para ello inhibimos la XO mediante alopurinol y utilizando la técnica de TUNEL y de la electroforesis observamos los aspectos morfológicos típicos a la fase tardía del proceso apoptótico descritos también por distintos autores en otros modelos (Albi, 2004; Eastman, 1992; 1995). Los resultados que se observan en la Figura R.14A. a las 24 horas y R.14B. a las 48 horas tras el destete, nos demuestran como el número de células apoptóticas disminuyen sensiblemente tras el tratamiento con el alopurinol (**Figura D.4.**).

Continuando con nuestros estudios sobre el efecto de la actividad de la XO sobre las células apoptóticas estudiamos la fragmentación del DNA utilizando las técnicas electroforéticas. Como se sabe la activación de la endonucleasa es una de las fases fundamentales en el proceso de apoptosis. Estas enzimas cortan el DNA formando fragmentos de 180-200 pares de bases. Cuando realizamos una electroforesis en gel de agarosa se puede observar Figura R.15. como se produce una disminución en el perfil electroforético cuando las animales son tratados con alopurinol. Zaragoza y colaboradores (Zaragoza et al. 2003) demostraron que la depleción del glutatión en la glándula mamaria mediante la utilización de butionina sulfoximina (BSO) produce, o mimetiza el efecto del destete, es decir cuando a las ratas se le inyectan BSO, el glutatión en la glándula mamaria desciende y se produce también apoptosis, aunque el animal no se ha destetado, mimetizando por tanto el efecto del destete. Es decir que la disminución de una sustancia antioxidante produce una situación de estrés oxidativo y la inducción del proceso apoptótico. Nosotros utilizando una sustancia que inhibe el estrés oxidativo como es el alopurinol, también tenemos una disminución del índice de apoptosis, con disminución del número de células apoptóticas, y del perfil electroforético característico de la apoptosis. De esta forma, tanto una disminución de las sustancias antioxidantes (disminución de GSH) como un incremento de las sustancias oxidantes (aumento de la actividad XO) van a dar lugar a un proceso de

apoptosis en la glándula mamaria. Estos resultados demuestran como el estrés oxidativo en la glándula mamaria es un mecanismo clave en el mantenimiento de la apoptosis en un tejido en situaciones fisiológicas.

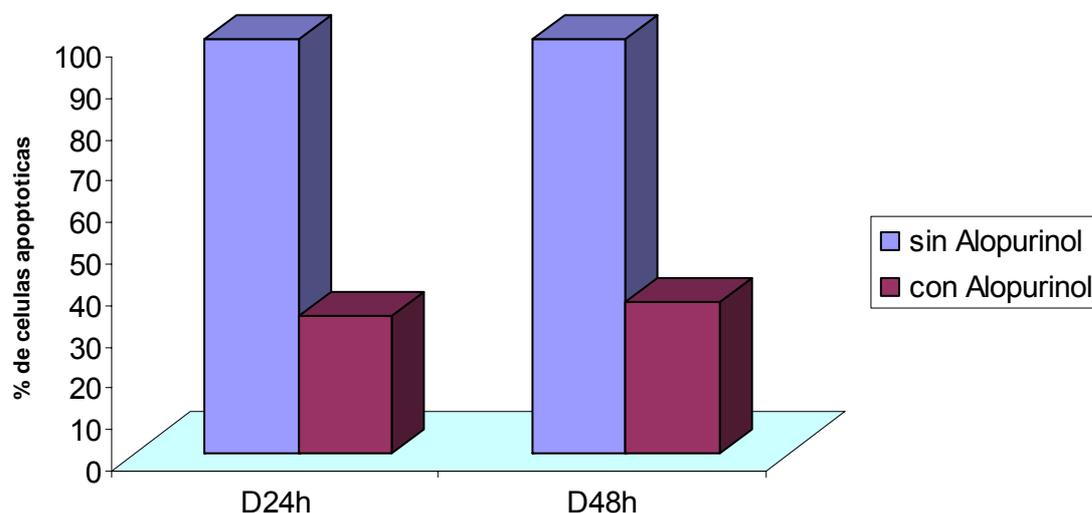


Figura D.4. Efecto del alopurinol sobre el número de células apoptóticas en la glándula mamaria en involución fisiológica tras el destete

- Representa el porcentaje de células apoptóticas destetadas a 24 y 48 horas tras el destete sin la administración del alopurinol
- Representa el porcentaje de células apoptóticas destetadas a 24 y 48 horas tras el destete tras la administración del alopurinol

4. Vías de señalización del proceso apoptótico mediadas por la actividad de la enzima XO

Una de las vías de señalización intracelular mediadas por el estrés oxidativo mas estudiadas en la actualidad, es la vía de la activación de las MAPKasas.

Estudios recientes en distintos modelos, como por ejemplo el ejercicio físico (Gomez-Cabrera, 2005), o la pancreatitis (Pereda,2004) demuestran que la inhibición de la XO con en alopurinol determina una disminución en la vía de señalización de las MAPK. Pero no hay ninguno que correlacione la actividad de la XO con la vía de señalización de las MAPKasas en el proceso apoptótico. Por lo tanto decidimos estudiar en primer lugar el posible papel de JNK y p38 en la inducción del proceso apoptótico (Marti, Lazar et al. 1999; Zarubin and Han 2005).

Marti y sus colaboradores en 1999 demuestran el papel del JNK en la involución de la glándula mamaria de ratón. Junto a la PKA, el JNK se induce durante la lactancia y aumenta su actividad durante la primera fase de la involución, con un pico de actividad en el tercer día de involución en la glándula mamaria de ratón. La activación del JNK tiene lugar en el epitelio glandular y tiene como gen diana a la c-Jun durante el destete.

Zarubin y sus colaboradores (2005) en su amplia revisión sobre la kinasa p38, muestra la implicación de la mismo en el proceso apoptótico. El p38 está y regula la actividad de las caspasas (Henkart, 1996; Huary, 1997 y Cardone 1997).

Hasta ahora no hay ningún estudio que demuestre el papel del JNK en la glándula mamaria de rata, ni en su desarrollo ni en su involución.

En la Figura R.16. se estudia la expresión del JNK en la glándula mamaria antes y tras el destete, y después de la utilización del alopurinol. Los resultados demuestran que la expresión de la kinasa no cambia a lo largo del proceso del destete con respecto a las glándulas mamarias que no involucionan, y además la administración del inhibidor selectivo alopurinol no produce ningún cambio sobre la expresión de dicha proteína. Por tanto podemos excluir que haya cambios en la expresión de JNK y que eso tenga importancia fisiológica en el proceso de apoptosis. Sin embargo cuando estudiamos la fosforilación del JNK, que es en realidad la forma activa de la enzima, si se observa como tras el destete hay un aumento de la actividad, sobre todo a las 6 y 12 horas tras el destete.

Sin embargo el alopurinol no produce ningún efecto sobre la fosforilación, por tanto la XO no es causa de cambios en la fosforilación, dado que no es capaz de regular la actividad del JNK.

p38, otra kinasa implicada en los procesos de apoptosis mediados por el estrés oxidativo (Qin, 2005; Zang 2005) si se encuentra aumentada de forma tardía a las 48 horas tras el destete del animal y además el alopurinol bloquea de forma significativa la expresión de p38 (Figura R.18). No hay sin embargo cambios en fases previas del proceso de destete. Por tanto estos resultados parecen indicar que p38 se induce como expresión tardía en la vía de la XO, dado que el alopurinol es capaz de bloquear dicha expresión.

Al factor NF- κ B se le atribuye un papel proapoptótico y al mismo tiempo uno antiapoptótico, dependiendo del modelo estudiado y de los mecanismos de

inducción. La familia del factor transcripcional NF- κ B regula el crecimiento, la diferenciación y la apoptosis en distintos tejidos, incluyendo linfocitos y células de cordón umbilical, pulmón, hígado, piel, huesos y también la glándula mamaria (Chen 2000, Clarkson 2000, Rudolph 2000).

En la glándula mamaria su papel se hace evidente en toda su evolución: desarrollo, lactancia e involución.

Durante el desarrollo el NF- κ B regula de forma positiva la proliferación, ramificación del epitelio y mantiene la arquitectura del epitelio normal durante el desarrollo precoz postnatal. Brantley y sus colaboradores en 2001, han estudiado el papel del NF- κ B durante el desarrollo postnatal precoz de la pared en la glándula mamaria de ratón, observando las consecuencias del aumento de la actividad del NF- κ B. Realizando un trasplante de un tejido glandular mamario deficiente en I κ B α , en un estroma de glándula mamaria sana de ratones normales, constatan un aumento en la ramificación del conducto lateral y una hiperplasia intraductal. El número de células epiteliales aumenta dos o tres veces en el epitelio deficiente en I κ B α con respecto al normal. La proliferación de las células epiteliales en el epitelio deficiente en I κ B α no fue acompañada de ningún tipo de apoptosis. La matriz extracelular adyacente al epitelio deficiente en I κ B α fue reducida.

Durante la lactancia la actividad del factor NF- κ B disminuye de forma significativa y el porcentaje de células apoptóticas es mínimo. Por tanto se podría pensar que la supervivencia del epitelio durante la lactancia está articulada mediante otras moléculas distintas del NF- κ B. Este último podría estar inducido de forma directa o indirecta por estímulos apoptóticos que se inician inmediatamente después del destete. Un número importante de factores de transcripción como: AP-1, p53, STATs, C/EBP δ , NF-1 y c-Myc están regulados durante el proceso de transición de la lactancia a la involución de la glándula mamaria.

Watson y Clarkson en 2000 demuestra, en un modelo *in vivo* en ratones, que el NF- κ B inhibe la apoptosis en las células mamarias epiteliales, representando el factor transcripcional más importante en el mecanismo de supervivencia de la glándula mamaria en involución. Según Watson se definen dos etapas en la involución de la glándula mamaria. La primera, iniciada por factores desconocidos de momento se caracteriza por la activación del STAT3 (Philp, 1996; Liu X, 1996), Bcl-XL y Bax (Heermeier, 1996). Además existe un descenso en la expresión génica de proteínas de la leche y del STAT5 y un aumento del número de células epiteliales que entran en apoptosis (Luna, 1996). La activación inicial del NF- κ B de forma moderada en la primera fase (las primeras 1-8 horas tras el destete), puede

ser debido a una perturbación en el contacto entre las células apoptóticas con las células vecinas.

La reactivación del NF- κ B en destete es discutible y parece que es debido a estímulos que determina el estrechamiento de los alvéolos (uno será la stasis de la leche), el estiramiento mecánico de las células vasculares endoteliales (Hishikawa 1997), o por la pérdida de contacto entre célula-célula o célula –matriz. Por tanto, el NF- κ B es considerado un regulador “checkpoint” en apoptosis que requiere la activación de otros factores de transcripción que inducen genes de supervivencia. Existe una interacción directa entre NF- κ B y factores transcripcionales asociados a involución como C/EBP, AP-1 y receptores glucocorticoides (Scheinman,1995) además NF- κ B regula el número de integrinas de las células de adhesión las cuales se saben que inician la supervivencia del epitelio mamario.

NF- κ B es un factor de transcripción que se activa de forma conspicua en los procesos mediados por el estrés oxidativo y que suele ser un marcador inicial en los procesos de inflamación o de regulación de la apoptosis. En nuestro modelo, tal como se puede apreciar en la Figura R19., la forma activada de la subunidad p65 del NF- κ B aumenta su expresión a las 12 horas tras el destete. El alopurinol inhibe la expresión de dicha subunidad. Nuestro grupo ha obtenido efectos similares del alopurinol en otras situaciones fisiológicas como el ejercicio físico (Gomez-Cabrera 2003). En un reciente estudio, Zaragoza y colaboradores (2005), utilizando un modelo idéntico a la presente tesis, muestra la activación del factor NF κ B en fases todavía más tempranas a las de 12 horas. El NF κ B es capaz de activarse a las 8 horas, se transloca al núcleo donde es capaz de activar distintos genes como sería: I κ B α o la NOS-2. Otros autores muestra que el alopurinol inhibe la actividad del NF- κ B en un modelo de reperfusión hepática, mostrando de esta manera la implicación de la Xantina Oxidasa en la activación del gen (Matsui, 2000).

Por lo tanto se puede concluir que, el NF κ B es un factor que regula el proceso apoptótico en sus fases precoces, es decir reversibles. Su actividad en nuestro modelo, muestra que esta bajo el control de la enzima XO.

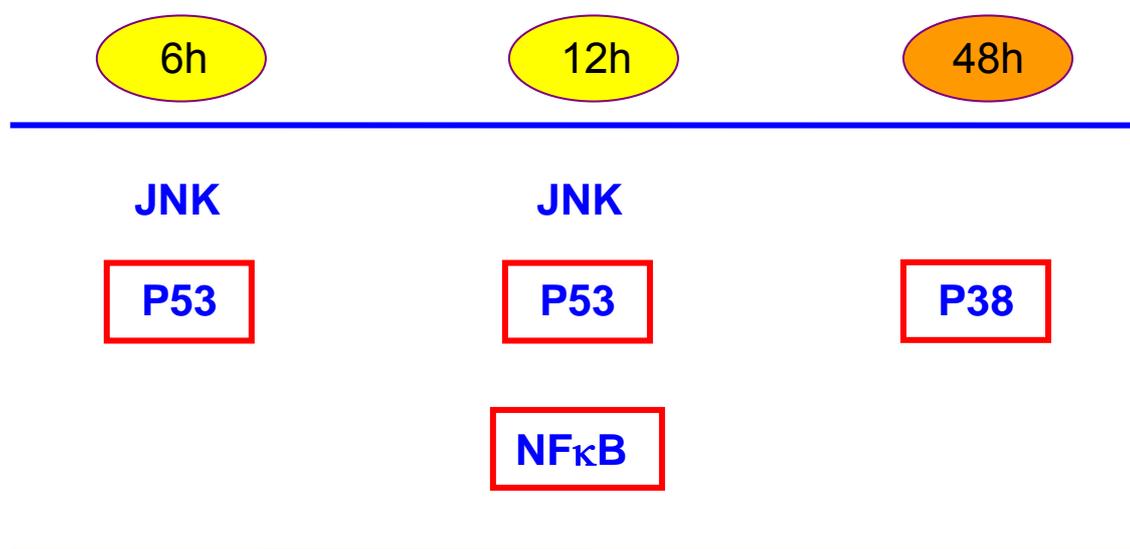
Otro factor regulador fundamental en los procesos de apoptosis, como ya se reviso en el capítulo de introducción es el p53. Este es un gen supresor de tumores, denominado el guardián del genoma, que ejerce sus acciones fundamentalmente a dos niveles: por un lado el bloquea el ciclo celular evitando que células con lesiones en el DNA lleguen a entrar en la fase de división y por otro lado, p53 es un potente

inductor del proceso apoptótico. La regulación y la funcionalidad del factor tumoral supresor p53 ha sido estudiado de forma extensiva debido a su papel crítico en el mantenimiento de la estabilidad del DNA después de la acción de estímulos genotóxicos. Los numerosos estudios hechos en la glándula mamaria son debido a su implicación en la patología de esta glándula y en especial al cáncer de mama. Hay estudios también que muestra el papel del p53 en la involución de la glándula mamaria y su papel proapoptótico durante este proceso. Factores de estrés fisiológico como hipoxia, la depleción de nucleótidos, el estado redox o la pérdida de contacto intercelular son factores que inducen la activación del p53 (Attardi, 2005; Slee, 2004; Haupt, 2003). Durante la involución, la demanda metabólica alta consigue producir alteraciones del estado redox en la glándula mamaria lo que puede activar al p53. La estasis de la leche en la glándula mamaria de ratón, durante su involución determina la expresión rápida del gen Trp53, lo que sugiere que la acumulación de leche representa un estímulo para inducir la apoptosis (Strange, Li et al. 1992). Destetar la glándula mamaria, produce en el ratón una inducción rápida del p53mRNA y su proteína. El gen p21/WAF1 (Cdkn 1 a) es el gen traducido por el p53, que responde a la estasis de la leche. Por lo tanto se considera que el gen tumoral supresor Trp53 puede ser regulado por estímulos fisiológicos y que el gen Cdkn1 representa un “gen señalizador” en la actividad del p53 en las células epiteliales de la glándula mamaria.

Nosotros determinamos la expresión del p53, concretamente la forma fosforilada del p53, que es la forma metabólicamente activa mediante Western blotting. Como se aprecia en la Figura R.20. el destete como era de esperar, produce un aumento de la expresión de la forma fosforilada de la p53 tan pronto como a las 6 horas. Otros autores, Zaragoza y colaboradores (Zaragoza et al. 2003) han demostrado inducciones de p53 a tiempos tan tempranos como 2 o 3 horas. Nuestros resultados se correlacionan con los de estos autores. La utilización del alopurinol produce una inhibición de la expresión de la forma fosforilada del p53 que es la metabólicamente activa. Por tanto podemos postular que p53 se encuentra regulado, como ha sido demostrado por otros autores (Achanta y Huang 2004; Zhang et al. 2005) por el estrés oxidativo. En otros modelos experimentales fue demostrado fundamentalmente *in vitro*, nuestros resultados demuestran que el p53 puede ser regulado por XO como fuente de radicales libres en fases tempranas y que regula de forma fisiológica el proceso de apoptosis de la glándula mamaria utilizando un modelo fisiológico y demostrándolo en el animal entero, no en una línea celular.

Los resultados recogidos hasta ahora demuestran que la actividad XO se induce en fases tan tempranas como 6 horas tras el destete y que el alopurinol es capaz de bloquear dicho incremento de actividad en la glándula mamaria. El bloqueo de la actividad XO nos sirve como herramienta para demostrar el importante efecto del alopurinol a distintos niveles: bloquea la apoptosis evidenciada por la técnica de TUNEL y por la técnica de electroforesis de DNA genómico, y al mismo tiempo hemos podido observar como la inhibición de la actividad XO bloquea inicialmente la expresión de la forma fosforilada del p53, y a las 6 y 12 horas tras el destete y de forma mas tardía algunos otros factores como p38 o NF-kB pueden ver también bloqueadas su vía de activación de apoptosis. La **Figura D.5.** representa un esquema de los resultados obtenidos en este capítulo, en donde se muestra el control de la XO sobre el mecanismo apoptótico en el modelo de glándula mamaria de rata.

VIAS ACTIVADAS TRAS EL DESTETE EN LA GLANDULA MAMARIA DE RATA



MECANISMOS CONTROLADOS POR LA XO

Figura D.5. Esquema de las vías activadas durante el destete y el mecanismo de control por la XO en el modelo de glándula mamaria de rata

- Representa los tiempos precoces tras el destete, sin evidencia morfológica y electroforetica de la apoptotis.
- Representa los tiempos tardíos tras el destete, con la evidencia de los cuerpos apoptóticos y de la escalera apoptotica.

II. XOR Y MITOCONDRIA

Como sabemos la mitocondria es el orgánulo clave en el proceso apoptótico, dado que regula la salida del citocromo C, el cual es fundamental para constituir el apoptosoma y de esta forma iniciar la cascada de activación de las caspasas, que darán subsiguientemente lugar a la digestión del DNA genómico. Además la mitocondria es origen de radicales libres y es una de las fuentes fundamentales del estrés oxidativo en diversas líneas celulares.

En 1999 nuestro grupo (Esteve et al. 1999) publicó que el estrés oxidativo era un evento inicial del proceso apoptótico y que el cociente GSSG/GSH aumentaba antes de que se produjeran los cambios morfológicos en la glándula. En ese mismo trabajo y en otros posteriormente (van Houten 2005, Liu2005) se demostró que las mitocondrias producían estrés oxidativo en fases iniciales del proceso apoptótico en distintos modelos experimentales. La **Figura D.6.** muestra la correlación entre el coeficiente GSSG/GSH mitocondrial, publicado por nuestro grupo anteriormente (Esteve 1999) y la actividad de la XO en la glándula mamaria, medida en este presente trabajo.

Dado el similar perfil de estrés oxidativo (cociente GSSG/GSH) en mitocondrias procedentes de glándulas mamarias en involución con el perfil de actividad XO en el parénquima mamario durante la involución nos planteamos la posibilidad de que existiera actividad XO en las mitocondrias.

1. Presencia y actividad de la XO en las mitocondrias de glándula mamaria de rata

Uno de los miembros de la familia enzimática que contiene al Mo como cofactor tiene como localización subcelular, a la mitocondria. Es el caso de la sulfito oxidasa que se conoce desde el año 1997 como situada en el espacio intermembrana de la mitocondria (Moriwaki, Yamamoto et al. 1997).

Hasta ahora la presencia de la XO en la mitocondria es discutible. En 1982 Mather y cols.(Mather et al. 1982) detectaron a la XO en el tejido mamario de vaca, y realizando una separación fraccionada de este tejido observaron la actividad de la enzima en un 0% en el núcleo, 5,65% en la fracción mitocondrial, 10,35% en la fracción microsomal y un 84% en el sobrenadante postmicrosomal. Pero realizando una electroforesis en SDS/poliacrilamida seguida de una inmunoprecipitación de la

fracción mitocondrial la proteína de 150kDa no se hacía visible en la fracción mitocondrial.

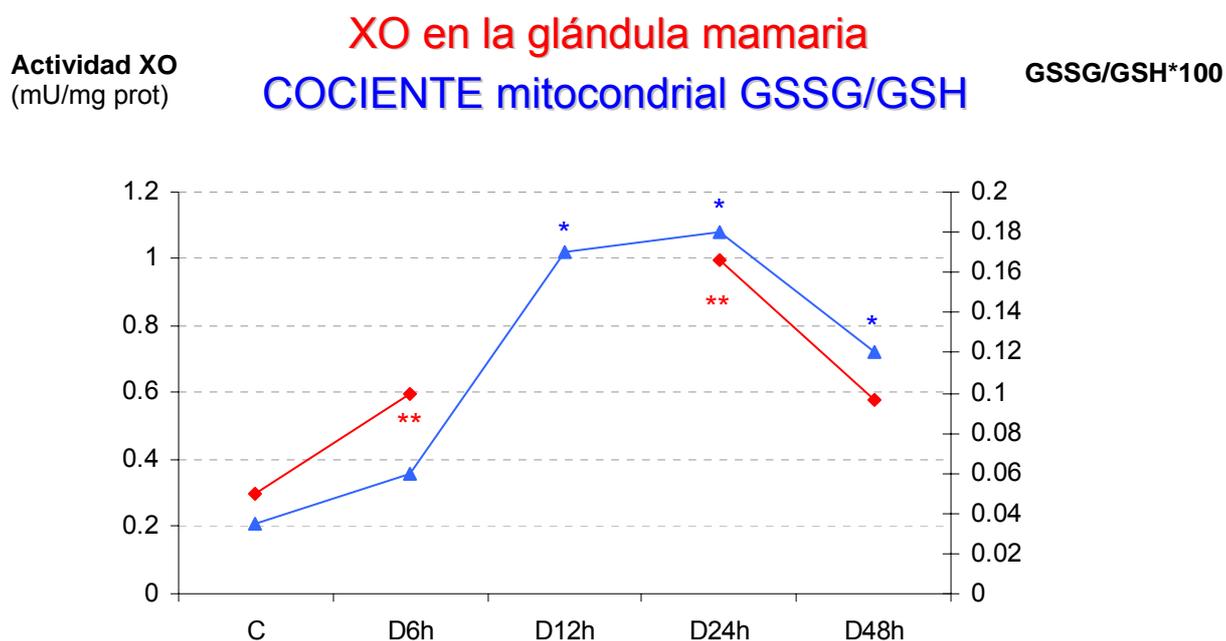


Figura D.6. Correlación entre la actividad XO y el cociente GSSG/GSH *100 en las mitocondrias de glándula mamaria de rata

- Representa la actividad de la XO en las muestras de mitocondrias aisladas de glándula mamaria controles (C), destetadas a 24horas (D) para una desviación estándar +/- correspondiente a n=4-9. La significación estadística se expresa como (*) $p < 0.05$ vs control.
- Representa el cociente GSSG/GSH en las muestras de mitocondrias aisladas de glándula mamaria en involución fisiológica. Los valores se expresan como media +/- desviación estándar correspondiente a n=5-9. La significación estadística se expresa como (#) $p < 0.05$ vs control.

Algunos estudios señalan hacia nuestras sospechas. Saavedra y colab., publicaron en 2002, que la infusión iv de alopurinol disminuye el consumo mitocondria de oxígeno y aumenta la eficiencia mecánica en el corazón de los perros. Hace un par de años, Ukai y colaboradores (Ukai, Cheng et al. 2001) demostraron también que el alopurinol aumenta la capacidad contráctil de la dobutamina en perros tras el ejercicio físico. Estos resultados y los de otros autores (Hare, 2001), parecen indicar que exista una correlación entre actividad XO e inducción de apoptosis por un lado y actividad mitocondrial y producción del ATP por otro lado. Todos estos resultados, junto con nuestros hallazgos previos nos indujeron a determinar la actividad y la expresión de la enzima XO en mitocondrias

aisladas. Los resultados de la Figura R.21. y R.22. indican que existe un aumento de la expresión de la expresión de la enzima XO en mitocondrias procedentes de ratas 12 o 24 horas tras el destete. La administración del alopurinol no cambia, como cabría de esperar la expresión de la enzima XO. Si embargo como se aprecia en los resultados de la Figura R.25. también se observa un aumento de la actividad de la XO en mitocondria a las 24 horas tras el destete.

Es evidente que el aumento de la actividad XO en muestras procedentes de mitocondrias aisladas de glándula mamaria podría ser una contaminación procedente de restos del extracto citoplasmático. Para excluir dicha posibilidad se determinó la expresión de alfa-tubulina como marcador citoplasmático. La Figura R26 demuestra que no existe contaminación de muestra citosólica en los precipitados de mitocondrias. Mientras que sin embargo en las muestras correspondientes del citosol si que se expresa de forma constitutiva, como era de esperar, la proteína alfa-tubulina. Por tanto la actividad de la XO que estamos viendo no parece ser debida a la contaminación citosólica

2. Efecto del alopurinol sobre la actividad de la XO en mitocondrias de glándula mamaria

Las mitocondrias aisladas fueron incubadas durante 40 min a 37°C con soluciones de alopurinol de 50 ó 100µM. Ambas concentraciones fueron capaces de inhibir la actividad xantina oxidasa procedente de mitocondrias aisladas de glándula mamaria destetada. Por tanto el alopurinol es capaz de inhibir a la forma mitocondrial de XO.

Sanganahalli en 2005 muestra en un modelo experimental en cerebro de rata, que el tratamiento con alopurinol, es capaz de inhibir la actividad de la XO citosolica, reduciendo la producción de ROS e inhibiendo la despolarización mitocondrial. El mismo autor muestra que, la XO controla el flujo de Ca²⁺ a nivel de receptores glutamato de la membrana mitocondrial junto a las enzimas NOS y PLA2 (fosfolipasa A2). Nuestros resultados están en línea con los de Sanganahalli y explican la importancia de la XO en los cambios funcionales mitocondriales, nuestro trabajo localiza la enzima XO dentro de la mitocondria subrayando la importancia de la misma en los procesos fisiológicos y patológicos de la mitocondria.

3. Parámetros de estrés oxidativo dentro de la mitocondria de glándula mamaria

Una vez visto que la enzima se expresa en la mitocondria y que tiene actividad máxima a las 24 horas tras el destete, decidimos estudiar el papel que podría tener sobre el estrés oxidativo mitocondrial.

Como parámetro de estrés oxidativo dentro de la mitocondria elegimos medir la presencia de las proteínas nitradas y la velocidad de la producción de peróxidos tanto al nivel de la cadena respiratoria, como de la propia enzima XO.

3.1. Proteínas nitradas en mitocondrias de glándula mamaria

En la Figura R.27. se realiza un Western blot de proteínas nitradas procedentes de mitocondrias aisladas de glándula mamaria, control y 24 horas tras el destete. Existe un aumento de proteínas nitradas de distintos pesos moleculares tanto de proteínas entre 10-20kDa, como de proteínas entre 20-30kDa. El destete induce un aumento de la expresión de estas proteínas. Como habíamos dicho anteriormente la XO es una enzima que genera oxido nítrico y por tanto podrá dar subsiguientemente un aumento de proteínas nitradas. Berry y Hare en 2004 en una amplia revisión, destacan la importancia de la XO en la patología cardiovascular, el mecanismo molecular y las implicaciones fisiopatológicas (hipertensión arterial, insuficiencia cardiaca, disfuncionalidad endotelial), dado que la enzima es una fuente importante de RNS al nivel del endotelio vascular. Por lo tanto el aumento de la expresión de proteínas nitradas (cuantificadas en la Figura 28A y 28B) parece ser debido al aumento de la actividad de la XO tras el destete en la mitocondria. El aumento significativo en la nitración de las proteínas de bajo peso molecular en las mitocondrias destetadas a 24 horas, coincide con el aumento significativo en la actividad mitocondrial de la XO **Figura D.7.**

3.2. Efecto del alopurinol sobre la producción de peróxidos al nivel de la cadena respiratoria mitocondrial

La mitocondria representa la clave en la vía intrínseca de la apoptosis. Durante la apoptosis la mitocondria sufre distintos cambios: pérdida del potencial de membrana mitocondrial, liberación de activadores de las caspasas (citocromo c), cambios en el transporte de electrones, alteración del mecanismo de oxido-

reducción celular y la participación de las proteínas pro y antiapoptóticas Bcl-2 (Breckenridge 2003).

Diversos autores muestran que los ROS de origen mitocondrial son capaces de producir daño al nivel del DNA mitocondrial correlacionándolo con el proceso de envejecimiento, (Gredilla 2005, Barja 2004, Drew 2004, Sastre 2003) y con procesos fisiológicos de apoptosis (Pollack 2001,2002).

Actividad XO
(mU/mg prot)

XO mitocondrial

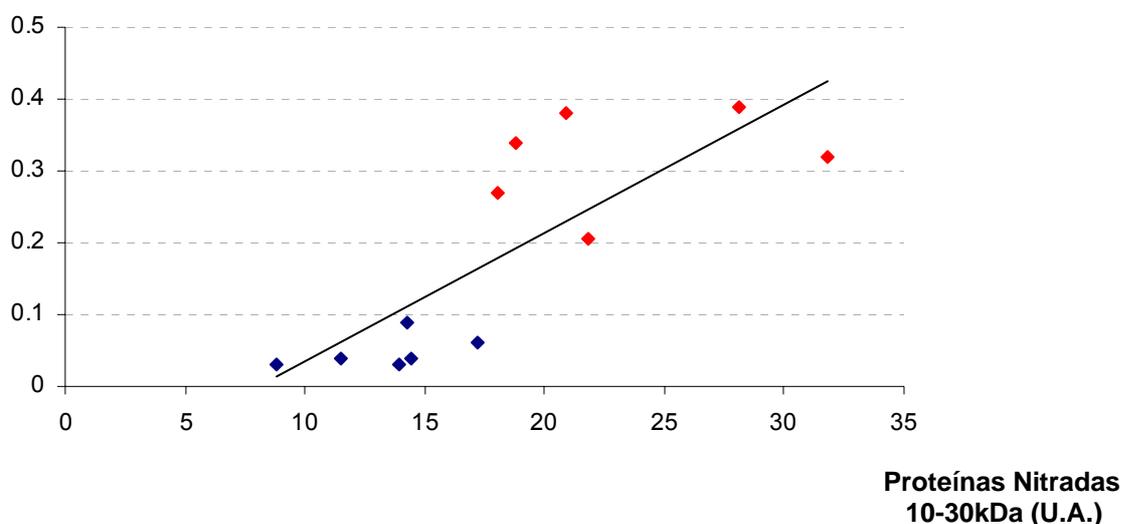


Figura D.7. Correlación entre la expresión de proteínas nitradas de bajo peso molecular (10-30kDa) y la actividad de la enzima XO en mitocondrias aisladas de glándula mamaria de rata

- Representa las mitocondrias aisladas de glándula mamaria control controles
- Representa las mitocondrias aisladas de glándula mamaria destetada a las 24 horas

En nuestro modelo la administración del alopurinol no modifica la velocidad de producción de peróxidos en la cadena respiratoria mitocondrial cuando se utilizaron sustratos energéticos a nivel del complejo I, ni a nivel de complejo III. Tanto en la mitocondrias procedentes de glándulas lactantes como en las destetadas. Lo que indica que el aumento en la actividad de la XO no afecta a la producción de peróxidos a partir de los precursores de la cadena de transporte electrónico, así como las Figuras R.30A. y B, Figura R.31A. y B. la muestran. Pero eso no excluye la posibilidad de producción de radicales libres de oxígeno de tipo peróxido por la actividad de la propia enzima. Por lo tanto el paso siguiente fue darle a la enzima un sustrato propio adecuado y medir la producción de los

peróxidos para las mitocondrias procedentes de glándula mamaria lactante y destetada.

3.3. La enzima XO fuente de peróxidos al nivel mitocondrial

Incubando las mitocondrias con una solución de xantina 100 μ M volvemos a medir la producción de peróxidos y observamos como la velocidad de producción aumenta con un sustrato específico para la XO. La administración del alopurinol disminuye la formación de dichos radicales libres tanto en controles como en las mitocondrias procedentes de ratas destetadas, las Figuras R32A y B lo muestran.

4. Efecto de la actividad de la enzima XO sobre la liberación del citocromo c en mitocondrias de glándula mamaria durante su involución.

Con el fin de estudiar el posible papel de la XO en la mitocondria durante el proceso apoptótico estudiamos la presencia de citocromo c en las mitocondrias tras el destete los resultados presentes en la Figura R.33. y R.34. muestran un descenso del citocromo c a las 12 del destete indicando la inducción del proceso apoptótico el alopurinol fue capaz de revertir, el efecto experimentado a las 12 horas. Estos resultados necesitan ser corroborados con estudios más profundos donde se analice el citocromo c citosólico y su correlación con el grado de apoptosis celular.

El citocromo c, liberado por la mitocondria, representa la principal vía de activación de las caspasas en el mecanismo apoptótico. El citocromo c puede amplificar o acelerar otras vías de la apoptosis como sería la de los receptores DR (death receptor) y la vía mediada por los linfocitos T citotóxicos. Es por tanto uno de los mediadores más conspicuos en el proceso de apoptosis.

Los resultados presentados en la segunda parte de la tesis parecen indicar que en las mitocondrias existe actividad xantina oxidasa y que esta es inhibible por el alopurinol. La presencia de XO en la mitocondria supondría que la producción de ROS por la mitocondria no es debida únicamente a la cadena de transporte electrónico. Estos resultados deben ser contrastados en otros tejidos y en otras situaciones fisiológicas como el envejecimiento o el ejercicio físico.

SUMMARY OF RESULTS AND DISCUSSION

SUMMARY OF RESULTS AND DISCUSSION

ROLE OF XANTHINE OXIDASE AS A REGULATOR OF APOPTOSIS: A STUDY IN THE RAT MAMMARY GLAND (Papel regulador de la enzima Xantina Oxidasa en el proceso apoptótico. Estudio en glándula mamaria de rata)

Apoptosis is an active physiological cell death mechanism that controls cell populations during embryogenesis, immune response, hormone regulation, and normal tissue homeostasis. Changes in the mechanism of apoptosis are also associated with the pathophysiology of cancer, AIDS and neurodegenerative diseases. Although apoptosis is a well defined morphological process, the biochemical mechanisms involved remain under investigation. It is well known that the cellular redox status modulates various aspects of cellular function. In addition, several reports have emphasized the role of oxidative stress and nuclear DNA damage in apoptosis.

The first part of my thesis presents the role of Xanthine OxidaseReductase (XOR) in apoptosis in the mammary gland tissue of the rat after weaning.

The second part, proposes the possible localization of Xanthine Oxidase (XO) in mitochondria and its involvement in the apoptotic process.

I used three-month-old Wistars rats in my study. The lactating mammary glands were from control (unweaned) and 12, 24 and 48 hour weaned rats without (W) and with 120-150mg Allopurinol p.o. administration (WA).

XOR is the key enzyme in the catabolism of purines, catalysing the oxidation of hypoxanthine to xanthine and xanthine to uric acid. The protein is the product of the single gene which is located in the cytoplasm of various cell types. In its holo-enzymic form, XOR has a molecular mass of 300kDa. It is a molybdoflavoprotein which exists in two interconvertible forms, xanthine dehydrogenase (XDH) and xanthine oxidase (XO). The former uses NAD^+ as the acceptor of reducing equivalents whereas the latter transfers them to molecular oxygen. XDH can be converted into XO, either irreversibly

by proteolysis, or reversibly through oxidation of crucial cysteine residues. In various pathological conditions, the XO form of XOR is believed to play an important role in the processes that lead to tissue damage because of its ability to reduce oxygen to the toxic superoxide anion species. On the other hand, under physiological conditions, XOR may have a cytoprotective action against local oxidative stress, since the final product of the activity of the enzyme is uric acid, a strong antioxidant.

In any case, XOR is one of the major sources of reactive oxygen and nitrogen species (ROS, RNS) which are mainly present at the level of capillary endothelial cells, low but measurable amounts of XOR activity are found in various cell types. In the mouse, high levels of the protein are present in the enterocytes lining, the proximal tract of the small intestine, as well as in a subpopulation of hepatocytes and in the alveolar cells of the lung.

Tissue and cell-specific expression of the enzyme indicate that expression of the protein is highly regulated. The XOR gene is transcriptionally up-regulated by bacterial, lipopolysaccharide, the tumor necrosis factor and type I and type II interferon in various mouse tissues and mammalian cell lines.

Significant levels of XOR activity are found in the milk of humans and various other mammals. XOR is produced in the mammary gland, however, the endogenous stimuli and the molecular mechanisms responsible for the expression of XOR in the mammary gland are still unknown.

I. ROLE OF XOR IN APOPTOSIS IN THE MAMMARY GLAND TISSUE OF THE RAT AFTER WEANING

1. Induction of the Xantina Oxidase-Reductasa (XOR) activity in the physiological involution of the mammary gland of rat

The results collected in the first part of the chapter emphasize the importance of the XOR as a source of free radicals in the apoptosis of the mammary gland of the rat.

1.1. Presence and activity of the XOR in the mammary gland

In 1977, Mather et al. located XOR in the secretion vesicles secretion of the mammary gland of the cow and since then it has been considered an important component of milk. Later, in 1981 Jarasch described the enzyme in the glandular epithelium and in the endothelium capillary in the mammary gland of the cow. Then in 1983, Bruder et al. located XO using antiXO IgG in the milk of humans and other mammals. Once located in the mammary gland a number of potential roles were suggested for the enzyme: the antibacterial, in mamogenesis and lactogenesis (Hayden, Brennan et al. 1991).

The results we obtained show the presence of the enzyme in the mammary gland of the rat in regression. The results collected in Figure R.1. and Figure R.2. show that the enzyme is present in the control mammary gland samples and also at the different times studied after weaning.

Several authors (Mather, 1977; Jarasch, 1981) published similar results regarding control mammary gland of different species.

This lack of difference in the expression of the enzyme between the control and the weaned rats contrasts with the great increase in the activity, which is evident 6h and 24h after weaning, as it is shown in Figure R.4.

Moreover a significant increase in the activity of the form is produced in deshidrogenasa (XDH) of the enzyme at 24 hours after weaning. The fact that an increase of the activity is produced, but not of the expression of the enzyme, indicates an increase of the phosphorylation of the oxidized form of the enzyme (Kayyali, 2001).

The causes of the specific increase in XO activity after weaning are due to processes of unspecific proteolysis, which occur during apoptosis in the mammary gland of the rat (Mazurek, 1999). Different authors have shown that during the regression of the mammary gland a great increment of the index of apoptotic cells occurs (Esteve, 1999; Quarrie 1995, 1996; Blatckford, 1999; Motyl, 2001).

In order to show that the above-mentioned increase in XO activity was the regression of the gland and not to the increase of the concentration of milk after weaning, we determined the concentration of lactose in all the samples. Figure R.5. shows a significant increase in the concentration of lactose at 6hours after weaning which progressively descended to those of the control at 24 hours.

Figure S.1. shows the correlation between the activity of the XO and the concentration of lactose in the samples.

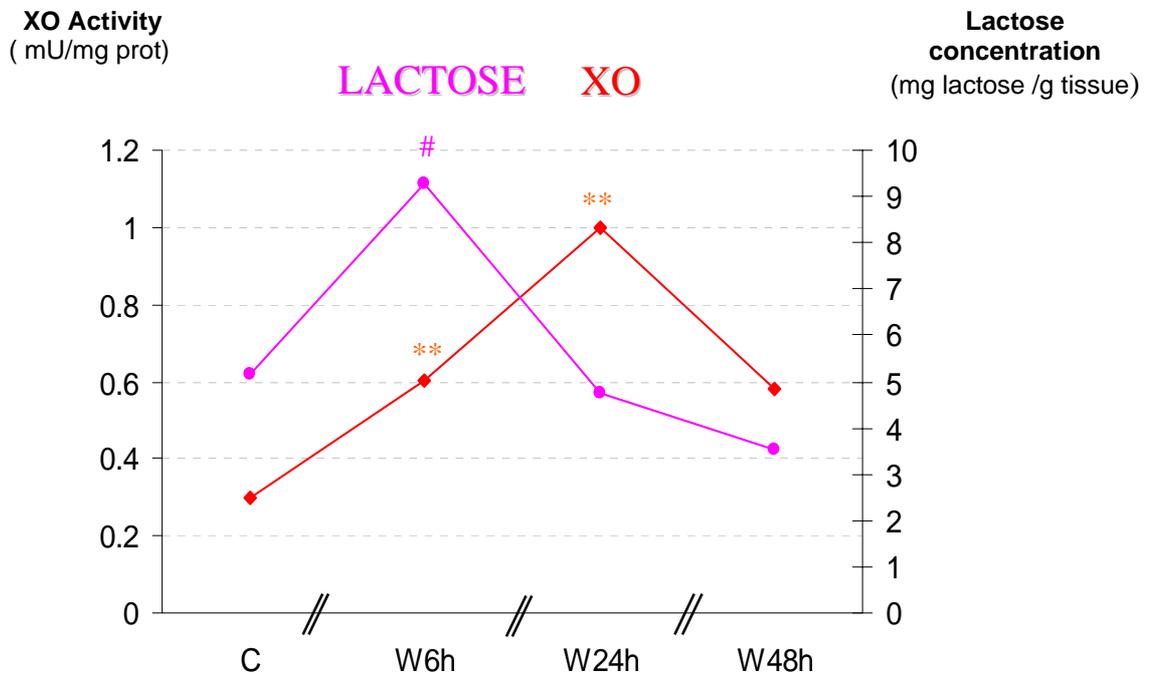


Figure S.1. Correlation between the activity of the XO and the concentration of lactose in the mammary gland homogenates

- Represents the activity of XO in the samples of mammary gland homogenate: controls (C), weaned at 6, 24 and 48hours (W) for a standard deviation + /- pertaining to n=4-9. The statistical significance is expressed as (**) $p < 0.01$ vs control.
- Represents the concentration of the lactose in the mammary gland homogenates, during physiological regression. The values are expressed as average + /- standard deviation pertaining to $n = 3$. The statistical significance is expressed as (#) $p < 0.05$ vs control.

These results show that the increase in XO activity, which was maximum at 24 hours after weaning, was not due to the accumulation of milk, because the concentration of the lactose was lower than that of the control at that time: the effect is specific to the regression process in the mammary gland (Marti, 1997).

2. The activity of the XO enzyme as a considerable source of oxidative stress during weaning

To demonstrate that the increase in XO activity is produced after weaning as a specific effect and not due to the accumulation of milk, we determined if this increase in activity generated a situation of oxidative stress in the mammary gland. Firstly we used a Western blot to determine nitrate proteins, given that the active places of the enzyme, the Mo and the FAD, are sources of NO production. The results shown in Figures R.6. and R7 present the increase of nitrate protein at 6 and 24 hours after weaning, exactly when XO is situated at its peak of activity. **Figure S.2.** shows this correlation.

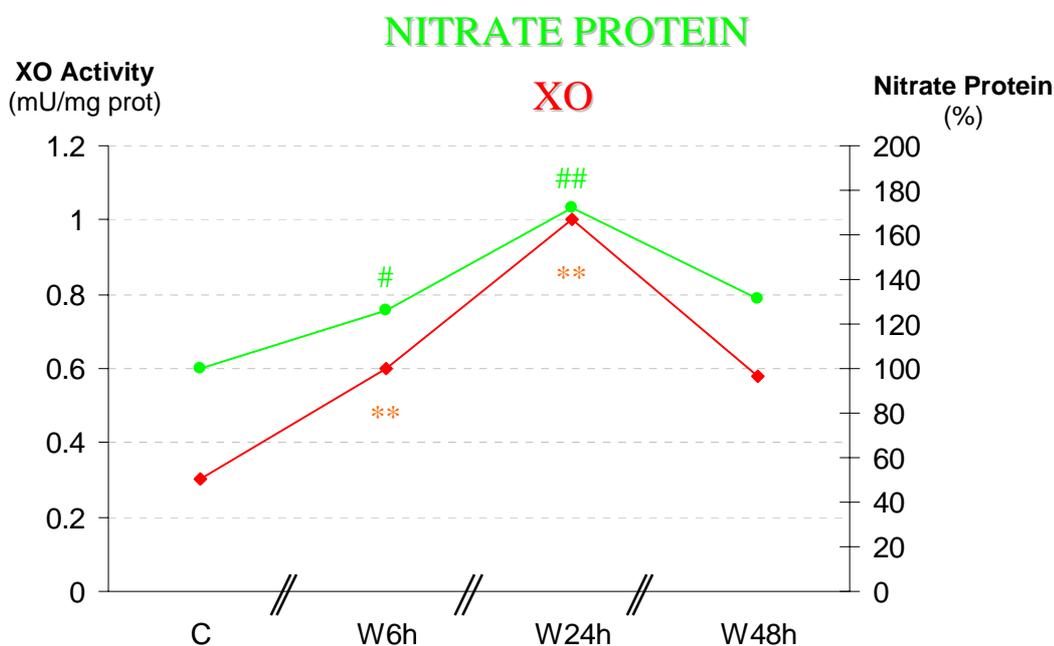


Figure S.2. Correlation between XO activity and densitometry of the Western blot of nitrate proteins of low molecular weight in the homogenates of the mammary gland in the rat

- Represents the XO activity in the samples of mammary gland homogenate: controls (C), weaned at 6, 24 and 48 hours (W) for a standard deviation + /- pertaining to n=4-9. The statistical significance is expressed as (**) $p < 0.01$ vs control.
- Represents the values of the densitometry of the Western blot of nitrate proteins, of low molecular weight in the samples of mammary gland homogenate in physiological regression. The values are expressed as average + /- standard

deviation pertaining to $n = 4$. The statistical significance is expressed as (#) $p < 0.05$ and (##) $p < 0.01$ vs control

Besides determining the presence of nitrate proteins as a marker of oxidative stress, we also determined the glutathione quotient which is another classical parameter of oxidative stress. Consequently, we determined the concentration of GSH, GSSG and we calculated the GSSG/GSH quotient.

The increase in oxidative stress is due to a decrease in the concentration of GSH in the gland and to an increase of oxidized glutathione, as shown in **Figure S.3**.

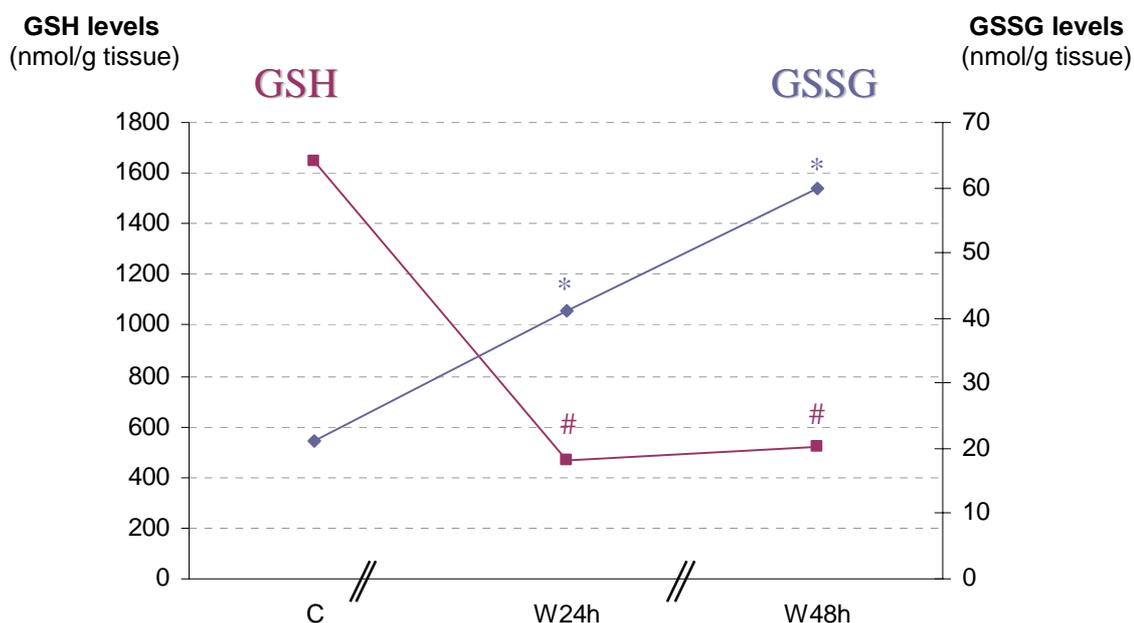


Figure S.3. Correlation between the levels of GSH and GSSH in the mammary gland homogenate in the rat

- Represents the levels of GSH in the homogenates of mammary gland controls (C), weaned to 24 and 48 hours (W) for a standard deviation \pm pertaining to $n = 8$. The statistical significance is expressed as (*) $p < 0.05$ vs control.
- Represents the levels of GSSH in the mammary gland homogenates in physiological regression. The values are expressed as average \pm standard deviation pertaining to $n = 8$. The statistical significance is expressed as (#) $p < 0.05$ vs control.

It is known that the xantine-xantine oxidase system is usually used in *in vitro* experiments, to generate situations of oxidative stress. What we observe here is a physiological situation of the same state, in which the XO enzyme after weaning

produces a situation of oxidative stress that could induce apoptosis. In order to demonstrate XO really is a source of free radicals and that the effect of XO really is of physiological importance, we used allopurinol, to try to clarify the importance of the role of XO in the involution of the mammary gland.

The results in Figure R.9. show a decrease in the activity of XDH and XO after the administration of allopurinol in accordance with the protocol described in both the corresponding chapter on the mammary gland of rats done before weaning, controls, and at different times after weaning. Similar results are also observed in plasma from venous blood, as shown in Figure R.10. No change in the expression of XO exists when Allopurinol is used as an inhibitor.

Figure R.13. shows how allopurinol produces a significant decrease in the GSSG/GSH quotient, i.e. the XO activity was one of the causes that induced oxidative stress in the mammary gland after weaning. Some articles correlate the processes of ischemia –reperfusion with the induction of apoptosis in different tissues (Quindry, French et al. 2005; Zang, Fong et al. 2005).

3. Involvement of XO in the process of cell death by apoptosis in the mammary gland of the rat after weaning

As XO was one of the possible causes of oxidative stress we and other authors, observed in the mammary gland after weaning and in light of the fact that allopurinol was an inhibiting mechanism of XO activity, we decided to test our theory and to try to show if XO activity is of physiological importance and if it is the cause of apoptosis in the mammary gland of the rat. Therefore, we inhibited XO with allopurinol and by using the TUNEL technique and electrophoresis, we observed the typical morphological aspects, at the late phase of the apoptotic process also described by different authors in other models (Albi, 2004; Eastman and Barry 1992; Eastman 1995). The results presented in Figure R.14A. at 24hours and R.14B. at 48 hours after weaning, show the number of apoptotic cells that diminish after processing with allopurinol.

Figure R.14. show how a decrease in the number of apoptotic cells from 66% at 24h after weaning (A), and from 64% at 48h after weaning (B) was obtained with allopurinol.

The electrophoretic profile correlated with the morphologic aspect. We obtained a decrease in the “apoptotic ladder”. This means, that XO was involved in the apoptotic process in the mammary gland of the rat after weaning.

4. Signalling pathways in the apoptotic process mediated by XO

4.1. XO activity and MAPKs pathways

One of the intracellular signalling pathways mediated by oxidative stress is the activation of MAPKases.

Studies have been published recently on different models, like that of physical exercise (Gomez-Cabrera, 2005), and pancreatitis (Pereda, 2004) that show that the inhibition of XO with allopurinol causes a decrease in the signalling pathways of the MAPK. But there has been no study that correlates the activity of XO with the signalling of MAPKases in the apoptotic process. Therefore we decided to study the possible role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 in the induction of the apoptotic process.

Marti and cols. in 1999 reported on the role of JNK in the regression of the mammary gland of the mouse. Together with protein kinase A (PKA), JNK is induced during lactation and its activity increases during the first phase of the regression, with a peak of activity on the third day of regression in the mammary gland of the mouse.

Zarubin and cols. (2005) in their extensive review on the p38, demonstrate the involvement of the same in the apoptotic process; moreover p38 is able to regulate the activity of caspases (Henkart, 1996; Huary, 1997 and Cardone 1997).

Up to now there has been no study that shows the role of JNK in the mammary gland of the rat, neither regarding its development nor its regression. Figure R16 studies the expression of JNK in the mammary gland before and after weaning, and after the utilization of the allopurinol. The results show that the expression of kinases does not change during the weaning process with regard to the control mammary glands; furthermore the administration of allopurinol does not produce any change in protein expression. Therefore there are no changes in the expression of JNK and JNK expression is not of physiological importance in the apoptotic process in our model. Nevertheless, when we studied the phosphorylation of JNK, which is in fact the active form of the enzyme, we observed an increase in the activity, above all at 6 and 12 hours

after weaning. However, allopurinol produces no effect on phosphorylation, which means that XO is not the cause of changes in the phosphorylation and it cannot regulate JNK activity.

p38 is another kinase involved in the apoptosis process induced by oxidative stress (Qin,2005;Zang 2005).It is expressed at 48 hours after weaning and allopurinol blocks the expression of p38. There are no changes in prior phases of the weaning process. Therefore these results seem to indicate that p38 is induced as a late expression, given that Allopurinol can block its expression.

4.2. XO activity and NF- κ B

The NF- κ B factor plays both a proapoptotic and antiapoptotic role simultaneously, depending on the model studied and the induction mechanisms. The NF- κ B factor family regulate the growth, the differentiation and the apoptosis in different tissues, including lymphocytes, umbilical cord, lung, liver, skin, bones and also the mammary gland (Chen 2000, Clarkson 2000, Rudolph 2000). In the mammary gland its role is evident throughout its evolution: development, lactation and involution. Watson in 2000 shows, in an *in vivo* model, that the NF- κ B inhibits apoptosis in the epithelial mammary cells and represents the most important transcriptional factor in the survival mechanism of the mammary gland in regression.

NF- κ B is considered a “checkpoint” in the apoptosis mechanism that requires the activation of other transcription factors that induce the presence of survival genes. A direct interaction exists between NF- κ B and other transcripcional factors associated with regression such as C/EBP, AP-1 and glucocorticoide receptors (Scheinman, 1995). Moreover, NF- κ B regulates the number of integrin in the adhesion cells which are known to initiate the survival of the mammary epithelium.

In our model, as can be appreciated in Figure R.19., the activated form of subunit p65 of NF- κ B increases its expression at 12 hours after weaning. Allopurinol inhibits the expression of subunit p65. We obtained similar effects to allopurinol in another physiological situations such as physical exercise (Gomez-Cabrera, 2003).

In a recent study, Zaragoza and cols. (2005), using an identical model as in this thesis, sampled the activation of factor NF- κ B in even earlier phases than those of 12 hours. NF- κ B was activated at 8 hours when it translocated in the nucleus where it was capable of activating different genes such: I κ B α and NOS-2. Other authors show that allopurinol inhibits the activity of NF- κ B in a model of liver reperfusion, showing thus the involvement of XO in the activation of the gene (Matsui, 2000).

Therefore it can be concluded that, NF- κ B is a factor that regulates the apoptotic process in its premature phases, when the apoptotic process is reversible. Its activity in our model shows that it is controlled by XO.

4.3. XO activity and p53

Another fundamental regulating factor in the process of apoptosis, as mentioned in the introduction is p53. P53 is a tumor-suppressing gene, called the “genome guardian”, that mainly acts at two levels: on the one hand it blocks the cell cycle, preventing cells with DNA damage from entering the division phase and on the other hand, p53 is a powerful instigator of the apoptotic process. The regulation and the function of the tumor-suppressing factor p53 have been studied extensively due to its critical role in the maintenance of the stability of DNA after genotoxic stimuli. Numerous studies on the mammary gland demonstrate the involvement of p53 in the pathology of this gland, especially in breast cancer. There are also studies that show the role of p53 in the regression of the mammary gland and its proapoptotic role during this process. Factors of physiological stress such as hypoxia, the depletion of nucleotide, the redox status or the loss of intercellular contact, are factors that induce the activation of p53 (Attardi, 2005; Slee, 2004; Haupt, 2003).

During involution, the high metabolic demand is able to produce alterations in the redox status of the mammary gland which can activate p53. The stasis of the milk in the mammary gland of the mouse, during its regression determines the fast expression of gene Trp53, which suggests that the accumulation of milk represents a stimulus to induce apoptosis (Strange, Li et al. 1992). Weaning the mammary gland produces fast induction of p53 mRNA and its protein in the mouse. Gene p21/WAF1 (Cdkn 1 a) is activated by the p53, which responds to the stasis of the milk. Therefore it is considered that the tumor-suppressing gene Trp53 can be regulated by physiological stimuli and

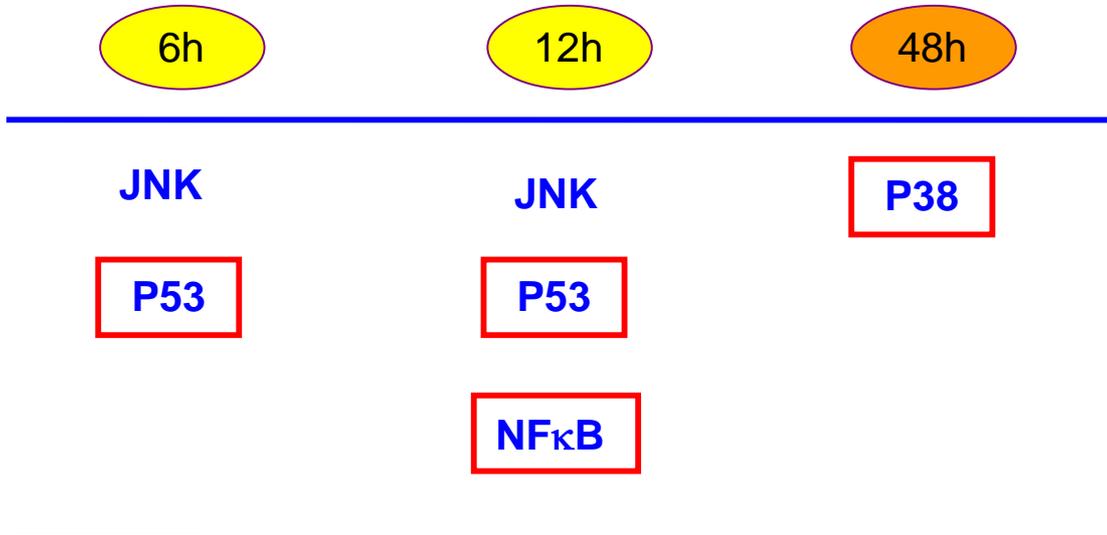
that Cdkn1 represents an endogenous reporter in the activity of p53 in the epithelium cells of the mammary gland.

We determined the expression of p53, specifically phosphorilate form of p53 (the active form) using Western blotting. Figure R. 20. shows that weaning, as was to be expected, produces an increase of the expression of p53 phosphorilate form, as early as at 6 hours.

Other authors, Zaragoza aand cols.(Zaragoza, Garcia et al. 2003) have shown induction of p53 at times as early as 2 or 3 hours. Our results correlate with these results. Allopurinol produces an inhibition of the expression of the phosphorilate form of p53. Therefore we can san that p53 is found activated by the oxidative stress, as has been shown by other authors (Achanta and Huang 2004; Zhang, Fong et al. 2005). Our results show that p53 can be regulated by XO as a source of free radicals in early phases and that it regulates the apoptotic process in the mammary gland physiologically involution.

The results collected up to now show that XO activity is induced in phases as early as 6 hours after weaning and that allopurinol is capable of blocking its activity in the mammary gland. The blockade of XO activity serves as tool to show the important effect of allopurinol on different levels: it blocks apoptosis as shown by the TUNEL technique and by the electrophoresis and at the same time we have been able to observe how the inhibition of XO activity blocks initially the expression of the phosphorilate form of p53 (at 6 and 12hours). Later some other factors like p38 or NF-kB can also be blocked by allopurinol. **Figure S.4.** provides a plan of the results obtained, in which the control of XO on the apoptotic mechanism in the model of mammary gland of the rat is evident.

PATHWAYS ACTIVATED AFTER WEANING IN THE MAMMARY GLAND TISSUE OF THE RAT



MECHANISM CONTROLLED BY THE XO ENZYME

Figure S.4. Pathways activated during weaning and the mechanism by which XO controls the apoptotic process in the mammary gland of the rat

-  Represents the initial phases of weaning, when the morphologic and electrophoretic changes characteristic of apoptosis do not exist
-  Represents the later phases of weaning, when the apoptotic cells and the electrophoretic changes are evident
-  Pathways activated during weaning in mammary gland in rat
-  Mechanism controlled by XO

II. XOR AND MITOCHONDRIA

Mitochondria are key organelles in the apoptotic process, given that they regulate the leakage of cytochrome c. This cytochrome is essential for constituting apoptosome and thus to initiate the activation cascade of the caspases, which will subsequently result in the digestion of the genomic DNA. Moreover, mitochondria are the origin of free radicals and a fundamental source of oxidative stress in diverse cell lines.

In 1999 our group (Esteve, 1999) reported that oxidative stress was an initial event in the apoptotic process and that the GSSG/GSH coefficient increased before morphologic changes were produced in the mammary gland. In that same work and in others (Van Houten 2005, Liu2005) it was shown that mitochondria produce oxidative stress in initial phases of the apoptotic process in different experimental models. **Figure S.5.** shows the correlation between the mitochondrial GSSG/GSH coefficient, published by our group previously (Esteve 1999) and the activity of XO in the mammary gland, determined in this work.

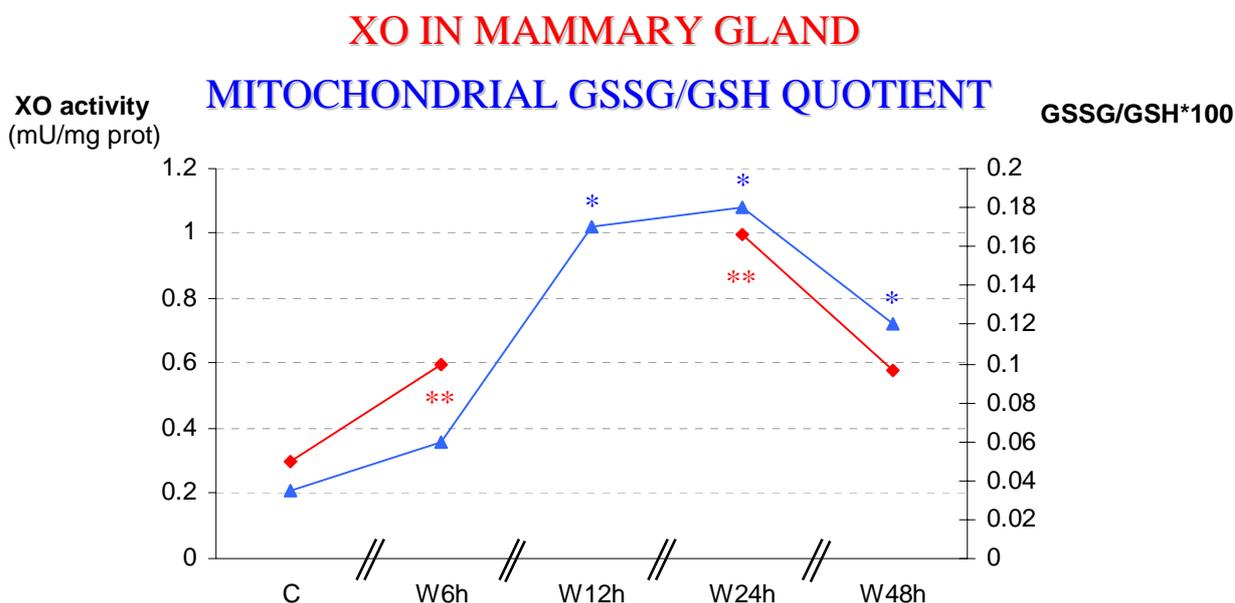


Figure S.5. Correlation between XO activity and the GSSG/GSH quotient in mitochondria in the mammary gland of the rat

- Represents the activity of XO in the samples of mitochondria taken from the mammary gland controls (C), weaned at 24hours (W) for a standard deviation + /- pertaining to n=4-9. The statistical significance is expressed as (*) p<0.05 vs control.
- Represents the GSSH/GSH quotient in the samples of mitochondria taken from the mammary gland in physiological regression. The values are expressed as average + /- standard deviation pertaining to n=5-9. The statistical significance is expressed as (#) p<0.05 vs control

In view of the similar profile of oxidative stress (quotient GSSG/GSH) in mitochondria originating in mammary glands in involution and the profile of XO activity in

the mammary tissue after weaning, we thought of the possibility that these enzymes exist and act in mitochondria.

1. Presence and activity of XO in the mitochondria of the mammary gland of the rat

In 1997, Moriwaki, Yamamoto et al. reported on sulphite oxidase, a member of this enzymatic family, that contains a Mo cofactor, which is situated in the intermembraneous space in mitochondria.

Up to now the presence of XO in the mitochondria has been debatable. In 1982, Mather detected it in the mammary tissue of the cow, and on analyzing this tissue they detected the activity of the enzyme in 0% of the nucleus, 5,65% of the mitochondrial fraction, 10,35% of the microsomal fraction and a 84% of the postmicrosomale supernatant. However, protein 150kDa is not visible in the mitochondrial fraction when an electrophoresis in SDS/poliacrilamide, followed by an immunoprecipitation of the mitochondrial fraction are carried out.

Some studies have pointed at what we suspect. In 2002, Saavedra and cols. reported that I.V. infusion of allopurinol diminishes mitochondria consumption of oxygen and increases the mechanical efficiency in the heart of dogs. In 2001, Ukai and colab. also showed that allopurinol increases the contractile capacity of the dobutamine in dogs after physical exercise. These results and those of other authors (Hare, 2001), seem to indicate a correlation between XO activity and induction of apoptosis on the one hand and mitochondrial activity and production of ATP on the other. These results in addition to our own findings induced us to determine the activity and the expression of XO in mitochondria. The results in Figure R.21. and R.22. indicate that there is an increase in the expression of XO in mitochondria isolated from mammary gland of 12 or 24 hours after weaning. The results in Figure R.25. show an increase in the activity of XO in mitochondria at 24 hours after weaning.

Obviously the increase of XO activity in samples originating in isolated mitochondria from the mammary gland could be due to contamination from cytoplasmic extract. To exclude this possibility, the expression of alpha-tubuline was determined as a cytoplasmatic marker. Figure R.26. shows cytoplasmatic contamination of the sample did not exist. As expected the samples from the cytoplasm showed high alpha tubuline

levels. Therefore the XO activity that can be seen does not seem due to cytosolic contamination.

2. Effect of allopurinol on the activity of XO in mitochondria mammary gland

Isolated mitochondria were incubated for 40 min at 37°C in 50 and 100µM allopurinol. Both concentrations were capable inhibiting XO activity originating in isolated mitochondria from the mammary gland after weaning. Therefore, allopurinol is capable of inhibiting mitochondrial XO. In 2005, Sanganahalli demonstrated in an experimental model in medular spine of the rat, that processing with allopurinol, can inhibit the activity of cytosolic XO, reducing the production of ROS and inhibiting mitochondrial depolarization. The same author demonstrated that, XO controls the flow of Ca²⁺ to glutamate at the level of the mitochondrial membrane together with enzymes NOS (nitric oxide synthase) and PLA2 (phospholipase A2). Our results coincide with those of Sanganahalli and they explain the importance of XO in functional mitochondrial changes. Our work locates XO inside the mitochondria underlining the importance of the enzyme in the physiologic and pathologic processes of mitochondria.

3. Parameters of oxidative stress inside mitochondria from the mammary gland

Once it was established that the enzyme itself expresses in mitochondria and that it performs maximum activity at 24 hours after weaning, we decided to study the effect it would have on mitochondrial oxidative stress. As an oxidative stress parameter within mitochondria, we measured the presence of nitrate proteins and the velocity of the production of both peroxides at the level of the respiratory chain, and the XO enzyme itself.

3.1. Nitrate proteins in mitochondria of the mammary gland

Figure R.27. shows a Western blot of nitrate proteins originating in mitochondria from mammary gland, in samples from controls and 24 hours after weaning. There is an

increase in nitrate proteins of a weight between 10-20kDa and 20-30kDa. As mentioned previously XO is an enzyme that generates nitric oxide and therefore can subsequently provide an increase in nitrate protein. In 2004 in an extensive review, Berry and Hare emphasize the importance of XO in cardiovascular pathology, molecular mechanisms and physiopathologic involvement (arterial hypertension, cardiac failure, endothelium dysfunction), given that the enzyme is an important source of RNS at the level of the vascular endothelium. Therefore the increase in expression of nitrate proteins (quantified in Figure R.28A. and R.28B.) seems to be due to the increase in XO activity after weaning in mitochondria. The significant increase in nitration of proteins of low molecular weight in mitochondria 24 hours after weaning coincides with the significant increase in activity mitochondrial of the **Figure S.6.**

XO activity
(mU/mg prot)

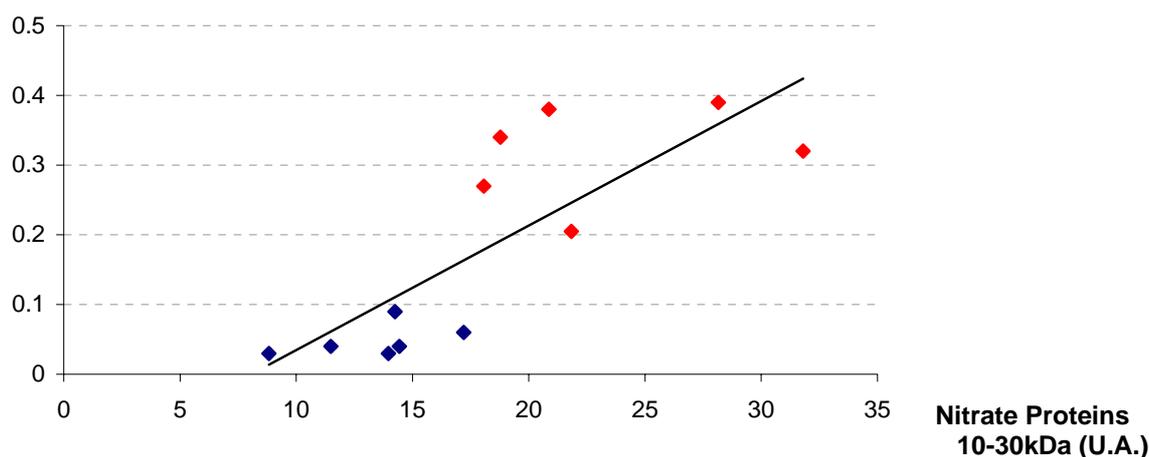


Figure S.6. Correlation between XO activity and Nitrate Protein expression (10-30kDa) in mitochondria in the mammary gland of the rat

- Represents the control mitochondria
- Represents mammary gland mitochondria 24 hours after weaning

3.2. Effect of allopurinol on the production of peroxides at the level of the mitochondrial respiratory chain

Mitochondria are key factors in the intrinsic pathway of apoptosis. During apoptosis mitochondria undergo several changes: loss of mitochondrial membrane potential, liberation of caspases activators (cytochrome c), changes in the transportation of electrons, alteration of the oxido-reduction mechanism of cells and participation of the pro- and antiapoptotic protein Bcl-2 (Breckenridge, 2003).

Several authors show that ROS from a mitochondrial origin can cause damage to DNA at the mitochondrial level correlating it with the process of ageing, (Gredilla 2005, Barja 2004, Drew 2004, Tailor 2003) and with physiological processes of apoptosis (Pollack 2001,2002).

In our model in which we used isolated mitochondria from control and 24 hours weaned mammary gland, the administration of allopurinol did not modify peroxide production velocity in the mitochondrial respiratory chain when we used energy substrates for complex I, nor did it for complex III. This means that the increase in XO activity does not affect the production of peroxides from precursors of the electronic transportation chains, as is shown in Figures R30A and B, 31 A and B. But these results do not exclude the possibility of free radical production by XO activity itself. Therefore the following step was to use a substrate of XO and to measure the production of peroxides from the mammary gland mitochondria.

3.3. XO source of peroxides at mitochondrial level

Incubating mitochondria with a solution of xanthine 100µM we measured again the production of peroxides and we observed if the velocity of production increased. The administration of allopurinol diminished the formation of free radicals in controls and weaned mitochondria, as shown in Figures R.32A. and B.

4. Effect of the activity of XO on the release of the cytochrome c from the mammary gland mitochondria during involution

In order to study the possible role of XO in mitochondria during the apoptotic process we studied the presence of cytochrome c in mitochondria after weaning. The results presented in Figure R.33. and R.34. show a decrease in cytochrome c expression at 12 hours after weaning. Allopurinol was capable of reverting and had an

effect 12 hours after weaning. These results need to be corroborated with more extensive studies in which the cytosolic cytochrome c must be analyzed in correlation with the apoptosis phases.

Cytochrome c, freed by mitochondria is the main means of activating caspase. Cytochrome c can amplify and accelerate other ways of apoptosis as the death receptors and the way mediated by T lymphocytes.

The results presented in the second part of this thesis seem to indicate that XO activities exist in mitochondria which can be inhibited by allopurinol. The presence of XO in mitochondria would mean that the production of ROS by mitochondria occurs not only due to the mitochondrial chain of electronic transportation.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La XOR es una enzima presente en la glándula mamaria de rata tanto en el pico de la lactancia como en su involución fisiológica. Su actividad aumenta tras el destete alcanzando el máximo de actividad a las 24 horas.
2. Durante la involución fisiológica en la glándula mamaria existe un estrés oxidativo tisular evidenciado por un incremento del cociente GSSG/GSH*100 que se correlaciona con la actividad de la enzima XOR.
3. La XOR esta implicada en el proceso de muerte celular por apoptosis en la glándula mamaria tras el destete.
4. El mecanismo de acción de la XOR sobre distintas vías en la regulación de la apoptosis en la glándula mamaria es: en la fase inicial por medio del NFκB y p53, y en la fase final por la fosforilación de p38. En nuestro modelo la XOR no tiene ningún efecto sobre la expresión del JNK y su implicación en el proceso apoptótico.
5. La XO se hace presente en las mitocondrias aisladas de glándula mamaria, el incremento de su actividad es significativo 24 horas tras el destete.
6. La XO es una fuente de radicales libres en la mitocondria independientemente de la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Abbadie, C., N. Kabrun, et al. (1993). "High levels of c-rel expression are associated with programmed cell death in the developing avian embryo and in bone marrow cells in vitro." *Cell* 75(5): 899-912.
- Abe, M. K., W. L. Kuo, et al. (1999). "Extracellular signal-regulated kinase 7 (ERK7), a novel ERK with a C-terminal domain that regulates its activity, its cellular localization, and cell growth." *Mol Cell Biol* 19(2): 1301-12.
- Abe, M. K., M. P. Saelzler, et al. (2002). "ERK8, a new member of the mitogen-activated protein kinase family." *J Biol Chem* 277(19): 16733-43.
- Abraham, R. T. (2001). "Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases." *Genes Dev* 15(17): 2177-96.
- Acehan, D., X. Jiang, et al. (2002). "Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation." *Mol Cell* 9(2): 423-32.
- Achanta, G. and P. Huang (2004). "Role of p53 in sensing oxidative DNA damage in response to reactive oxygen species-generating agents." *Cancer Res* 64(17): 6233-9.
- Agarwal, M. L., W. R. Taylor, et al. (1998). "The p53 network." *J Biol Chem* 273(1): 1-4.
- Akaike, T., M. Ando, et al. (1990). "Dependence on O₂- generation by xanthine oxidase of pathogenesis of influenza virus infection." *J. Clin. Invest.* 85: 739-745.
- Alarcon, R., C. Koumenis, et al. (1999). "Hypoxia induces p53 accumulation through MDM2 down-regulation and inhibition of E6-mediated degradation." *Cancer Res* 59(24): 6046-51.
- Albertini, R., S. Rindi, et al. (1996). "The effect of cornea proteoglycans on liposome peroxidation." *Arch. Biochem. Biophys.* 327(2): 207-214.
- Albi, E. and M. P. Viola Magni (2004). "The role of intranuclear lipids." *Biol Cell* 96(8): 657-67.
- Aleman, V. and P. Handler (1967). "Dihydroorotate dehydrogenase. I. General properties." *J Biol Chem* 242(18): 4087-96.
- Alpert, D., P. Schwenger, et al. (1999). "Cell stress and MKK6b-mediated p38 MAP kinase activation inhibit tumor necrosis factor-induced I κ B phosphorylation and NF- κ B activation." *J Biol Chem* 274(32): 22176-83.
- Amaya, Y., K. Yamazaki, et al. (1990). "Proteolytic conversion of xanthine dehydrogenase from the NAD-dependent type to the O₂-dependent type. Amino acid sequence of rat liver xanthine dehydrogenase and identification of the cleavage sites of the enzyme protein during irreversible conversion by trypsin." *J Biol Chem* 265(24): 14170-5.
- Ames, B. N., M. K. Shigenaga, et al. (1993). "Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 7915-7922.
- Amici, A., R. L. Levine, et al. (1989). "Conversion of amino acid residues in proteins and amino acid homopolymers to carbonyl derivatives by metal-catalyzed oxidation reactions." *J. Biol. Chem.* 264(6): 3341-3346.
- Amundadottir, L. T., S. J. Nass, et al. (1996). "Cooperation of TGF α and c-Myc in mouse mammary tumorigenesis: coordinated stimulation of growth and suppression of apoptosis." *Oncogene* 13(4): 757-65.

- Anderson, R. F., R. Hille, et al. (1986). "The radical chemistry of milk xanthine oxidase as studied by radiation chemistry techniques." *J Biol Chem* 261(34): 15870-6.
- Angermuller, S., G. Bruder, et al. (1987). "Localization of xanthine oxidase in crystalline cores of peroxisomes. A cytochemical and biochemical study." *Eur. J. Cell Biol.* 45: 137-144.
- Appella, E. and C. W. Anderson (2001). "Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses." *Eur J Biochem* 268(10): 2764-72.
- Armstrong, R. B. (1990). "Initial events in exercise-induced muscular injury." *Me. Sci. Sports Exercise* 22: 429-435.
- Arteaga, C. L., T. C. Dugger, et al. (1996). "The multifunctional role of transforming growth factor (TGF)-beta s on mammary epithelial cell biology." *Breast Cancer Res Treat* 38(1): 49-56.
- Asensi, M., J. Sastre, et al. (1994). "A high-performance liquid chromatography method for measurement of oxidized glutathione in biological samples." *Analytical Biochemistry* 217(2): 323-328.
- Ashkenazi, A. and V. M. Dixit (1998). "Death receptors: signaling and modulation." *Science* 281(5381): 1305-8.
- Ashkenazi, A. and V. M. Dixit (1999). "Apoptosis control by death and decoy receptors." *Curr Opin Cell Biol* 11(2): 255-60.
- Athar, M., C. A. Elmets, et al. (1989). "A novel mechanism for the generation of superoxide anions in hematoporphyrin derivative-mediated cutaneous photosensitization: activation of the xanthine oxidase pathway." *J. Clin. Invest.* 83: 1137-1143.
- Attardi, L. D. (2005). "The role of p53-mediated apoptosis as a crucial anti-tumor response to genomic instability: lessons from mouse models." *Mutat Res* 569(1-2): 145-57.
- Attardi, L. D., E. E. Reczek, et al. (2000). "PERP, an apoptosis-associated target of p53, is a novel member of the PMP-22/gas3 family." *Genes Dev* 14(6): 704-18.
- Atwood, C. S., M. Ikeda, et al. (1995). "Involution of mouse mammary glands in whole organ culture: a model for studying programmed cell death." *Biochem Biophys Res Commun* 207(2): 860-7.
- Ayed, A., F. A. Mulder, et al. (2001). "Latent and active p53 are identical in conformation." *Nat Struct Biol* 8(9): 756-60.
- Babior, B. M. (1978). "Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes." *N. Engl. J. Med.* 298: 659-668.
- Baeuerle, P. A. and D. Baltimore (1996). "NF-kappa B: ten years after." *Cell* 87(1): 13-20.
- Baeuerle, P. A. and T. Henkel (1994). "Function and activation of NF-kappa B in the immune system." *Annu Rev Immunol* 12: 141-79.
- Baldwin, A. S., Jr. (1996). "The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights." *Annu Rev Immunol* 14: 649-83.
- Balint, E. E. and K. H. Vousden (2001). "Activation and activities of the p53 tumour suppressor protein." *Br J Cancer* 85(12): 1813-23.
- Barja, G. (2004). "Aging in vertebrates, and the effect of caloric restriction: a mitochondrial free radical production-DNA damage mechanism?" *Biol Rev Camb Philos Soc* 79(2): 235-51.
- Bar-Peled, U., E. Maltz, et al. (1995). "Relationship between frequent milking or suckling in early lactation and milk production of high producing dairy cows." *J Dairy Sci* 78(12): 2726-36.

- Battelli, M. G., A. Abbondanza, et al. (1999). "Determination of xanthine oxidase in human serum by a competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)." *Clin Chim Acta* 281(1-2): 147-58.
- Battelli, M. G., S. Musiani, et al. (2001). "Serum xanthine oxidase in human liver disease." *Am J Gastroenterol* 96(4): 1194-9.
- Becker, B. F. (1993). "Towards the physiological function of uric acid." *Free Radical Biol. Med.* 14: 615-631.
- Becker, B. F. and E. Gerlach (1987). Uric acid, the major catabolite of cardiac adenine nucleotides and adenosine, originates in the coronary endothelium. Topics and perspectives in adenosine research. E. Gerlach and B. F. Becker. Berlin., Springer-Verlag.: 209-222.
- Beckman, J. S., J. Chen, et al. (1994). "Reactions of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite with superoxide dismutase in neurodegeneration." *Prog Brain Res* 103: 371-80.
- Beckman, J. S. and W. H. Koppenol (1996). "Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly." *Am J Physiol* 271(5 Pt 1): C1424-37.
- Beg, A. A. and D. Baltimore (1996). "An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death." *Science* 274(5288): 782-4.
- Beg, A. A., W. C. Sha, et al. (1995). "Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B." *Nature* 376(6536): 167-70.
- Behar, D., G. Czaspski, et al. (1979). "The acid dissociation constant and decay kinetics of parhydroxyl radical." *J. Phys.Chem.* 74: 3209-3215.
- Benboubetra, M., A. Gleeson, et al. (1997). "Circulating anti-(xanthine oxidoreductase) antibodies in healthy human adults." *Eur J Clin Invest* 27(7): 611-9.
- Benzi, G. and A. Moretti (1995). "Age and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the glutathione system." *Free Rad. Biol. Med.* 19(1): 77-101.
- Berry, C. E. and J. M. Hare (2004). "Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications." *J Physiol* 555(Pt 3): 589-606.
- Bird, R. P. and H. H. Draper (1984). "Comparative studies on different methods of malondialdehyde determination." *Methods Enzymol.* 105: 299-305.
- Bittner, F., M. Oreb, et al. (2001). "ABA3 is a molybdenum cofactor sulfurase required for activation of aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*." *J Biol Chem* 276(44): 40381-4.
- Blatchford, D. R., L. H. Quarrie, et al. (1999). "Influence of microenvironment on mammary epithelial cell survival in primary culture." *J Cell Physiol* 181(2): 304-11.
- Bocker, W., B. Bier, et al. (1992). "An immunohistochemical study of the breast using antibodies to basal and luminal keratins, alpha-smooth muscle actin, vimentin, collagen IV and laminin. Part II: Epitheliosis and ductal carcinoma in situ." *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 421(4): 323-30.
- Boland, M. P. (2001). "DNA damage signalling and NF-kappaB: implications for survival and death in mammalian cells." *Biochem Soc Trans* 29(Pt 6): 674-8.
- Boland, M. P., K. A. Fitzgerald, et al. (2000). "Topoisomerase II is required for mitoxantrone to signal nuclear factor kappa B activation in HL60 cells." *J Biol Chem* 275(33): 25231-8.
- Boland, M. P., S. J. Foster, et al. (1996). "Activation of NF kappa B and potentiation of TNF-induced NF kappa B activation by ceramide analogues in

- leukemic cell lines despite the absence of an observed sphingomyelinase signalling event." *Biochem Soc Trans* 24(1): 1S.
- Boland, M. P., S. J. Foster, et al. (1997). "Daunorubicin activates NFkappaB and induces kappaB-dependent gene expression in HL-60 promyelocytic and Jurkat T lymphoma cells." *J Biol Chem* 272(20): 12952-60.
 - Boland, M. P. and L. A. O'Neill (1998). "Ceramide activates NFkappaB by inducing the processing of p105." *J Biol Chem* 273(25): 15494-500.
 - Bondy, S. C. (1992). "Reactive oxygen species: relation to aging and neurotoxic damage." *Neurotoxicology* 13(1): 87-100.
 - Borel, P., P. Grolier, et al. (1998). "Oxidative stress status and antioxidant status are apparently not related to carotenoid status in healthy subjects." *J Lab Clin Med* 132(1): 61-6.
 - Boudreau, N., C. J. Sympton, et al. (1995). "Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix." *Science* 267(5199): 891-3.
 - Boudreau, N., Z. Werb, et al. (1996). "Suppression of apoptosis by basement membrane requires three-dimensional tissue organization and withdrawal from the cell cycle." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(8): 3509-13.
 - Boulton, T. G., S. H. Nye, et al. (1991). "ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF." *Cell* 65(4): 663-75.
 - Boulton, T. G., G. D. Yancopoulos, et al. (1990). "An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control." *Science* 249(4964): 64-7.
 - Bouvard, V., T. Zaitchouk, et al. (2000). "Tissue and cell-specific expression of the p53-target genes: bax, fas, mdm2 and waf1/p21, before and following ionising irradiation in mice." *Oncogene* 19(5): 649-60.
 - Boveris, A. (1977). "Mitochondrial production of superoxide radical and hydrogen peroxide." *Adv Exp Med Biol* 78: 67-82.
 - Boveris, A. and E. Cadenas (1975). "Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration." *FEBS Lett* 54(3): 311-4.
 - Boveris, A. and B. C. Chance (1973). "The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen." *Biochem J* 143: 707-716.
 - Boveris, A., L. E. Costa, et al. (2000). "Regulation of mitochondrial respiration by oxygen and nitric oxide." *Ann N Y Acad Sci* 899: 121-35.
 - Boveris, A., N. Oshino, et al. (1972). "The cellular production of hydrogen peroxyde." *Biochem. J.* 128: 617-630.
 - Bowen, J. F. (1972). "Apoptosis or programmed cell death?" *Cell Biology International* 17(4): 239-257.
 - Brancolini, C., M. Benedetti, et al. (1995). "Microfilament reorganization during apoptosis: the role of Gas2, a possible substrate for ICE-like proteases." *Embo J* 14(21): 5179-90.
 - Brantley, D. M., C. L. Chen, et al. (2001). "Nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) regulates proliferation and branching in mouse mammary epithelium." *Mol Biol Cell* 12(5): 1445-55.
 - Brantley, D. M., F. E. Yull, et al. (2000). "Dynamic expression and activity of NF-kappaB during post-natal mammary gland morphogenesis." *Mech Dev* 97(1-2): 149-55.

- Breckenridge, D. G. and D. Xue (2004). "Regulation of mitochondrial membrane permeabilization by BCL-2 family proteins and caspases." *Curr Opin Cell Biol* 16(6): 647-52.
- Bredt, D. S., C. E. Glatt, et al. (1991). "Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase." *Neuron* 7(4): 615-24.
- Breen, A. P. and J. A. Murphy (1995). "Reactions of oxyl radicals with DNA." *Free Rad. Biol. Med.* 18(6): 1033-1077.
- Bruder, G., H. W. Heid, et al. (1983). "Immunological identification and determination of xanthine oxidase in cells and tissues." *Differentiation* 23(3): 218-25.
- Burlacu, A. (2003). "Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins." *J Cell Mol Med* 7(3): 249-57.
- Bush, P. A., N. E. Gonzalez, et al. (1992). "Nitric oxide synthase from cerebellum catalyzes the formation of equimolar quantities of nitric oxide and citrulline from L-arginine." *Biochem Biophys Res Commun* 185(3): 960-6.
- Byers, T. (1993). "Vitamin E supplements and coronary heart disease." *Nutr. Rev.* 51: 333-345.
- Cadenas, E., A. Boveris, et al. (1977). "Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADPH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria." *Arch. Biochem. Biophys.* 180: 248-257.
- Caelles, C., A. Helmborg, et al. (1994). "p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes." *Nature* 370(6486): 220-3.
- Cao, Y., G. Bonizzi, et al. (2001). "IKK α provides an essential link between RANK signaling and cyclin D1 expression during mammary gland development." *Cell* 107(6): 763-75.
- Cao, Y. and M. Karin (2003). "NF- κ B in mammary gland development and breast cancer." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 8(2): 215-23.
- Capdevila, J., N. Chacos, et al. (1981). "Liver microsomal cytochrome P-450 and the oxidative metabolism of arachidonic acid." *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(9): 5362-6.
- Cardone, M. H., G. S. Salvesen, et al. (1997). "The regulation of anoikis: MEKK-1 activation requires cleavage by caspases." *Cell* 90(2): 315-23.
- Carpani, G., M. Racchi, et al. (1990). "Purification and characterization of mouse liver xanthine oxidase." *Arch Biochem Biophys* 279(2): 237-41.
- Carter, A. B., K. L. Knudtson, et al. (1999). "The p38 mitogen-activated protein kinase is required for NF- κ B-dependent gene expression. The role of TATA-binding protein (TBP)." *J Biol Chem* 274(43): 30858-63.
- Casciola-Rosen, L., D. W. Nicholson, et al. (1996). "Apopain/ CPP32 cleaves proteins that are essential for cellular repair: a fundamental principle of apoptotic death." *J Exp Med* 183(5): 1957-64.
- Catz, S. D. and J. L. Johnson (2001). "Transcriptional regulation of bcl-2 by nuclear factor kappa B and its significance in prostate cancer." *Oncogene* 20(50): 7342-51.
- Cavanaugh, J. E., J. Ham, et al. (2001). "Differential regulation of mitogen-activated protein kinases ERK1/2 and ERK5 by neurotrophins, neuronal activity, and cAMP in neurons." *J Neurosci* 21(2): 434-43.

- Cazzaniga, G., M. Terao, et al. (1994). "Chromosomal mapping, isolation, and characterization of the mouse xanthine dehydrogenase gene." *Genomics* 23(2): 390-402.
- Chambers, D. E., D. A. Parks, et al. (1985). "Xanthine oxidase as a source of free radical damage in myocardial ischemia." *J Mol Cell Cardiol* 17(2): 145-52.
- Chan, H., D. P. Bartos, et al. (1999). "Activation-dependent transcriptional regulation of the human Fas promoter requires NF-kappaB p50-p65 recruitment." *Mol Cell Biol* 19(3): 2098-108.
- Chang, F., L. S. Steelman, et al. (2003). "Regulation of cell cycle progression and apoptosis by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway (Review)." *Int J Oncol* 22(3): 469-80.
- Chang, L. and M. Karin (2001). "Mammalian MAP kinase signalling cascades." *Nature* 410(6824): 37-40.
- Chapman, R. S., E. K. Duff, et al. (2000). "A novel role for IRF-1 as a suppressor of apoptosis." *Oncogene* 19(54): 6386-91.
- Chapman, R. S., P. C. Lourenco, et al. (1999). "Suppression of epithelial apoptosis and delayed mammary gland involution in mice with a conditional knockout of Stat3." *Genes Dev* 13(19): 2604-16.
- Cheeseman, K. H. and T. F. Slater (1993). "An introduction to free radical biochemistry." *Br. Med. Bull.* 49(3): 588-603.
- Chen, C. L., N. Singh, et al. (2000). "Lymphocytes lacking I kappa B-alpha develop normally, but have selective defects in proliferation and function." *J Immunol* 165(10): 5418-27.
- Chong, M. J., M. R. Murray, et al. (2000). "Atm and Bax cooperate in ionizing radiation-induced apoptosis in the central nervous system." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(2): 889-94.
- Christen, S., Y. D. Bifrare, et al. (2001). "Marked elevation in cortical urate and xanthine oxidoreductase activity in experimental bacterial meningitis." *Brain Res* 900(2): 244-51.
- Chung, H. Y., S. H. Song, et al. (1999). "Modulation of renal xanthine oxidoreductase in aging: gene expression and reactive oxygen species generation." *J Nutr Health Aging* 3(1): 19-23.
- Church, W. H. and V. L. Ward (1994). "Uric acid is reduced in the substantia nigra in Parkinson's disease: effect on dopamine oxidation." *Brain Res Bull* 33(4): 419-25.
- Clark, R. S., P. M. Kochanek, et al. (1999). "Increases in Bcl-2 and cleavage of caspase-1 and caspase-3 in human brain after head injury." *Faseb J* 13(8): 813-21.
- Clarke (1990). "Development cell death:morphological diversity and multiple mechanisms." *Anat Embryol* 181: 195-213.
- Clarkson, R. W., J. L. Heeley, et al. (2000). "NF-kappaB inhibits apoptosis in murine mammary epithelia." *J Biol Chem* 275(17): 12737-42.
- Clarkson, R. W., M. T. Wayland, et al. (2004). "Gene expression profiling of mammary gland development reveals putative roles for death receptors and immune mediators in post-lactational regression." *Breast Cancer Res* 6(2): R92-109.
- Creagh, E. M. and S. J. Martin (2001). "Caspases: cellular demolition experts." *Biochem Soc Trans* 29(Pt 6): 696-702.

- Cross, A. J., P. Slater, et al. (1987). "Sodium dependent D-[3H]aspartate binding in cerebral cortex in patients with Alzheimer's and Parkinson's diseases." *Neurosci Lett* 79(1-2): 213-7.
- Czapski, G. and S. Goldstein (1995). "The role of the reactions of .NO with superoxide and oxygen in biological systems: a kinetic approach." *Free Radic Biol Med* 19(6): 785-94.
- Daniel, C. W., S. Robinson, et al. (1996). "The role of TGF-beta in patterning and growth of the mammary ductal tree." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1(4): 331-41.
- Daniel, C. W., G. B. Silberstein, et al. (1987). "Direct action of 17 beta-estradiol on mouse mammary ducts analyzed by sustained release implants and steroid autoradiography." *Cancer Res* 47(22): 6052-7.
- Das, K. C. and C. W. White (1997). "Activation of NF-kappaB by antineoplastic agents. Role of protein kinase C." *J Biol Chem* 272(23): 14914-20.
- Davies, K. J. and S. W. Lin (1988). "Oxidatively denatured proteins are degraded by an ATP-independent proteolytic pathway in *Escherichia coli*." *Free Radic Biol Med* 5(4): 225-36.
- Davies, K. J. A. (1987). "Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects." *J. Biol. Chem.* 262: 9895-9901.
- Davies, K. J. A., A. T. Quintanilha, et al. (1982). "Free radicals and tissue damage produced by exercise." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107: 1198-1205.
- Davis, M. D., D. E. Edmonson, et al. (1984). "³¹P nuclear magnetic resonance and chemical studies of the phosphorus residues in bovine milk xanthine oxidase." *Eur. J. Biochem.* 145: 237-243.
- Davis, R. J. (2000). "Signal transduction by the JNK group of MAP kinases." *Cell* 103(2): 239-52.
- De Jong, J. W., P. van der Meer, et al. (1991). "Does xanthine oxidase cause damage during myocardial ischemia?" *Bratisl Lek Listy* 92(1): 41-7.
- de Jong, J. W., P. van der Meer, et al. (1990). "Xanthine oxidoreductase activity in perfused hearts of various species, including humans." *Circ Res* 67(3): 770-3.
- Dean, R. T., S. Gieseg, et al. (1993). "Reactive species and their accumulation on radical-damaged proteins." *Trends Biochem Sci* 18(11): 437-41.
- Degli-Esposti, M. A., W. C. Dougall, et al. (1997). "The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain." *Immunity* 7(6): 813-20.
- Della Corte, E., G. Gozzetti, et al. (1969). "Properties of the xanthine oxidase from human liver." *Biochim Biophys Acta* 191(1): 164-6.
- Della Corte, E. and F. Stirpe (1968). "The regulation of rat-liver xanthine oxidase: Activation by proteolytic enzymes." *FEBS Lett* 2(2): 83-84.
- Della Corte, E. and F. Stirpe (1970). "The regulation of xanthine oxidase. Inhibition by reduced nicotinamide-adenine dinucleotide of rat liver xanthine oxidase type D and of chick liver xanthine dehydrogenase." *Biochem J* 117(1): 97-100.
- Demontis, S., M. Kurosaki, et al. (1999). "The mouse aldehyde oxidase gene: molecular cloning, chromosomal mapping and functional characterization of the 5'-flanking region." *Biochim Biophys Acta* 1489(2-3): 207-22.
- Demple, B. and J. Halbrook (1983). "Inducible repair of oxidative DNA damage in *Escherichia coli*." *Nature* 304(5925): 466-8.

- Denault, J. B. and G. S. Salvesen (2002). "Caspases: keys in the ignition of cell death." *Chem Rev* 102(12): 4489-500.
- Derijard, B., M. Hibi, et al. (1994). "JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain." *Cell* 76(6): 1025-37.
- Dhillon, A. S. and W. Kolch (2002). "Untying the regulation of the Raf-1 kinase." *Arch Biochem Biophys* 404(1): 3-9.
- Dikov, V. A., I. Alexandrov, et al. (1988). "Ultracytochemical demonstration of enzymes by reduction of potassium hexacyanoferrate (III). I. A method for demonstration of xanthine oxidase." *Acta Histochem.* 83: 107-115.
- Dizdaroglu, M. (1993). "Quantitative determination of oxidative base damage in DNA by stable isotope-dilution mass spectrometry." *FEBS Lett* 315(1): 1-6.
- Doel, J. J., B. L. Godber, et al. (2001). "Reduction of organic nitrates catalysed by xanthine oxidoreductase under anaerobic conditions." *Biochim Biophys Acta* 1527(1-2): 81-7.
- Doel, J. J., B. L. Godber, et al. (2000). "Reduction of organic nitrites to nitric oxide catalyzed by xanthine oxidase: possible role in metabolism of nitrovasodilators." *Biochem Biophys Res Commun* 270(3): 880-5.
- Dolphin, D. (1988). The generation of radicals during the normal and abnormal functioning of cytochromes P450. *Oxygen radicals in biology and medicine*. M. G. Simic, K. A. Taylor, J. F. Ward and C. Sonntag, Ed. Plenum Press.: 491-500.
- Dong, C., R. J. Davis, et al. (2002). "MAP kinases in the immune response." *Annu Rev Immunol* 20: 55-72.
- Dong, C., D. D. Yang, et al. (1998). "Defective T cell differentiation in the absence of Jnk1." *Science* 282(5396): 2092-5.
- Doroshov, J. H. and K. J. Davies (1983). "Comparative cardiac oxygen radical metabolism by anthracycline antibiotics, mitoxantrone, bisantrene, 4'-(9-acridinylamino)-methanesulfon-m-anisidide, and neocarzinostatin." *Biochem Pharmacol* 32(19): 2935-9.
- Drew, B. and C. Leeuwenburgh (2004). "Ageing and subcellular distribution of mitochondria: role of mitochondrial DNA deletions and energy production." *Acta Physiol Scand* 182(4): 333-41.
- Dudley, B. F. and G. W. Winston (1995). "p-nitrosophenol reduction by liver cytosol from ADH-positive and -negative deermice (*Peromyscus maniculatus*)." *Arch Biochem Biophys* 316(2): 879-85.
- Dumelin, E. E. and A. I. L. Tappel (1977). "Hydrocarbon gases produced during in vitro peroxidation of polyunsaturated fatty acids and decomposition of preformed hydroperoxides." *Lipids*. 12: 894-900.
- Dundas, S. R., M. G. Ormerod, et al. (1991). "Characterization of luminal and basal cells flow-sorted from the adult rat mammary parenchyma." *J Cell Sci* 100 (Pt 3): 459-71.
- Eastman, A. (1995). "Assays for DNA fragmentation, endonucleases, and intracellular pH and Ca²⁺ associated with apoptosis." *Methods Cell Biol* 46: 41-55.
- Eastman, A. and M. A. Barry (1992). "The origins of DNA breaks: a consequence of DNA damage, DNA repair, or apoptosis?" *Cancer Invest* 10(3): 229-40.
- Eicher, D. M., T. H. Tan, et al. (1994). "Expression of v-src in T cells correlates with nuclear expression of NF-kappa B." *J Immunol* 152(6): 2710-9.

- Elion, G. B., A. Kovensky, et al. (1966). "Metabolic studies of allopurinol, an inhibitor of xanthine oxidase." *Biochem Pharmacol* 15(7): 863-80.
- Emert-Sedlak, L., S. Shangary, et al. (2005). "Involvement of cathepsin D in chemotherapy-induced cytochrome c release, caspase activation, and cell death." *Mol Cancer Ther* 4(5): 733-42.
- Emoto, Y., Y. Manome, et al. (1995). "Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE-like protease in apoptotic cells." *Embo J* 14(24): 6148-56.
- English, J., G. Pearson, et al. (1999). "New insights into the control of MAP kinase pathways." *Exp Cell Res* 253(1): 255-70.
- English, J. M. and M. H. Cobb (2002). "Pharmacological inhibitors of MAPK pathways." *Trends Pharmacol Sci* 23(1): 40-5.
- Enroth, C., B. T. Eger, et al. (2000). "Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: structure-based mechanism of conversion." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(20): 10723-8.
- Epinat, J. C., S. T. Whiteside, et al. (1997). "Reconstitution of the NF-kappa B system in *Saccharomyces cerevisiae* for isolation of effectors by phenotype modulation." *Yeast* 13(7): 599-612.
- Esterbauer, H., R. J. Schaur, et al. (1991). "Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes." *Free Rad. Biol. Med.* 11: 81-128.
- Esterbauer, H. and H. Zollner (1989). "Methods for determination of aldehydic lipid peroxidation products." *Free Rad. Biol. Med.* 7: 197-203.
- Esteve, J. M., J. Momo, et al. (1999). "Oxidative damage to mitochondrial DNA and glutathione oxidation in apoptosis: studies in vivo and in vitro." *Faseb J* 13(9): 1055-64.
- Fadok, V. A. (1999). "Clearance: the last and often forgotten stage of apoptosis." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 4(2): 203-11.
- Fehrenbacher, N. and M. Jaattela (2005). "Lysosomes as targets for cancer therapy." *Cancer Res* 65(8): 2993-5.
- Fellman, V. and K. O. Raivio (1997). "Reperfusion injury as the mechanism of brain damage after perinatal asphyxia." *Pediatr Res* 41(5): 599-606.
- Fenton, H. J. H. (1894). "Oxidation of tartaric acid in the presence of iron." *J. Chem. Soc. Trans.* 65: 899-910.
- Ferguson, D. J. and T. J. Anderson (1981). "Morphological evaluation of cell turnover in relation to the menstrual cycle in the "resting" human breast." *Br J Cancer* 44(2): 177-81.
- Ferguson, J. E., A. M. Schor, et al. (1992). "Changes in the extracellular matrix of the normal human breast during the menstrual cycle." *Cell Tissue Res* 268(1): 167-77.
- Fernig, D. G., J. A. Smith, et al. (1991). "Relationship of growth factors and differentiation in normal and neoplastic development of the mammary gland." *Cancer Treat Res* 53: 47-78.
- Flint, D. J. and C. H. Knight (1997). "Interactions of prolactin and growth hormone (GH) in the regulation of mammary gland function and epithelial cell survival." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2(1): 41-8.
- Foster, R. E. and R. W. Estabrook (1993). "Is oxygen an essential nutrient?" *Annu. Rev. Nutr* 13: 383-403.
- Fraga, C. G., M. K. Shigenaga, et al. (1990). "Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 4533-4537.

- Frederiks, W. M. and H. Vreeling-Sindelarova (2002). "Ultrastructural localization of xanthine oxidoreductase activity in isolated rat liver cells." *Acta Histochem* 104(1): 29-37.
- Freeman, B. A. and J. Crapo (1982). "Biology of disease: Free radicals and tissue injure." *Lab. Invest.* 47: 412-426.
- Frei, B. (1994). "Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: Mechanisms of action." *Am. J. Med.* 97(3A): 5S-13S.
- Fridovich, I. (1986). "Oxygen radicals, hydrogen peroxide and oxygen toxicity." *Free radicals in biology.* 1. Pryor W.A. (ed) New York, Academic Press: 239-246.
- Fucci, L., C. N. Oliver, et al. (1983). "Inactivation of key metabolic enzymes by mixed-function oxidation reactions: Possible implication in protein turnover and aging." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80: 1521-1525.
- Fuchs, S. Y., V. Adler, et al. (1998). "Mdm2 association with p53 targets its ubiquitination." *Oncogene* 17(19): 2543-7.
- Fuchs, S. Y., V. Adler, et al. (1998). "JNK targets p53 ubiquitination and degradation in nonstressed cells." *Genes Dev* 12(17): 2658-63.
- Fuchs, S. Y., V. Adler, et al. (1998). "MEKK1/JNK signaling stabilizes and activates p53." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(18): 10541-6.
- Furlong, E. E., N. K. Keon, et al. (1996). "Expression of a 74-kDa nuclear factor 1 (NF1) protein is induced in mouse mammary gland involution. Involution-enhanced occupation of a twin NF1 binding element in the testosterone-repressed prostate message-2/clusterin promoter." *J Biol Chem* 271(47): 29688-97.
- Furth, P. A., U. Bar-Peled, et al. (1997). "Apoptosis and mammary gland involution: reviewing the process." *Apoptosis* 2(1): 19-24.
- Gabai, V. L., A. B. Meriin, et al. (1997). "Hsp70 prevents activation of stress kinases. A novel pathway of cellular thermotolerance." *J Biol Chem* 272(29): 18033-7.
- Galley, H. F., M. J. Davies, et al. (1996). "Xanthine oxidase activity and free radical generation in patients with sepsis syndrome." *Crit. Care Med.* 24: 1649-1653.
- Galli, S., M. I. Labato, et al. (2003). "Decreased mitochondrial nitric oxide synthase activity and hydrogen peroxide relate persistent tumoral proliferation to embryonic behavior." *Cancer Res* 63(19): 6370-7.
- Garattini, E., R. Mendel, et al. (2003). "Mammalian molybdo-flavoenzymes, an expanding family of proteins: structure, genetics, regulation, function and pathophysiology." *Biochem J* 372(Pt 1): 15-32.
- Gerbitz, K. D. (1992). "Does the mitochondrial DNA play a role in the pathogenesis of diabetes?" *Diabetologia* 35(12): 1181-6.
- Gerondakis, S., R. Grumont, et al. (1998). "The regulation and roles of Rel/NF-kappa B transcription factors during lymphocyte activation." *Curr Opin Immunol* 10(3): 353-9.
- Geymayer, S. and W. Doppler (2000). "Activation of NF-kappaB p50/p65 is regulated in the developing mammary gland and inhibits STAT5-mediated beta-casein gene expression." *Faseb J* 14(9): 1159-70.
- Giler, S., O. Sperling, et al. (1975). "Serum xanthine oxidase in jaundice." *Clin Chim Acta* 63(1): 37-40.
- Gilmore, A. P., A. D. Metcalfe, et al. (2000). "Integrin-mediated survival signals regulate the apoptotic function of Bax through its conformation and subcellular localization." *J Cell Biol* 149(2): 431-46.

- Glatigny, A. and C. Scazzocchio (1995). "Cloning and molecular characterization of *hxA*, the gene coding for the xanthine dehydrogenase (purine hydroxylase I) of *Aspergillus nidulans*." *J Biol Chem* 270(8): 3534-50.
- Godber, B., S. Sanders, et al. (1997). "> or = 95% of xanthine oxidase in human milk is present as the demolybdo form, lacking molybdopterin." *Biochem Soc Trans* 25(3): 519S.
- Godber, B. L., J. J. Doel, et al. (2000). "A new route to peroxynitrite: a role for xanthine oxidoreductase." *FEBS Lett* 475(2): 93-6.
- Godber, B. L., J. J. Doel, et al. (2001). "Suicide inactivation of xanthine oxidoreductase during reduction of inorganic nitrite to nitric oxide." *Biochem J* 358(Pt 2): 325-33.
- Godber, B. L., J. J. Doel, et al. (2000). "Reduction of nitrite to nitric oxide catalyzed by xanthine oxidoreductase." *J Biol Chem* 275(11): 7757-63.
- Godber, B. L., G. Schwarz, et al. (2005). "Molecular characterization of human xanthine oxidoreductase: the enzyme is grossly deficient in molybdenum and substantially deficient in iron-sulphur centres." *Biochem J* 388(Pt 2): 501-8.
- Goldstein, J., C. Paveto, et al. (2000). "Immuno and cytochemical localization of *Trypanosoma cruzi* nitric oxide synthase." *Biocell* 24(3): 217-22.
- Goldstein, S., G. Czapski, et al. (2000). "Tyrosine nitration by simultaneous generation of (.)NO and O-(2) under physiological conditions. How the radicals do the job." *J Biol Chem* 275(5): 3031-6.
- Golstein, P. (1997). "Cell death: TRAIL and its receptors." *Curr Biol* 7(12): R750-3.
- Gomez-Cabrera, M. C., C. Borrás, et al. (2005). "Decreasing Xanthine Oxidase Mediated Oxidative Stress Prevents Useful Cellular Adaptations to Exercise in Rats." *J Physiol*.
- Gomez-Cabrera, M. C., F. V. Pallardo, et al. (2003). "Allopurinol and markers of muscle damage among participants in the Tour de France." *Jama* 289(19): 2503-4.
- Gonzalez, F. A., A. Villegas, et al. (1995). "Bcl-2 gene rearrangement: diagnostic implications in a case of a large cell diffuse lymphoma appearing in leukemic phase." *Am J Hematol* 50(1): 69-70.
- Gordon, J. R. and M. R. Bernfield (1980). "The basal lamina of the postnatal mammary epithelium contains glycosaminoglycans in a precise ultrastructural organization." *Dev Biol* 74(1): 118-35.
- Goswami, R., J. Kilkus, et al. (2002). "CrmA protects against apoptosis and ceramide formation in PC12 cells." *Neurochem Res* 27(7-8): 735-41.
- Gottlieb, T. M., J. F. Leal, et al. (2002). "Cross-talk between Akt, p53 and Mdm2: possible implications for the regulation of apoptosis." *Oncogene* 21(8): 1299-303.
- Granger, D. N. and P. Kubes (1996). "Nitric oxide as antiinflammatory agent." *Methods Enzymol* 269: 434-42.
- Gredilla, R. and G. Barja (2005). "The Role of Oxidative Stress in relation to Caloric Restriction and Longevity." *Endocrinology*.
- Green, D. R. and G. P. Amarante-Mendes (1998). "The point of no return: mitochondria, caspases, and the commitment to cell death." *Results Probl Cell Differ* 24: 45-61.
- Green, K. A. and C. H. Streuli (2004). "Apoptosis regulation in the mammary gland." *Cell Mol Life Sci* 61(15): 1867-83.
- Greenwald, R. A. and W. W. Moy (1980). "Effect of oxygen derived free radicals on hyaluronic acid." *Arthritis Rheum.* 23: 455-463.

- Greidinger, E. L., D. K. Miller, et al. (1996). "Sequential activation of three distinct ICE-like activities in Fas-ligated Jurkat cells." *FEBS Lett* 390(3): 299-303.
- Grimm, S., M. K. Bauer, et al. (1996). "Bcl-2 down-regulates the activity of transcription factor NF-kappaB induced upon apoptosis." *J Cell Biol* 134(1): 13-23.
- Grisham, M. B., D. Jourdain, et al. (1999). "Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation." *Am J Physiol* 276(2 Pt 1): G315-21.
- Grootveld, M., E. B. Henderson, et al. (1991). "Oxidative damage to hyaluronate and glucose in synovial fluid during exercise of the inflamed rheumatoid joint. Detection of abnormal low-molecular-mass metabolites by proton-n.m.r. spectroscopy." *Biochem. J.* 273: 459-467.
- Grosvenor, C. E., M. F. Picciano, et al. (1993). "Hormones and growth factors in milk." *Endocr Rev* 14(6): 710-28.
- Grum, C. M., R. A. Ragsdale, et al. (1986). "Absence of xanthine oxidase or xanthine dehydrogenase in the rabbit myocardium." *Biochem Biophys Res Commun* 141(3): 1104-8.
- Grum, C. M., R. A. Ragsdale, et al. (1986). "Absence of xanthine oxidase or xanthine dehydrogenase in the rabbit myocardium." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 141: 1104-1108.
- Grum, C. M., R. A. Ragsdale, et al. (1987). "Plasma xanthine oxidase in patients with adult respiratory distress syndrome." *J. Crit. Care* 2: 22-26.
- Grumont, R. J., I. J. Rourke, et al. (1999). "Rel-dependent induction of A1 transcription is required to protect B cells from antigen receptor ligation-induced apoptosis." *Genes Dev* 13(4): 400-11.
- Gu, W. and R. G. Roeder (1997). "Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain." *Cell* 90(4): 595-606.
- Gu, Y., C. Sarnecki, et al. (1995). "Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by interleukin-1 beta converting enzyme and its homologs TX and Nedd-2." *J Biol Chem* 270(32): 18715-8.
- Guenette, R. S. and M. Tenniswood (1994). "The role of growth factors in the suppression of active cell death in the prostate: an hypothesis." *Biochem Cell Biol* 72(11-12): 553-9.
- Guo, K., V. Wolf, et al. (1998). "Apoptosis-associated gene expression in the corpus luteum of the rat." *Biol Reprod* 58(3): 739-46.
- Gupta, S., T. Barrett, et al. (1996). "Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors." *Embo J* 15(11): 2760-70.
- Guthikonda, S., C. Sinkey, et al. (2003). "Xanthine oxidase inhibition reverses endothelial dysfunction in heavy smokers." *Circulation* 107(3): 416-21.
- Guthikonda, S., K. Woods, et al. (2004). "Role of xanthine oxidase in conduit artery endothelial dysfunction in cigarette smokers." *Am J Cardiol* 93(5): 664-8.
- Gutteridge, J. M. and J. Stocks (1981). "Caeruloplasmin: physiological and pathological perspectives." *Crit Rev Clin Lab Sci* 14(4): 257-329.
- Haber, F. and J. Weiss (1934). "The catalytic compensation of hydrogen peroxide by iron salts." *Proc. R. Soc. London.* 147: 332-351.
- Hageman, H. H., A. Bast, et al. (1992). "Monitoring of oxidative free radical damage *in vivo*: Analytical aspects." *Chem. Biol. Interactions.* 82: 243-293.
- Hakansson, A., B. Zhivotovsky, et al. (1995). "Apoptosis induced by a human milk protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(17): 8064-8.

- Halliwell, B. (1991). "Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry and role in human disease." *Am. J. Med.* 91(3C): 14S-22S.
- Halliwell, B. (1994). "Free radicals, antioxidants and human disease: Curiosity, cause or consequence?" *Lancet* 344: 721-724.
- Halliwell, B. (1996). "Antioxidants in human health and disease." *Annu. Rev. Nutr.* 16: 33-50.
- Halliwell, B. (1996). Antioxidants: The Basics - What They Are and How to Evaluate Them. Antioxidants in Disease Mechanisms and Therapy. H. Sies, Academic Press. 38: 3-20.
- Halliwell, B. (1996). Diet and Antioxidant/Oxidant Systems. Feeding from Toddlers to Adolescence. A. Ballabriga, Rowen Press. 37: 155-168.
- Halliwell, B. (1996). "Free radicals, proteins and DNA: oxidative damage versus redox regulation." *Biochemical Society Transactions* 24(4): 1023-1027.
- Halliwell, B. and J. M. Gutteridge (1990). "The antioxidants of human extracellular fluids." *Arch Biochem Biophys* 280(1): 1-8.
- Halliwell, B. and J. M. Gutteridge (1995). "The definition and measurement of antioxidants in biological systems." *Free Radic Biol Med* 18(1): 125-6.
- Halliwell, B. and J. M. C. Gutteridge (1989). Free radicals in biology and medicine. Oxford, Clarendon Press, Reino Unido.
- Hancock, J. T., V. Salisbury, et al. (2002). "Antimicrobial properties of milk: dependence on presence of xanthine oxidase and nitrite." *Antimicrob Agents Chemother* 46(10): 3308-10.
- Hare, J. M. (2001). "Oxidative stress and apoptosis in heart failure progression." *Circ Res* 89(3): 198-200.
- Harrington, J. R. (2000). "SODD-silencer of death domains." *Stem Cells* 18(5): 388-9.
- Harris, C. M. and V. Massey (1997). "The Reaction of Reduced Xanthine Dehydrogenase with Molecular Oxygen." *J. Biol. Chem.* 272: 8370-8379.
- Harris, C. M., S. A. Sanders, et al. (1999). "Role of the Flavin Midpoint Potential and NAD Binding in Determining NAD Versus Oxygen Reactivity of Xanthine Oxidoreductase." *J. Biol. Chem.* 274: 4561-4569.
- Harrison, R. (1997). "Human xanthine oxidoreductase: in search of a function." *Biochem Soc Trans* 25(3): 786-91.
- Harrison, R. (2002). "Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now?" *Free Radic Biol Med* 33(6): 774-97.
- Harrison, R. (2004). "Physiological roles of xanthine oxidoreductase." *Drug Metab Rev* 36(2): 363-75.
- Hassoun, P. M., F. S. Yu, et al. (1998). "Upregulation of xanthine oxidase by lipopolysaccharide, interleukin-1, and hypoxia. Role in acute lung injury." *Am J Respir Crit Care Med* 158(1): 299-305.
- Hassoun, P. M., F. S. Yu, et al. (1994). "Regulation of endothelial cell xanthine dehydrogenase xanthine oxidase gene expression by oxygen tension." *Am J Physiol* 266(2 Pt 1): L163-71.
- Haupt, S., M. Berger, et al. (2003). "Apoptosis - the p53 network." *J Cell Sci* 116(Pt 20): 4077-85.
- Hayden, T. J., D. Brennan, et al. (1991). "Xanthine oxidase/dehydrogenase in mammary gland of mouse: relationship to mammaryogenesis and lactogenesis in vivo and in vitro." *J Dairy Res* 58(4): 401-9.

- Heermeier, K., M. Benedict, et al. (1996). "Bax and Bcl-xs are induced at the onset of apoptosis in involuting mammary epithelial cells." *Mech Dev* 56(1-2): 197-207.
- Helain, M. A. (1993). "Exercise-induced oxidative stress." *Med. Sci. Sports* 25: 218-224.
- Hellsten-Westing, Y. (1993). "Immunohistochemical localization of xanthine oxidase in human cardiac and skeletal muscle." *Histochemistry* 100(3): 215-22.
- Hellsten-Westing, Y., P. D. Balsom, et al. (1993). "The effect of high-intensity training on purine metabolism in man." *Acta Physiol Scand* 149(4): 405-12.
- Helminen, H. J. and J. L. Ericsson (1971). "Effects of enforced milk stasis on mammary gland epithelium, with special reference to changes in lysosomes and lysosomal enzymes." *Exp Cell Res* 68(2): 411-27.
- Henkart, P. A. (1996). "ICE family proteases: mediators of all apoptotic cell death?" *Immunity* 4(3): 195-201.
- Hensley, K., M. L. Maitt, et al. (1998). "Electrochemical analysis of protein nitrotyrosine and dityrosine in the Alzheimer brain indicates region-specific accumulation." *J Neurosci* 18(20): 8126-32.
- Hibi, M., A. Lin, et al. (1993). "Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain." *Genes Dev* 7(11): 2135-48.
- Hille, R. and R. F. Anderson (2001). "Coupled electron/proton transfer in complex flavoproteins: solvent kinetic isotope effect studies of electron transfer in xanthine oxidase and trimethylamine dehydrogenase." *J. Biol. Chem.* 276(33): 31193-201.
- Hille, R., J. A. Fee, et al. (1981). "Equilibrium properties of xanthine oxidase containing FAD analogs of varying oxidation-reduction potential." *J Biol Chem* 256(17): 8933-40.
- Hille, R., J. H. Kim, et al. (1993). "Reductive half-reaction of xanthine oxidase: mechanistic role of the species giving rise to the "rapid type 1" molybdenum(V) electron paramagnetic resonance signal." *Biochemistry* 32(15): 3973-80.
- Hille, R. and V. Massey (1981). "Studies on the oxidative half-reaction of xanthine oxidase." *J Biol Chem* 256(17): 9090-5.
- Hille, R. and V. Massey (1981). "Tight binding inhibitors of xanthine oxidase." *Pharmacol Ther* 14(2): 249-63.
- Hille, R. and V. Massey (1982). "The presence of a reducible disulfide bond in milk xanthine oxidase." *J Biol Chem* 257(15): 8898-901.
- Hille, R. and V. Massey (1986). "The equilibration of reducing equivalents within milk xanthine oxidase." *J Biol Chem* 261(3): 1241-7.
- Hille, R. and V. Massey (1991). "The kinetic behavior of xanthine oxidase containing chemically modified flavins." *J Biol Chem* 266(26): 17401-8.
- Hille, R. and T. Nishino (1995). "Flavoprotein structure and mechanism. 4. Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase." *Faseb J* 9(11): 995-1003.
- Hille, R., R. C. Stewart, et al. (1983). "The interaction of arsenite with xanthine oxidase." *J Biol Chem* 258(8): 4849-56.
- Hirosumi, J., G. Tuncman, et al. (2002). "A central role for JNK in obesity and insulin resistance." *Nature* 420(6913): 333-6.
- Hishikawa, K., B. S. Oemar, et al. (1997). "Pulsatile stretch stimulates superoxide production and activates nuclear factor-kappa B in human coronary smooth muscle." *Circ Res* 81(5): 797-803.

- Hoff, T., G. I. Frandsen, et al. (1998). "Biochemical and genetic characterization of three molybdenum cofactor hydroxylases in *Arabidopsis thaliana*." *Biochim Biophys Acta* 1398(3): 397-402.
- Hoidal, J. R., P. Xu, et al. (1997). "Transcriptional regulation of human xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase." *Biochem Soc Trans* 25(3): 796-9.
- Hollstein, M., D. Sidransky, et al. (1991). "p53 mutations in human cancers." *Science* 253(5015): 49-53.
- Horvitz, H. R. E. H. (1986). "Genetic control of programmed cell death in the nematode *C.elegans*." *Cell* 44: 817-829.
- Houston, M., A. Estevez, et al. (1999). "Binding of Xanthine Oxidase to Vascular Endothelium." *J. Biol. Chem.* 274: 4985-4994.
- Huang, S., Y. Jiang, et al. (1997). "Apoptosis signaling pathway in T cells is composed of ICE/Ced-3 family proteases and MAP kinase kinase 6b." *Immunity* 6(6): 739-49.
- Humphreys, R. C. (1999). "Programmed cell death in the terminal endbud." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 4(2): 213-20.
- Hunt, J. and V. Massey (1992). "Purification and properties of milk xanthine dehydrogenase." *J. Biol. Chem.* 267: 21479-21485.
- Hupp, T. R. and D. P. Lane (1994). "Allosteric activation of latent p53 tetramers." *Curr Biol* 4(10): 865-75.
- Hutchinson, J., J. Jin, et al. (2001). "Activation of Akt (protein kinase B) in mammary epithelium provides a critical cell survival signal required for tumor progression." *Mol Cell Biol* 21(6): 2203-12.
- Ichida, K., Y. Ayama, et al. (1993). "Cloning of the cDNA encoding human xanthine dehydrogenase (oxidase): structural analysis of the protein and chromosomal location of the gene." *Gene* 133: 279-284.
- Ichimori, K., M. Fukahori, et al. (1999). "Inhibition of xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase by nitric oxide. Nitric oxide converts reduced xanthine-oxidizing enzymes into the desulfo-type inactive form." *J Biol Chem* 274(12): 7763-8.
- Irie, S., Y. Li, et al. (2001). "Identification of two Fas-associated phosphatase-1 (FAP-1) promoters in human cancer cells." *DNA Seq* 11(6): 519-26.
- Jackson, R. M. and F. V. Curtis (1989). "Re-expansion, re-oxygenation and rethinking." *Am. J. Med. Sci.* 289: 44-50.
- Janicke, R. U., P. A. Walker, et al. (1996). "Specific cleavage of the retinoblastoma protein by an ICE-like protease in apoptosis." *Embo J* 15(24): 6969-78.
- Jarasch, E. D., C. Grund, et al. (1981). "Localization of xanthine oxidase in mammary-gland epithelium and capillary endothelium." *Cell* 25(1): 67-82.
- Jeremias, I., C. Kupatt, et al. (1998). "Inhibition of nuclear factor kappaB activation attenuates apoptosis resistance in lymphoid cells." *Blood* 91(12): 4624-31.
- Jerry, D. J., E. S. Dickinson, et al. (2002). "Regulation of apoptosis during mammary involution by the p53 tumor suppressor gene." *J Dairy Sci* 85(5): 1103-10.
- Jerry, D. J., C. Kuperwasser, et al. (1998). "Delayed involution of the mammary epithelium in BALB/c-p53null mice." *Oncogene* 17(18): 2305-12.
- Jerry, D. J., J. Pinkas, et al. (1999). "Regulation of p53 and its targets during involution of the mammary gland." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 4(2): 177-81.

- Jiang, Y., C. Chen, et al. (1996). "Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta)." *J Biol Chem* 271(30): 17920-6.
- Jiang, Y., H. Gram, et al. (1997). "Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38delta." *J Biol Chem* 272(48): 30122-8.
- Jin, S. and A. J. Levine (2001). "The p53 functional circuit." *J Cell Sci* 114(Pt 23): 4139-40.
- Johnson, J. L., K. V. Rajagopalan, et al. (1974). "Molecular basis of the biological function of molybdenum. Effect of unguen on xanthine oxidase and sulfite oxidase in the rat." *J. Biol. Chem.* 249: 859-866.
- Kacsóh, B., Z. Veress, et al. (1993). "Bioactive and immunoreactive variants of prolactin in milk and serum of lactating rats and their pups." *J Endocrinol* 138(2): 243-57.
- Kaeser, M. D. and R. D. Iggo (2002). "Chromatin immunoprecipitation analysis fails to support the latency model for regulation of p53 DNA binding activity in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(1): 95-100.
- Kamijo, T., J. D. Weber, et al. (1998). "Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(14): 8292-7.
- Kanegae, Y., A. T. Tavares, et al. (1998). "Role of Rel/NF-kappaB transcription factors during the outgrowth of the vertebrate limb." *Nature* 392(6676): 611-4.
- Kang, K. H., K. H. Lee, et al. (2001). "Caspase-3-mediated cleavage of the NF-kappa B subunit p65 at the NH2 terminus potentiates naphthoquinone analog-induced apoptosis." *J Biol Chem* 276(27): 24638-44.
- Kanofsky, J. R. (1989). "Singlet oxygen production by biological systems." *Chem Biol Interact* 70(1-2): 1-28.
- Karin, M. and A. Lin (2002). "NF-kappaB at the crossroads of life and death." *Nat Immunol* 3(3): 221-7.
- Kasai, H., P. F. Crain, et al. (1986). "Formation of 8-hydroxyguanine moiety in cellular DNA by agents producing oxygen radicals and evidence for its repair." *Carcinogenesis*. 7: 1849-1851.
- Kasai, H. and S. Nishimura (1984). "Hydroxylation of deoxy guanosine at the C-8 position by polyphenols and aminophenols in the presence of hydrogen peroxide and ferric ion." *Gann* 75(7): 565-6.
- Kaufmann, S. H., S. Desnoyers, et al. (1993). "Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis." *Cancer Res* 53(17): 3976-85.
- Kaur, H. and B. Halliwell (1994). "Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation. Nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients." *FEBS Lett* 350(1): 9-12.
- Kayyali, U. S., R. Budhiraja, et al. (2003). "Upregulation of xanthine oxidase by tobacco smoke condensate in pulmonary endothelial cells." *Toxicol Appl Pharmacol* 188(1): 59-68.
- Kayyali, U. S., C. Donaldson, et al. (2001). "Phosphorylation of xanthine dehydrogenase/oxidase in hypoxia." *J Biol Chem* 276(17): 14359-65.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie, et al. (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." *Br J Cancer* 26(4): 239-57.

- Khalil, Z. and B. Khodr (2001). "A role for free radicals and nitric oxide in delayed recovery in aged rats with chronic constriction nerve injury." *Free Radic Biol Med* 31(4): 430-9.
- Kim, J. H. and R. Hille (1993). "Reductive half-reaction of xanthine oxidase with xanthine. Observation of a spectral intermediate attributable to the molybdenum center in the reaction of enzyme with xanthine." *J Biol Chem* 268(1): 44-51.
- Kim, J. H. and R. Hille (1994). "Studies of the substrate binding to xanthine oxidase using a spin-labeled analog." *J Inorg Biochem* 55(4): 295-303.
- Kim, J. H., M. G. Ryan, et al. (1996). "The reductive half-reaction of xanthine oxidase. The involvement of prototropic equilibria in the course of the catalytic sequence." *J Biol Chem* 271(12): 6771-80.
- Kirsch, J. and H. Betz (1998). "Glycine-receptor activation is required for receptor clustering in spinal neurons." *Nature* 392(6677): 717-20.
- Kisker, C., H. Schindelin, et al. (1997). "Molybdenum-cofactor-containing enzymes: structure and mechanism." *Annu Rev Biochem* 66: 233-67.
- Knight, J. A., S. E. Smith, et al. (1988). "Urinary lipoperoxides quantified by liquid chromatography and determination of reference values for adults." *Clin. Chem.* 34: 1107-1110.
- Kohlhoff, S., C. Ziechmann, et al. (2000). "SV40 T/t-antigens sensitize mammary gland epithelial cells to oxidative stress and apoptosis." *Free Radic Biol Med* 29(6): 497-506.
- Kooij, A., M. Schijns, et al. (1992). "Distribution of xanthine oxidoreductase activity in human tissues: a histochemical and biochemical study." *Virchows Arch. B. Cell. Pathol.* 63: 17-23.
- Kooij, A., H. J. Schiller, et al. (1994). "Conversion of xanthine dehydrogenase into xanthine oxidase in rat liver and plasma at the onset of reperfusion after ischemia." *Hepatology* 19: 1488-1495.
- Korthuis, R. J. and D. N. Granger (1993). "Reactive oxygen metabolites, neutrophils, and the pathogenesis of ischemic-tissue/reperfusion." *Clin Cardiol* 16(4 Suppl 1): I19-26.
- Korycka-Dahi, M. and T. Richarson (1981). "Initiation of oxidative changes in food. Symposium: oxidative changes in milk." *J. Dairy Sciences.* 63: 1181-1208.
- Kosower, N. S. and E. M. Kosower (1978). "The glutathione status of the cells." *Int. Rev. Cytol.* 54: 109-160.
- Koumenis, C., R. Alarcon, et al. (2001). "Regulation of p53 by hypoxia: dissociation of transcriptional repression and apoptosis from p53-dependent transactivation." *Mol Cell Biol* 21(4): 1297-310.
- Kreuz, S., D. Siegmund, et al. (2001). "NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling." *Mol Cell Biol* 21(12): 3964-73.
- Kulik, G. and M. J. Weber (1998). "Akt-dependent and -independent survival signaling pathways utilized by insulin-like growth factor I." *Mol Cell Biol* 18(11): 6711-8.
- Kumar, S., P. C. McDonnell, et al. (1997). "Novel homologues of CSBP/p38 MAP kinase: activation, substrate specificity and sensitivity to inhibition by pyridinyl imidazoles." *Biochem Biophys Res Commun* 235(3): 533-8.
- Kurenova, E., L. H. Xu, et al. (2004). "Focal adhesion kinase suppresses apoptosis by binding to the death domain of receptor-interacting protein." *Mol Cell Biol* 24(10): 4361-71.

- Kurosaki, M., C. M. Li, et al. (1995). "Tissue- and cell-specific expression of mouse xanthine oxidoreductase gene in vivo: regulation by bacterial lipopolysaccharide." *Biochem. J.* 306: 225-234.
- Kurosaki, M., S. Zanotta, et al. (1996). "Expression of xanthine oxidoreductase in mouse mammary epithelium during pregnancy and lactation: regulation of gene expression by glucocorticoids and prolactin." *Biochem J* 319 (Pt 3): 801-10.
- Kyriakis, J. M. and J. Avruch (2001). "Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation." *Physiol Rev* 81(2): 807-69.
- Lamas, S., P. A. Marsden, et al. (1992). "Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(14): 6348-52.
- Lassus, P., X. Opitz-Araya, et al. (2002). "Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization." *Science* 297(5585): 1352-4.
- Lawlor, M. A. and D. R. Alessi (2001). "PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses?" *J Cell Sci* 114(Pt 16): 2903-10.
- Lechner, C., M. A. Zahalka, et al. (1996). "ERK6, a mitogen-activated protein kinase involved in C2C12 myoblast differentiation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(9): 4355-9.
- Lee, C. I., X. Liu, et al. (2000). "Regulation of xanthine oxidase by nitric oxide and peroxynitrite." *J Biol Chem* 275(13): 9369-76.
- Lee, H. Y., G. L. Walsh, et al. (1998). "All-trans-retinoic acid inhibits Jun N-terminal kinase-dependent signaling pathways." *J Biol Chem* 273(12): 7066-71.
- Lee, J. I. and G. J. Burckart (1998). "Nuclear factor kappa B: important transcription factor and therapeutic target." *J Clin Pharmacol* 38(11): 981-93.
- Lee, J. T., Jr. and J. A. McCubrey (2002). "The Raf/MEK/ERK signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention in leukemia." *Leukemia* 16(4): 486-507.
- Lee, R. M., G. Gillet, et al. (1999). "Role of Nr13 in regulation of programmed cell death in the bursa of Fabricius." *Genes Dev* 13(6): 718-28.
- Legido (2000). "Perinatal Hypoxic Ischemic Encephalopathy." *International Pediatrics* 15(3): 143-146.
- Leimkuhler, S., S. Angermuller, et al. (1999). "Activity of the molybdopterin-containing xanthine dehydrogenase of *Rhodobacter capsulatus* can be restored by high molybdenum concentrations in a *moeA* mutant defective in molybdenum cofactor biosynthesis." *J Bacteriol* 181(19): 5930-9.
- Levkau, B., M. Scatena, et al. (1999). "Apoptosis overrides survival signals through a caspase-mediated dominant-negative NF-kappa B loop." *Nat Cell Biol* 1(4): 227-33.
- Lewisch, S. A. and R. L. Levine (1995). "Determination of 2-oxohistidine by amino acid analysis." *Anal. Biochem.* 231: 440-446.
- Li, H., A. Samouilov, et al. (2003). "Characterization of the magnitude and kinetics of xanthine oxidase-catalyzed nitrate reduction: evaluation of its role in nitrite and nitric oxide generation in anoxic tissues." *Biochemistry* 42(4): 1150-9.
- Li, H., A. Samouilov, et al. (2004). "Characterization of the effects of oxygen on xanthine oxidase-mediated nitric oxide formation." *J Biol Chem* 279(17): 16939-46.
- Li, J. D., W. Feng, et al. (1998). "Activation of NF-kappaB via a Src-dependent Ras-MAPK-pp90rsk pathway is required for *Pseudomonas aeruginosa*-induced

- mucin overproduction in epithelial cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(10): 5718-23.
- Li, M., X. Liu, et al. (1997). "Mammary-derived signals activate programmed cell death during the first stage of mammary gland involution." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(7): 3425-30.
 - Linder, N., J. Rapola, et al. (1999). "Cellular expression of xanthine oxidoreductase protein in normal human tissues." *Lab Invest* 79(8): 967-74.
 - Linke, S. P., K. C. Clarkin, et al. (1996). "A reversible, p53-dependent G0/G1 cell cycle arrest induced by ribonucleotide depletion in the absence of detectable DNA damage." *Genes Dev* 10(8): 934-47.
 - Liochev, S. I. and I. Fridovich (1994). "The role of O₂⁻ in the production of HO₂·: *In vitro* and *in vivo*." *Free Rad. Biol. Med.* 16: 29-33.
 - Liou, H. C. and D. Baltimore (1993). "Regulation of the NF-kappa B/rel transcription factor and I kappa B inhibitor system." *Curr Opin Cell Biol* 5(3): 477-87.
 - Lippman, R. D. (1985). "Rapid *in vivo* quantification and comparison of hydroperoxides and oxidized collagen in aging mice, rabbits and man." *Exp. Gerontol.* 20: 1-5.
 - Liu, G. Y., Y. C. Hung, et al. (2005). "Ornithine decarboxylase prevents tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis by decreasing intracellular reactive oxygen species." *Apoptosis* 10(3): 569-81.
 - Liu, X., G. W. Robinson, et al. (1996). "Activation of Stat5a and Stat5b by tyrosine phosphorylation is tightly linked to mammary gland differentiation." *Mol Endocrinol* 10(12): 1496-506.
 - Lochter, A., M. Navre, et al. (1999). "alpha1 and alpha2 integrins mediate invasive activity of mouse mammary carcinoma cells through regulation of stromelysin-1 expression." *Mol Biol Cell* 10(2): 271-82.
 - Lockshin, R. A., B. Osborne, et al. (2000). "Cell death in the third millennium." *Cell Death Differ* 7(1): 2-7.
 - Lockshin, R. A. and C. M. William (1965). "Programmed Cell Death. 3. Neural Control of the Breakdown of the Intersegmental Muscles of Silkmoths." *J Insect Physiol* 11: 601-10.
 - Lorigan, G. A., R. D. Britt, et al. (1994). "Electron spin echo envelope modulation spectroscopy of the molybdenum center of xanthine oxidase." *Biochim Biophys Acta* 1185(3): 284-94.
 - Lu, S. C., C. Garcia-Ruiz, et al. (1990). "Hormonal regulation of glutathione efflux." *J Biol Chem* 265(27): 16088-95.
 - Lund, L. R., J. Romer, et al. (1996). "Two distinct phases of apoptosis in mammary gland involution: proteinase-independent and -dependent pathways." *Development* 122(1): 181-93.
 - Luo, X., I. Budihardjo, et al. (1998). "Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors." *Cell* 94(4): 481-90.
 - Maggirwar, S. B., S. Ramirez, et al. (2000). "Functional interplay between nuclear factor-kappaB and c-Jun integrated by coactivator p300 determines the survival of nerve growth factor-dependent PC12 cells." *J Neurochem* 74(2): 527-39.
 - Malinin, N. L., M. P. Boldin, et al. (1997). "MAP3K-related kinase involved in NF-kappaB induction by TNF, CD95 and IL-1." *Nature* 385(6616): 540-4.

- Malyshev, I. Y., M. G. Pshennikova, et al. (2004). "Caspase inhibitor Z-VAD-FMK potentiates heat shock-induced apoptosis and HSP70 synthesis in macrophages." *Bull Exp Biol Med* 138(3): 230-2.
- Martelin, E., R. Lapatto, et al. (2002). "Regulation of xanthine oxidoreductase by intracellular iron." *Am J Physiol Cell Physiol* 283(6): C1722-8.
- Martelin, E., J. J. Palvimo, et al. (2000). "Nuclear factor Y activates the human xanthine oxidoreductase gene promoter." *FEBS Lett* 480(2-3): 84-8.
- Marti, A., Z. Feng, et al. (1997). "Milk accumulation triggers apoptosis of mammary epithelial cells." *Eur J Cell Biol* 73(2): 158-65.
- Marti, A., R. Jaggi, et al. (1999). "Physiological apoptosis in hormone-dependent tissues: involvement of caspases." *Cell Death Differ* 6(12): 1190-200.
- Marti, A., B. Jehn, et al. (1994). "Protein kinase A and AP-1 (c-Fos/JunD) are induced during apoptosis of mouse mammary epithelial cells." *Oncogene* 9(4): 1213-23.
- Marti, A., H. Lazar, et al. (1999). "Transcription factor activities and gene expression during mouse mammary gland involution." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 4(2): 145-52.
- Marti, A., P. M. Ritter, et al. (2001). "Mouse mammary gland involution is associated with cytochrome c release and caspase activation." *Mech Dev* 104(1-2): 89-98.
- Martin, H. M., K. P. Moore, et al. (2004). "Xanthine oxidoreductase is present in bile ducts of normal and cirrhotic liver." *Free Radic Biol Med* 37(8): 1214-23.
- Marzo, I., C. Brenner, et al. (1998). "Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis." *Science* 281(5385): 2027-31.
- Massey, V., H. Komai, et al. (1970). "On the mechanism of inactivation of xanthine oxidase by allopurinol and other pyrazolo[3,4-d]pyrimidines." *J Biol Chem* 245(11): 2837-44.
- Masso-Welch, P. A., K. M. Darcy, et al. (2000). "A developmental atlas of rat mammary gland histology." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 5(2): 165-85.
- Mather, I. H., C. H. Sullivan, et al. (1982). "Detection of xanthine oxidase and immunologically related proteins in fractions from bovine mammary tissue and milk after electrophoresis in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulphate." *Biochem J* 202(2): 317-23.
- Mather, I. H., K. Weber, et al. (1977). "Membranes of mammary gland. XII. Loosely associated proteins and compositional heterogeneity of bovine milk fat globule membrane." *J Dairy Sci* 60(3): 394-402.
- Matsui, K., A. Fine, et al. (1998). "Identification of two NF-kappa B sites in mouse CD95 ligand (Fas ligand) promoter: functional analysis in T cell hybridoma." *J Immunol* 161(7): 3469-73.
- Matsui, N., I. Satsuki, et al. (2000). "Xanthine oxidase-derived reactive oxygen species activate nuclear factor kappa B during hepatic ischemia in rats." *Jpn J Pharmacol* 84(3): 363-6.
- Matsumoto, M., H. Nishinakagawa, et al. (1995). "Ultrastructural changes in fat cells and blood capillaries of the mammary gland in starved mice." *J Vet Med Sci* 57(4): 733-6.
- Matsumoto, M., H. Nishinakagawa, et al. (1992). "Effects of estrogen and progesterone on the development of the mammary gland and the associated blood vessels in ovariectomized mice." *J Vet Med Sci* 54(6): 1117-24.

- Maule Walker, F. M. and M. Peaker (1980). "Local production of prostaglandins in relation to mammary function at the onset of lactation in the goat." *J Physiol* 309: 65-79.
- Maule Walker, F. M. and M. Peaker (1981). "Prostaglandins and lactation." *Acta Vet Scand Suppl* 77: 299-310.
- Mayo, L. D. and D. B. Donner (2002). "The PTEN, Mdm2, p53 tumor suppressor-oncoprotein network." *Trends Biochem Sci* 27(9): 462-7.
- Mazurek, S., G. Weisse, et al. (1999). "Energy metabolism in the involuting mammary gland." *In Vivo* 13(6): 467-77.
- McCord, J. M. (1985). "Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury." *N Engl J Med* 312(3): 159-63.
- McCord, J. M. and I. Fridovich (1968). "The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase." *J Biol Chem* 243(21): 5753-60.
- McCurrach, M. E., T. M. Connor, et al. (1997). "bax-deficiency promotes drug resistance and oncogenic transformation by attenuating p53-dependent apoptosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(6): 2345-9.
- McKelvey, T. G., M. E. Hollwarth, et al. (1988). "Mechanisms of conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase in ischemic rat liver and kidney." *Am J Physiol* 254(5 Pt 1): G753-60.
- McManaman, J. L., L. Hanson, et al. (2000). "Lactogenic hormones regulate xanthine oxidoreductase and beta-casein levels in mammary epithelial cells by distinct mechanisms." *Arch Biochem Biophys* 373(2): 318-27.
- McManaman, J. L. and M. C. Neville (2003). "Mammary physiology and milk secretion." *Adv Drug Deliv Rev* 55(5): 629-41.
- McManaman, J. L., M. C. Neville, et al. (1999). "Mouse mammary gland xanthine oxidoreductase: purification, characterization, and regulation." *Arch Biochem Biophys* 371(2): 308-16.
- McManaman, J. L., C. A. Palmer, et al. (2004). "Regulation of milk lipid formation and secretion in the mouse mammary gland." *Adv Exp Med Biol* 554: 263-79.
- McManaman, J. L., C. A. Palmer, et al. (2002). "Functional regulation of xanthine oxidoreductase expression and localization in the mouse mammary gland: evidence of a role in lipid secretion." *J Physiol* 545(Pt 2): 567-79.
- McManaman, J. L., V. Shellman, et al. (1996). "Purification of rat liver xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase by affinity chromatography on benzamidine-sepharose." *Arch Biochem Biophys* 332(1): 135-41.
- Mendel, R. R. (2002). Assignment of human xanthine dehydrogenase gene to chromosome 2p22. *Genomics*. 23: 289-91.
- Mendel, R. R. (2002). Metal ions in biological systems.
- Merlo, G. R., D. Graus-Porta, et al. (1996). "Growth, differentiation and survival of HC11 mammary epithelial cells: diverse effects of receptor tyrosine kinase-activating peptide growth factors." *Eur J Cell Biol* 70(2): 97-105.
- Metcalfe, A. D., A. Gilmore, et al. (1999). "Developmental regulation of Bcl-2 family protein expression in the involuting mammary gland." *J Cell Sci* 112 (Pt 11): 1771-83.
- Miesel, R. and M. Zuber (1993). "Elevated levels of xanthine oxidase in serum of patients with inflammatory and autoimmune rheumatic diseases." *Inflammation* 17(5): 551-61.
- Miles, A. M., D. S. Bohle, et al. (1996). "Modulation of superoxide-dependent oxidation and hydroxylation reactions by nitric oxide." *J Biol Chem* 271(1): 40-7.

- Moncada, S., R. M. J. Palmer, et al. (1991). "Nitric oxide: Physiology, pathology and pharmacology." *Pharmacol. Rev.* 43: 109-142.
- Moriwaki, Y., T. Yamamoto, et al. (1997). "Distribution and pathophysiologic role of molybdenum-containing enzymes." *Histol Histopathol* 12(2): 513-24.
- Moriwaki, Y., T. Yamamoto, et al. (1999). "Enzymes involved in purine metabolism--a review of histochemical localization and functional implications." *Histol Histopathol* 14(4): 1321-40.
- Moriwaki, Y., T. Yamamoto, et al. (1998). "Comparative localization of aldehyde oxidase and xanthine oxidoreductase activity in rat tissues." *Histochem J* 30(2): 69-74.
- Motyl, T., B. Gajkowska, et al. (2001). "Expression of apoptosis-related proteins in involuting mammary gland of sow." *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 128(4): 635-46.
- Muzio, M., A. M. Chinnaiyan, et al. (1996). "FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex." *Cell* 85(6): 817-27.
- Naik, P. (1996). "The rise and fall of apoptosis during multistage tumorigenesis:down-modulation contributes to tumor progression from angiogenic progenitorsT." *Genes Development* 10: 2105-2116.
- Narita, M., S. Shimizu, et al. (1998). "Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(25): 14681-6.
- Nass, S. J., M. Li, et al. (1996). "Role for Bcl-xL in the regulation of apoptosis by EGF and TGF beta 1 in c-myc overexpressing mammary epithelial cells." *Biochem Biophys Res Commun* 227(1): 248-56.
- Neville, M. C. (1999). "Physiology of lactation." *Clin Perinatol* 26(2): 251-79, v.
- Neville, M. C., D. Medina, et al. (1998). "The mammary fat pad." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 3(2): 109-16.
- Nishino, T. (1994). "The conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase and the role of the enzyme in reperfusion injury." *J Biochem (Tokyo)* 116(1): 1-6.
- Nishino, T., S. Nakanishi, et al. (1997). "Conversion of xanthine dehydrogenase into oxidase and its role in reperfusion injury." *Biochem Soc Trans* 25(3): 783-6.
- Nishino, T. and T. Nishino (1997). "The conversion from the dehydrogenase type to the oxidase type of rat liver xanthine dehydrogenase by modification of cysteine residues with fluorodinitrobenzene." *J. Biol. Chem.* 272: 29859-29864.
- Nishino, T., T. Nishino, et al. (1989). "The reactivity of chicken liver xanthine dehydrogenase with molecular oxygen." *J. Biol. Chem.* 264: 2518-2527.
- Nishino, T., K. Tsushima, et al. (1982). "Inhibition of milk xanthine oxidase by fluorodinitrobenzene." *J Biol Chem* 257(13): 7348-53.
- O'Connor, L., A. W. Harris, et al. (2000). "CD95 (Fas/APO-1) and p53 signal apoptosis independently in diverse cell types." *Cancer Res* 60(5): 1217-20.
- Oda, E., R. Ohki, et al. (2000). "Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis." *Science* 288(5468): 1053-8.
- Okamoto, H. (1985). "Molecular basis of experimental diabetes degeneration, oncogenesis and regeneration of pancreatic b-cells os islets of Langerhans." *Bioassays* 2: 15-21.
- Okamoto, K. and T. Nishino (1995). "Mechanism of inhibition of xanthine oxidase with a new tight binding inhibitor." *J. Biol. Chem.* 270: 7816-7821.

- Oliver, C. N., B. W. Ahn, et al. (1987). "Age-related changes in oxidized proteins." *J. Biol. Chem.* 262: 5488-5491.
- Olson, J. S., D. P. Ballou, et al. (1974). "The mechanism of action of xanthine oxidase." *J. Biol. Chem.* 249: 4363-4382.
- Orłowski, R. Z. and A. S. Baldwin, Jr. (2002). "NF-kappaB as a therapeutic target in cancer." *Trends Mol Med* 8(8): 385-9.
- Ozes, O. N., L. D. Mayo, et al. (1999). "NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase." *Nature* 401(6748): 82-5.
- Pacifi, R. E. and K. J. Davies (1991). "Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress: the free radical theory of aging revised." *Gerontology* 37: 166-180.
- Page, C. C., C. C. Moser, et al. (1999). "Natural engineering principles of electron tunnelling in biological oxidation-reduction." *Nature (London)* 402(4): 47-52.
- Paller, M. S. and T. V. Neumann (1991). "Reactive oxygen species and rat renal epithelial cells during hypoxia and reoxygenation." *Kidney Int.* 40: 1041-1049.
- Pardo, J., A. Bosque, et al. (2004). "Apoptotic pathways are selectively activated by granzyme A and/or granzyme B in CTL-mediated target cell lysis." *J Cell Biol* 167(3): 457-68.
- Parks, D. A. and D. N. Granger (1986). "Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology." *Acta Physiol Scand Suppl* 548: 87-99.
- Patel, R., B. Bartosch, et al. (1998). "p21WAF1 is dynamically associated with JNK in human T-lymphocytes during cell cycle progression." *J Cell Sci* 111 (Pt 15): 2247-55.
- Patetsios, P., M. Song, et al. (2001). "Identification of uric acid and xanthine oxidase in atherosclerotic plaque." *Am J Cardiol* 88(2): 188-91, A6.
- Pena, L. A., Z. Fuks, et al. (1997). "Stress-induced apoptosis and the sphingomyelin pathway." *Biochem Pharmacol* 53(5): 615-21.
- Pereda, J., L. Sabater, et al. (2004). "Effect of simultaneous inhibition of TNF-alpha production and xanthine oxidase in experimental acute pancreatitis: the role of mitogen activated protein kinases." *Ann Surg* 240(1): 108-16.
- Peter, M. E., A. E. Heufelder, et al. (1997). "Advances in apoptosis research." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(24): 12736-7.
- Pfeffer, K. D., T. P. Huecksteadt, et al. (1994). "Xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activity and gene expression in renal epithelial cells. Cytokine and steroid regulation." *J Immunol* 153(4): 1789-97.
- Philp, J. A., T. G. Burdon, et al. (1996). "Differential activation of STATs 3 and 5 during mammary gland development." *FEBS Lett* 396(1): 77-80.
- Pollack, M. and C. Leeuwenburgh (2001). "Apoptosis and aging: role of the mitochondria." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 56(11): B475-82.
- Pollack, M., S. Phaneuf, et al. (2002). "The role of apoptosis in the normal aging brain, skeletal muscle, and heart." *Ann N Y Acad Sci* 959: 93-107.
- Ponton, A., M. V. Clement, et al. (1996). "The CD95 (APO-1/Fas) receptor activates NF-kappaB independently of its cytotoxic function." *J Biol Chem* 271(15): 8991-5.
- Poss, W. B., T. P. Huecksteadt, et al. (1996). "Regulation of xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activity by hypoxia." *Am J Physiol* 270(6 Pt 1): L941-6.

- Postlethwait, E. M., S. D. Langford, et al. (1995). "NO₂ reactive absorption substrates in rat pulmonary surface lining fluids." *Free Radic Biol Med* 19(5): 553-63.
- Prives, C. and P. A. Hall (1999). "The p53 pathway." *J Pathol* 187(1): 112-26.
- Pryor, W. A., G. L. Squadrito, et al. (1995). "A new mechanism for the toxicity of ozone." *Toxicol Lett* 82-83: 287-93.
- Pullan, S., J. Wilson, et al. (1996). "Requirement of basement membrane for the suppression of programmed cell death in mammary epithelium." *J Cell Sci* 109 (Pt 3): 631-42.
- Qin, F., M. C. Liang, et al. (2005). "Progressive left ventricular remodeling, myocyte apoptosis, and protein signaling cascades after myocardial infarction in rabbits." *Biochim Biophys Acta* 1740(3): 499-513.
- Quarrie, L. H., C. V. Addey, et al. (1995). "Apoptosis in lactating and involuting mouse mammary tissue demonstrated by nick-end DNA labelling." *Cell Tissue Res* 281(3): 413-9.
- Quarrie, L. H., C. V. Addey, et al. (1996). "Programmed cell death during mammary tissue involution induced by weaning, litter removal, and milk stasis." *J Cell Physiol* 168(3): 559-69.
- Quindry, J., J. French, et al. (2005). "Exercise training provides cardioprotection against ischemia-reperfusion induced apoptosis in young and old animals." *Exp Gerontol* 40(5): 416-25.
- Radi, R., H. Rubbo, et al. (1997). "Xanthine oxidase binding to glycosaminoglycans: kinetics and superoxide dismutase interactions of immobilized xanthine oxidase-heparin complexes." *Arch Biochem Biophys* 339(1): 125-35.
- Radi, R., S. Tan, et al. (1992). "Inhibition of xanthine oxidase by uric acid and its influence on superoxide radical production." *Biochim. Biophys. Acta.* 1122: 178-182.
- Rasmussen, J. T., M. S. Rasmussen, et al. (2000). "Cysteines involved in the interconversion between dehydrogenase and oxidase forms of bovine xanthine oxidoreductase." *J. Dairy Sci.* 83: 499-506.
- Ravi, R., A. Bedi, et al. (1998). "CD95 (Fas)-induced caspase-mediated proteolysis of NF-kappaB." *Cancer Res* 58(5): 882-6.
- Reardon, W., R. J. Ross, et al. (1992). "Diabetes mellitus associated with a pathogenic point mutation in mitochondrial DNA." *Lancet* 340(8832): 1376-9.
- Regula, K. M., D. Baetz, et al. (2004). "Nuclear factor-kappaB represses hypoxia-induced mitochondrial defects and cell death of ventricular myocytes." *Circulation* 110(25): 3795-802.
- Reiss, J., N. Cohen, et al. (1998). "Mutations in a polycistronic nuclear gene associated with molybdenum cofactor deficiency." *Nat Genet* 20(1): 51-3.
- Richards, R. G., A. K. Brar, et al. (1995). "Fibroblast cells from term human decidua closely resemble endometrial stromal cells: induction of prolactin and insulin-like growth factor binding protein-1 expression." *Biol Reprod* 52(3): 609-15.
- Richert, M. M., K. L. Schwertfeger, et al. (2000). "An atlas of mouse mammary gland development." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 5(2): 227-41.
- Richter, B. W. and C. S. Duckett (2000). "The IAP proteins: caspase inhibitors and beyond." *Sci STKE* 2000(44): PE1.
- Rinaldo, J. E., M. Clark, et al. (1994). "Nitric oxide inactivates xanthine oxidase in interferon stimulated macrophages." *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 11: 625-630.

- Rinaldo, J. E. and M. Gorry (1990). "Protection by deferoxamine from endothelial injury: a possible link with inhibition of intracellular xanthine oxidase." *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 3: 525-533.
- Rincon, M., R. A. Flavell, et al. (2001). "Signal transduction by MAP kinases in T lymphocytes." *Oncogene* 20(19): 2490-7.
- Rivett, A. J. (1985). "The effect of mixed-function oxidation of enzymes on their susceptibility to degradation by a nonlysosomal cysteine proteinase." *Arch Biochem Biophys* 243(2): 624-32.
- Robertson, I. G. and R. S. Gamage (1994). "Methadone: a potent inhibitor of rat liver aldehyde oxidase." *Biochem Pharmacol* 47(3): 584-7.
- Rock, C. L., R. A. Jacob, et al. (1996). "Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients: vitamin C, vitamin E, and the carotenoids." *J Am Diet Assoc* 96(7): 693-702; quiz 703-4.
- Romashkova, J. A. and S. S. Makarov (1999). "NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling." *Nature* 401(6748): 86-90.
- Romero, F. J. and E. Cadenas (1987). "Hydroperoxide metabolism in vitamin E-deficient hepatocytes. Studies on low-level chemiluminescence, lipid peroxidation, and glutathione status." *Pharmacol Ther* 33(1): 179-86.
- Rosfjord, E. C. and R. B. Dickson (1999). "Growth factors, apoptosis, and survival of mammary epithelial cells." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 4(2): 229-37.
- Rostasy, K., L. Monti, et al. (2000). "NFkappaB activation, TNF-alpha expression, and apoptosis in the AIDS-Dementia-Complex." *J Neurovirol* 6(6): 537-43.
- Rouault, T. A. and R. D. Klausner (1996). "The impact of oxidative stress on eukaryotic iron metabolism." *EXS*. 77: 183-197.
- Rouquette, M., S. Page, et al. (1998). "Xanthine oxidoreductase is asymmetrically localised on the outer surface of human endothelial and epithelial cells in culture." *FEBS Lett.* 426: 397-401.
- Rouquette, M., C. Stevens, et al. (1997). "Expression of xanthine oxidase activity in human endothelial cells as a function of cell density." *Biochem Soc Trans* 25(3): 532S.
- Rudolph, D., W. C. Yeh, et al. (2000). "Severe liver degeneration and lack of NF-kappaB activation in NEMO/IKKgamma-deficient mice." *Genes Dev* 14(7): 854-62.
- Rudolph, M. C., J. L. McManaman, et al. (2003). "Functional development of the mammary gland: use of expression profiling and trajectory clustering to reveal changes in gene expression during pregnancy, lactation, and involution." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 8(3): 287-307.
- Rueda, B. R., I. R. Hendry, et al. (1999). "Accumulation of caspase-3 messenger ribonucleic acid and induction of caspase activity in the ovine corpus luteum following prostaglandin F2alpha treatment in vivo." *Biol Reprod* 60(5): 1087-92.
- Russo, I. H. and J. Russo (1978). "Developmental stage of the rat mammary gland as determinant of its susceptibility to 7,12-dimethylbenz[a]anthracene." *J Natl Cancer Inst* 61(6): 1439-49.
- Saavedra, W. F., N. Paolucci, et al. (2002). "Imbalance between xanthine oxidase and nitric oxide synthase signaling pathways underlies mechanoenergetic uncoupling in the failing heart." *Circ Res* 90(3): 297-304.
- Sablina, A. A., P. M. Chumakov, et al. (2001). "p53 activation in response to microtubule disruption is mediated by integrin-Erk signaling." *Oncogene* 20(8): 899-909.

- Saez, G., P. J. Thornalley, et al. (1982). "The production of free radicals during the autoxidation of cysteine and their effect on isolated rat hepatocytes." *Biochim Biophys Acta* 719(1): 24-31.
- Saito, S., A. A. Goodarzi, et al. (2002). "ATM mediates phosphorylation at multiple p53 sites, including Ser(46), in response to ionizing radiation." *J Biol Chem* 277(15): 12491-4.
- Saito, T. and T. Nishino (1989). "Differences in Redox and Kinetic Properties between NAD-dependent and O₂-dependent Types of Rat Liver Xanthine Dehydrogenase." *J. Biol. Chem.* 264: 10015-10022.
- Saito, T., T. Nishino, et al. (1989). "Differences in environment of FAD between NAD-dependent and O₂-dependent types of rat liver xanthine dehydrogenase shown by active site probe study." *J. Biol. Chem.* 264: 15930-15935.
- Sakaguchi, K., S. Saito, et al. (2000). "Damage-mediated phosphorylation of human p53 threonine 18 through a cascade mediated by a casein 1-like kinase. Effect on Mdm2 binding." *J Biol Chem* 275(13): 9278-83.
- Sanchez, I., R. T. Hughes, et al. (1994). "Role of SAPK/ERK kinase-1 in the stress-activated pathway regulating transcription factor c-Jun." *Nature* 372(6508): 794-8.
- Sanchez-Perez, I., S. A. Benitah, et al. (2002). "Cell stress and MEKK1-mediated c-Jun activation modulate NFκB activity and cell viability." *Mol Biol Cell* 13(8): 2933-45.
- Sanchez-Perez, I., J. R. Murguía, et al. (1998). "Cisplatin induces a persistent activation of JNK that is related to cell death." *Oncogene* 16(4): 533-40.
- Sanders, S. A., R. Eisenthal, et al. (1997). "NADH oxidase activity of human xanthine oxidoreductase--generation of superoxide anion." *Eur J Biochem* 245(3): 541-8.
- Sanders, S. A., R. Harrison, et al. (1997). "The reaction of human xanthine dehydrogenase with NADH." *Biochem Soc Trans* 25(3): 517S.
- Sanganahalli, B. G., P. G. Joshi, et al. (2005). "Xanthine oxidase, nitric oxide synthase and phospholipase A(2) produce reactive oxygen species via mitochondria." *Brain Res* 1037(1-2): 200-3.
- Sanz, C., C. Richard, et al. (2002). "Nuclear factor κ B is activated in myelodysplastic bone marrow cells." *Haematologica* 87(9): 1005-6.
- Sastre, J., N. Asensi, et al. (1992). "Exhaustive physical exercise causes oxidation of glutathione status in blood: Prevention by antioxidant administration." *Am. J. Physiol.* 32: R992-R995.
- Sastre, J., C. Borrás, et al. (2002). "Mitochondrial damage in aging and apoptosis." *Ann N Y Acad Sci* 959: 448-51.
- Sastre, J., F. V. Pallardo, et al. (2003). "The role of mitochondrial oxidative stress in aging." *Free Radic Biol Med* 35(1): 1-8.
- Scatena, M., M. Almeida, et al. (1998). "NF-κB mediates αvβ3 integrin-induced endothelial cell survival." *J Cell Biol* 141(4): 1083-93.
- Schaeffer, H. J. and M. J. Weber (1999). "Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers." *Mol Cell Biol* 19(4): 2435-44.
- Schauvliege, R., J. Vanrobaeys, et al. (2002). "Caspase-11 gene expression in response to lipopolysaccharide and interferon-gamma requires nuclear factor-κ B and signal transducer and activator of transcription (STAT) 1." *J Biol Chem* 277(44): 41624-30.

- Scheinman, R. I., A. Gualberto, et al. (1995). "Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF-kappa B by activated glucocorticoid receptors." *Mol Cell Biol* 15(2): 943-53.
- Schieber, A. and D. E. Edmonson (1993). "Studies on the induction and phosphorylation of xanthine dehydrogenase in cultured chick embryo hepatocytes." *Eur. J. Biochem.* 215: 307-314.
- Schoutsen, B. and J. W. De Jong (1984). "Xanthine oxidase in rabbit plasma after application of a bovine milk preparation to small intestine." *Arch Int Physiol Biochim* 92(5): 379-84.
- Schoutsen, B. and J. W. de Jong (1987). "Age-dependent increase in xanthine oxidoreductase differs in various heart cell types." *Circ Res* 61(4): 604-7.
- Schoutsen, B., J. W. De Jong, et al. (1983). "Myocardial xanthine oxidase/dehydrogenase." *Biochim Biophys Acta* 762(4): 519-24.
- Schreck, R., K. Albermann, et al. (1992). "Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review)." *Free Radic Res Commun* 17(4): 221-37.
- Schwenzler, R., K. Siemienski, et al. (1999). "The human tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor 1 gene (TRAF1) is up-regulated by cytokines of the TNF ligand family and modulates TNF-induced activation of NF-kappaB and c-Jun N-terminal kinase." *J Biol Chem* 274(27): 19368-74.
- Schwertfeger, K. L., J. L. McManaman, et al. (2003). "Expression of constitutively activated Akt in the mammary gland leads to excess lipid synthesis during pregnancy and lactation." *J Lipid Res* 44(6): 1100-12.
- Sen, R. and D. Baltimore (1986). "Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism." *Cell* 47(6): 921-8.
- Sevanian, A. and E. Kim (1985). "Phospholipase A2 dependent release of fatty acids from peroxidized membranes." *J Free Radic Biol Med* 1(4): 263-71.
- Sha, W. C., H. C. Liou, et al. (1995). "Targeted disruption of the p50 subunit of NF-kappa B leads to multifocal defects in immune responses." *Cell* 80(2): 321-30.
- Shamma'a, M. H., S. M. Nasrallah, et al. (1973). "Serum xanthine oxidase. An experience with 2000 patients." *Am J Dig Dis* 18(1): 15-22.
- Shaw, S. and E. Jayatilleke (1990). "The role of aldehyde oxidase in ethanol-induced hepatic lipid peroxidation in the rat." *Biochem J* 268(3): 579-83.
- Shibutani, S., M. Takeshita, et al. (1992). "Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG." *Nature* 349: 431-434.
- Shigenaga, M. K., T. M. Hagen, et al. (1994). "Oxidative damage and mitochondrial decay in aging." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 10771-10778.
- Shimada, K., P. J. Gill, et al. (1981). "Involvement of cell surface heparin sulfate in the binding of lipoprotein lipase to cultured bovine endothelial cells." *J. Clin. Invest.* 68: 995-1002.
- Shimeno, H., S. Soeda, et al. (1998). "Partial purification and characterization of sphingosine N-acyltransferase (ceramide synthase) from bovine liver mitochondrion-rich fraction." *Lipids* 33(6): 601-5.
- Siebenlist, U., G. Franzoso, et al. (1994). "Structure, regulation and function of NF-kappa B." *Annu Rev Cell Biol* 10: 405-55.
- Sies, H. (1986). "Biochemistry of oxidative stress." *Angewandte Chem.* 25: 1058-1071.
- Sies, H. (1993). "Damage to plasmid DNA by singlet oxygen and its protection." *Mutation Research* 299(3/4): 183.

- Sies, H. (1993). "Strategies of antioxidant defense." *European Journal of Biochemistry* 215(2): 213.
- Silberstein, G. B., K. C. Flanders, et al. (1992). "Regulation of mammary morphogenesis: evidence for extracellular matrix-mediated inhibition of ductal budding by transforming growth factor-beta 1." *Dev Biol* 152(2): 354-62.
- Silberstein, G. B., K. Van Horn, et al. (1994). "Essential role of endogenous estrogen in directly stimulating mammary growth demonstrated by implants containing pure antiestrogens." *Endocrinology* 134(1): 84-90.
- Siskind, L. J. and M. Colombini (2000). "The lipids C2- and C16-ceramide form large stable channels. Implications for apoptosis." *J Biol Chem* 275(49): 38640-4.
- Slade, R., K. Crissman, et al. (1993). "Comparison of antioxidant substances in bronchoalveolar lavage cells and fluid from humans, guinea pigs, and rats." *Exp. Lung. Res.* 19: 469-484.
- Slater, A. F., M. Kimland, et al. (1995). "Constitutive nuclear NF kappa B/rel DNA-binding activity of rat thymocytes is increased by stimuli that promote apoptosis, but not inhibited by pyrrolidine dithiocarbamate." *Biochem J* 312 (Pt 3): 833-8.
- Slee, E. A., D. J. O'Connor, et al. (2004). "To die or not to die: how does p53 decide?" *Oncogene* 23(16): 2809-18.
- Sluss, H. K., T. Barrett, et al. (1994). "Signal transduction by tumor necrosis factor mediated by JNK protein kinases." *Mol Cell Biol* 14(12): 8376-84.
- Soler, A. P., C. W. Marano, et al. (1999). "Activation of NF-kappaB is necessary for the restoration of the barrier function of an epithelium undergoing TNF-alpha-induced apoptosis." *Eur J Cell Biol* 78(1): 56-66.
- Somasundaram, K. (2000). "Tumor suppressor p53: regulation and function." *Front Biosci* 5: D424-37.
- Song, G., G. Ouyang, et al. (2005). "The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival." *J Cell Mol Med* 9(1): 59-71.
- Sovak, M. A., R. E. Bellas, et al. (1997). "Aberrant nuclear factor-kappaB/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer." *J Clin Invest* 100(12): 2952-60.
- Srinivasula, S. M., M. Ahmad, et al. (1996). "Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway: the Fas/APO-1 protease Mch5 is a CrmA-inhibitable protease that activates multiple Ced-3/ICE-like cysteine proteases." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(25): 14486-91.
- Srinivasula, S. M., M. Ahmad, et al. (1997). "FLAME-1, a novel FADD-like anti-apoptotic molecule that regulates Fas/TNFR1-induced apoptosis." *J Biol Chem* 272(30): 18542-5.
- Stadtman, E. R. (1990). "Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences." *Free Rad. Biol. Med* 9(4): 315-325.
- Stadtman, E. R., P. E. Starke-Reed, et al. (1992). *Protein modification in aging*. I. Emerit and B. Chance. Basel, Virkhäuser Verlag. (Suiza). 64-72.
- Stallmeyer, B., G. Drugeon, et al. (1999). "Human molybdopterin synthase gene: identification of a bicistronic transcript with overlapping reading frames." *Am J Hum Genet* 64(3): 698-705.
- Stambolic, V., T. W. Mak, et al. (1999). "Modulation of cellular apoptotic potential: contributions to oncogenesis." *Oncogene* 18(45): 6094-103.
- Stefanon, B., M. Colitti, et al. (2002). "Mammary apoptosis and lactation persistency in dairy animals." *J Dairy Res* 69(1): 37-52.

- Stehlik, C., R. de Martin, et al. (1998). "Cytokine induced expression of porcine inhibitor of apoptosis protein (iap) family member is regulated by NF-kappa B." *Biochem Biophys Res Commun* 243(3): 827-32.
- Stewart, R. C., R. Hille, et al. (1984). "Characterization of arsenite-complexed xanthine oxidase at room temperature. Spectral properties and pH-dependent redox behavior of the molybdenum-arsenite center." *J Biol Chem* 259(23): 14426-36.
- Stewart, R. C., R. Hille, et al. (1985). "The reaction of arsenite-complexed xanthine oxidase with oxygen. Evidence for an oxygen-reactive molybdenum center." *J Biol Chem* 260(15): 8892-904.
- Stirpe, F. and E. Della Corte (1969). "The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O)." *J Biol Chem* 244(14): 3855-63.
- Stirpe, F. and E. Della Corte (1970). "The regulation of rat liver xanthine oxidase: conversion of type D (dehydrogenase) into type O (oxidase) by a thermolabile factor, and reversibility by dithioerythritol." *Biochim Biophys Acta* 212(1): 195-7.
- Strange, R., F. Li, et al. (1992). "Apoptotic cell death and tissue remodelling during mouse mammary gland involution." *Development* 115(1): 49-58.
- Strange, R., F. Li, et al. (1992). "Apoptotic cell death and tissue remodelling during mouse mammary gland involution." *Development* 115(1): 49-58.
- Strange, R., T. Metcalfe, et al. (2001). "Apoptosis in normal and neoplastic mammary gland development." *Microsc Res Tech* 52(2): 171-81.
- Streuli, C. H. and A. P. Gilmore (1999). "Adhesion-mediated signaling in the regulation of mammary epithelial cell survival." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 4(2): 183-91.
- Su, W. J., C. J. Chang, et al. (2002). "Apoptosis and oxidative stress of infiltrated neutrophils obtained from mammary glands of goats during various stages of lactation." *Am J Vet Res* 63(2): 241-6.
- Sugarman, B. J., B. B. Aggarwal, et al. (1985). "Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro." *Science* 230(4728): 943-5.
- Sun, M., F. Dawood, et al. (2004). "Excessive tumor necrosis factor activation after infarction contributes to susceptibility of myocardial rupture and left ventricular dysfunction." *Circulation* 110(20): 3221-8.
- Sun, W., X. Wei, et al. (2003). "MEK kinase 2 and the adaptor protein Lad regulate extracellular signal-regulated kinase 5 activation by epidermal growth factor via Src." *Mol Cell Biol* 23(7): 2298-308.
- Sympson, C. J., R. S. Talhouk, et al. (1994). "Targeted expression of stromelysin-1 in mammary gland provides evidence for a role of proteinases in branching morphogenesis and the requirement for an intact basement membrane for tissue-specific gene expression." *J Cell Biol* 125(3): 681-93.
- Takahashi, A., E. S. Alnemri, et al. (1996). "Cleavage of lamin A by Mch2 alpha but not CPP32: multiple interleukin 1 beta-converting enzyme-related proteases with distinct substrate recognition properties are active in apoptosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(16): 8395-400.
- Talhouk, R. S., M. J. Bissell, et al. (1992). "Coordinated expression of extracellular matrix-degrading proteinases and their inhibitors regulates mammary epithelial function during involution." *J Cell Biol* 118(5): 1271-82.

- Talhouk, R. S., J. R. Chin, et al. (1991). "Proteinases of the mammary gland: developmental regulation in vivo and vectorial secretion in culture." *Development* 112(2): 439-49.
- Tan, S., S. Gelman, et al. (1995). "Circulating xanthine oxidase in human ischemia reperfusion." *South. Med. J.* 88: 479-482.
- Tan, S., Y. Yokoyama, et al. (1993). "Xanthine oxidase activity in the circulation of rats following hemorrhagic shock." *Free Radical Biol. Med.* 15: 407-414.
- Tang, G., Y. Minemoto, et al. (2001). "Inhibition of JNK activation through NF-kappaB target genes." *Nature* 414(6861): 313-7.
- Tchou, J. and A. P. Grollman (1993). "Repair of DNA containing the oxidatively damaged base 8-oxoguanine." *Mutat. Res.* 299: 277-287.
- Tenenbein, M., S. Kowalski, et al. (1992). "Pulmonary toxic effects of continuous desferrioxamine administration in acute iron poisoning." *Lancet* 339(8795): 699-701.
- Tenev, T., A. Zachariou, et al. (2005). "IAPs are functionally non-equivalent and regulate effector caspases through distinct mechanisms." *Nat Cell Biol* 7(1): 70-7.
- Terada, L. S., J. J. Dormish, et al. (1992). "Circulating xanthine oxidase mediates lung neutrophil sequestration after intestinal ischemia-reperfusion." *Am J Physiol* 263(3 Pt 1): L394-401.
- Terada, L. S., B. M. Hybertson, et al. (1997). "XO increases neutrophil adherence to endothelial cells by a dual ICAM-1 and P-selectin-mediated mechanism." *J Appl Physiol* 82(3): 866-73.
- Terada, L. S., N. N. Mahr, et al. (1996). "Nitric oxide decreases lung injury after intestinal ischemia." *J Appl Physiol* 81(6): 2456-60.
- Terada, L. S., D. Piermattei, et al. (1997). "Hypoxia regulates xanthine dehydrogenase activity at pre- and posttranslational levels." *Arch Biochem Biophys* 348(1): 163-8.
- Terada, L. S., Z. Radisavljevic, et al. (1997). "Xanthine oxidase decreases production of gut wall nitric oxide." *Proc Soc Exp Biol Med* 216(3): 410-3.
- Terada, L. S., J. E. Repine, et al. (1997). "Endogenous nitric oxide decreases xanthine oxidase-mediated neutrophil adherence: role of P-selectin." *J Appl Physiol* 82(3): 913-7.
- Terada, L. S., J. D. Rubinstein, et al. (1991). "Existence and participation of xanthine oxidase in reperfusion injury of ischemic rabbit myocardium." *Am J Physiol* 260(3 Pt 2): H805-10.
- Terao, M., M. Kurosaki, et al. (1998). "Isolation and characterization of the human aldehyde oxidase gene: conservation of intron/exon boundaries with the xanthine oxidoreductase gene indicates a common origin." *Biochem J* 332 (Pt 2): 383-93.
- Terao, M., M. Kurosaki, et al. (2001). "Purification of the aldehyde oxidase homolog 1 (AOH1) protein and cloning of the AOH1 and aldehyde oxidase homolog 2 (AOH2) genes. Identification of a novel molybdo-flavoprotein gene cluster on mouse chromosome 1." *J Biol Chem* 276(49): 46347-63.
- Thompson, C. G. (1995). "Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease." *Science* 267: 1456-1462.
- Thornberry, N. A. and Y. Lazebnik (1998). "Caspases: enemies within." *Science* 281(5381): 1312-6.
- Tomassini, B. and R. Testi (2002). "Mitochondria as sensors of sphingolipids." *Biochimie* 84(2-3): 123-9.

- Topper, Y. J., B. K. Vonderhaar, et al. (1975). "Characterization of super-active insulin, prolactin and placental lactogen." *Biochem Biophys Res Commun* 66(2): 793-8.
- Truglio, J. J., K. Theis, et al. (2002). "Crystal structures of the active and alloxanthine-inhibited forms of xanthine dehydrogenase from *Rhodobacter capsulatus*." *Structure (Camb)* 10(1): 115-25.
- Tsujimoto, Y. and S. Shimizu (2000). "VDAC regulation by the Bcl-2 family of proteins." *Cell Death Differ* 7(12): 1174-81.
- Tsutsumi, Z., Y. Moriwaki, et al. (2004). "Oxidized low-density lipoprotein autoantibodies in patients with primary gout: effect of urate-lowering therapy." *Clin Chim Acta* 339(1-2): 117-22.
- Uchida, K. and S. Kawakishi (1993). "Oxo-histidine as a novel biological marker for oxidatively modified proteins." *FEBS*. 332(3): 208-210.
- Uchiyama, Y. (1995). "Apoptosis: The history and trends of its studies." *Arch Histol Cytol* 58(2): 127-37.
- Ukai, T., C. P. Cheng, et al. (2001). "Allopurinol enhances the contractile response to dobutamine and exercise in dogs with pacing-induced heart failure." *Circulation* 103(5): 750-5.
- Usuda, N., M. K. Reddy, et al. (1988). "Tissue specificity and species differences in the distribution of urate oxidase in peroxisomes." *Lab Invest* 58(1): 100-11.
- Van Antwerp, D. J., S. J. Martin, et al. (1996). "Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB." *Science* 274(5288): 787-9.
- Van Antwerp, D. J., S. J. Martin, et al. (1998). "Inhibition of TNF-induced apoptosis by NF-kappa B." *Trends Cell Biol* 8(3): 107-11.
- Van Houten, B., V. Woshner, et al. (2005). "Role of mitochondrial DNA in toxic responses to oxidative stress." *DNA Repair (Amst)*.
- van Wijk, S. J. and G. J. Hageman (2005). "Poly(ADP-ribose) polymerase-1 mediated caspase-independent cell death after ischemia/reperfusion." *Free Radic Biol Med* 39(1): 81-90.
- Vanags, D. M., M. I. Porn-Ares, et al. (1996). "Protease involvement in fodrin cleavage and phosphatidylserine exposure in apoptosis." *J Biol Chem* 271(49): 31075-85.
- Varadarajan, S., J. Kanski, et al. (2001). "Different mechanisms of oxidative stress and neurotoxicity for Alzheimer's A beta(1--42) and A beta(25--35)." *J Am Chem Soc* 123(24): 5625-31.
- Verheij, M., R. Bose, et al. (1996). "Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis." *Nature* 380(6569): 75-9.
- Verma, A. and L. C. Plataniias (2002). "Signaling via the interferon-alpha receptor in chronic myelogenous leukemia cells." *Leuk Lymphoma* 43(4): 703-9.
- Vickers, S., H. J. Schiller, et al. (1998). "Immunoaffinity localization of the enzyme xanthine oxidase on the outside surface of the endothelial cell plasma membrane." *Surgery* 124(3): 551-60.
- Viña, J., E. Gascó, et al. (1990). Effect of physiological changes in cystathionase activity on aminoacid and glutathione metabolism in rat fetus. Endocrine and biochemical development of the fetus and neonate. J. M. Cuezva and A. M. Pascual-Leone. Nueva York., Editorial Plenum Press: 283-286.
- Viña, J., A. Gimenez, et al. (1992). "Impairment of cysteine synthesis from methionine in rats exposed to surgical stress." *Br J Nutr* 68(2): 421-9.

- Viña, J., A. Gimeno, et al. (2000). "Mechanism of free radical production in exhaustive exercise in humans and rats; role of xanthine oxidase and protection by allopurinol." *IUBMB Life* 49(6): 539-44.
- Viña, J., M. C. Gomez-Cabrera, et al. (2000). "Free radicals in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants." *IUBMB Life* 50(4-5): 271-7.
- Viña, J., C. Pérez, et al. (1989). "Effect of oral glutathione on hepatic glutathione levels in rats and mice." *Br. J. Nutr.* 62: 683-691.
- Viña, J., G. T. Sáez, et al. (1983). "The effect of cysteine oxidation on isolated hepatocytes." *Biochem. J.* 212: 39-44.
- Viña, J., J. Sastre, et al. (1995). "Assay of blood glutathione oxidation during physical exercise." *Methods Enzymol* 251: 237-43.
- Viña, J., J. Sastre, et al. (2003). "Mitochondrial theory of aging: importance to explain why females live longer than males." *Antioxid Redox Signal* 5(5): 549-56.
- Viña, J., J. R. Viña, et al. (1986). "Glutathione: metabolism and physiological functions." *Life Chem. Rep.* 4: 1-35.
- Vincent, A. M., J. W. Russell, et al. (2004). "Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy." *Endocr Rev* 25(4): 612-28.
- Vitale, G., L. Bernardi, et al. (2000). "Susceptibility of mitogen-activated protein kinase family members to proteolysis by anthrax lethal factor." *Biochem J* 352 Pt 3: 739-45.
- Vogelstein, B. and K. W. Kinzler (1992). "p53 function and dysfunction." *Cell* 70(4): 523-6.
- Walker, N. I., R. E. Bennett, et al. (1989). "Cell death by apoptosis during involution of the lactating breast in mice and rats." *Am J Anat* 185(1): 19-32.
- Wang, C. Y., M. W. Mayo, et al. (1996). "TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB." *Science* 274(5288): 784-7.
- Wang, C. Y., M. W. Mayo, et al. (1998). "NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation." *Science* 281(5383): 1680-3.
- Warner, D. S., H. Sheng, et al. (2004). "Oxidants, antioxidants and the ischemic brain." *J Exp Biol* 207(Pt 18): 3221-31.
- Watanabe, S., D. H. Kang, et al. (2002). "Uric acid, hominoid evolution, and the pathogenesis of salt-sensitivity." *Hypertension* 40(3): 355-60.
- Waterhouse, N. J., K. A. Sedelies, et al. (2005). "A central role for Bid in granzyme B-induced apoptosis." *J Biol Chem* 280(6): 4476-82.
- Watson, F. L., H. M. Heerssen, et al. (2001). "Neurotrophins use the Erk5 pathway to mediate a retrograde survival response." *Nat Neurosci* 4(10): 981-8.
- Waud, W. R., F. O. Brady, et al. (1975). "A new purification procedure for bovine milk xanthine oxidase: effect of proteolysis on the subunit structure." *Arch Biochem Biophys* 169(2): 695-701.
- Waud, W. R. and K. V. Rajagopalan (1976). "The mechanism of conversion of rat liver xanthine dehydrogenase from an NAD⁺-dependent form (type D) to an O₂-dependent form (type O)." *Arch Biochem Biophys* 172(2): 365-79.
- Waud, W. R. and K. V. Rajagopalan (1976). "Purification and properties of the NAD⁺-dependent (type D) and O₂-dependent (type O) forms of rat liver xanthine dehydrogenase." *Arch Biochem Biophys* 172(2): 354-64.

- Webley, K., J. A. Bond, et al. (2000). "Posttranslational modifications of p53 in replicative senescence overlapping but distinct from those induced by DNA damage." *Mol Cell Biol* 20(8): 2803-8.
- Webster, G. A. and N. D. Perkins (1999). "Transcriptional cross talk between NF-kappaB and p53." *Mol Cell Biol* 19(5): 3485-95.
- Wei, M. C., T. Lindsten, et al. (2000). "tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c." *Genes Dev* 14(16): 2060-71.
- Weih, F., D. Carrasco, et al. (1995). "Multiorgan inflammation and hematopoietic abnormalities in mice with a targeted disruption of RelB, a member of the NF-kappa B/Rel family." *Cell* 80(2): 331-40.
- Weil, M. (1996). "Constitutive expression of the machinery for programmed cell death." *J.Cell.Biol*(133): 1053-1059.
- Weinbroum, A., V. G. Nielsen, et al. (1995). "Liver ischemia-reperfusion increases pulmonary permeability in rat: role of circulating xanthine oxidase." *Am J Physiol* 268(6 Pt 1): G988-96.
- Werns, S. W., C. M. Grum, et al. (1991). "Xanthine oxidase inhibition does not limit canine infarct size." *Circulation* 83: 995-1005.
- White, C. R., V. Darley-Usmar, et al. (1996). "Circulating plasma xanthine oxidase contributes to vascular dysfunction in hypercholesterolemic rabbits." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(16): 8745-9.
- White, M. J. and F. R. Heckler (1990). "Oxygen free radicals and wound healing." *Clin Plast Surg* 17(3): 473-84.
- Whiteside, S. T. and A. Israel (1997). "I kappa B proteins: structure, function and regulation." *Semin Cancer Biol* 8(2): 75-82.
- Whitmarsh, A. J. and R. J. Davis (1998). "Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals." *Trends Biochem Sci* 23(12): 481-5.
- Wiernsperger, N. F. (2003). "Oxidative stress as a therapeutic target in diabetes: revisiting the controversy." *Diabetes Metab* 29(6): 579-85.
- Wiernsperger, N. F. (2003). "Oxidative stress: the special case of diabetes." *Biofactors* 19(1-2): 11-8.
- Wilde, C. J., C. H. Knight, et al. (1999). "Control of milk secretion and apoptosis during mammary involution." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 4(2): 129-36.
- Will, H., S. J. Atkinson, et al. (1996). "The soluble catalytic domain of membrane type 1 matrix metalloproteinase cleaves the propeptide of progelatinase A and initiates autoproteolytic activation. Regulation by TIMP-2 and TIMP-3." *J Biol Chem* 271(29): 17119-23.
- Williamson, D. H., P. Lund, et al. (1995). "Substrate selection and oxygen uptake by the lactating mammary gland." *Proc Nutr Soc* 54(1): 165-75.
- Wispe, J. R., E. F. Bell, et al. (1985). "Assesment of lipid peroxidation in newborn infants and rabbitsby meassurements of expired ethane and pentane: influence of parenteral lipid infusion." *Pediatr Res* 19: 374-379.
- Wispe, J. R., M. Knight, et al. (1986). "Lipid peroxidation in newborn rabbits: Effects of oxygen, lipid emulsion and vitamin E." *Pediatr Res* 20: 505-510.
- Wolf, S. P., A. Gamer, et al. (1986). "Free radicals, lipids and protein degeneration." *Trends Bioch. Sci.* 11: 27-31.
- Wolff, S. P. and R. T. Dean (1987). "Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes." *Biochem J* 245(1): 243-50.

- Wolkowicz, R. and V. Rotter (1997). "The DNA binding regulatory domain of p53: see the C." *Pathol Biol (Paris)* 45(10): 785-96.
- Wright, R. M., D. A. Clayton, et al. (1999). "cDNA cloning, sequencing, and characterization of male and female rat liver aldehyde oxidase (rAOX1). Differences in redox status may distinguish male and female forms of hepatic APX." *J Biol Chem* 274(6): 3878-86.
- Wright, R. M., L. A. Ginger, et al. (2004). "Mononuclear phagocyte xanthine oxidoreductase contributes to cytokine-induced acute lung injury." *Am J Respir Cell Mol Biol* 30(4): 479-90.
- Wright, R. M. and J. E. Repine (1997). "The human molybdenum hydroxylase gene family: co-conspirators in metabolic free-radical generation and disease." *Biochem Soc Trans* 25(3): 799-804.
- Wright, R. M., G. M. Vaitaitis, et al. (1993). "cDNA cloning, characterization, and tissue-specific expression of human xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(22): 10690-4.
- Wu, G. S., T. F. Burns, et al. (1997). "KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene." *Nat Genet* 17(2): 141-3.
- Wu, M., M. Arsura, et al. (1996). "Inhibition of c-myc expression induces apoptosis of WEHI 231 murine B cells." *Mol Cell Biol* 16(9): 5015-25.
- Wu, M. X., Z. Ao, et al. (1998). "IEX-1L, an apoptosis inhibitor involved in NF-kappaB-mediated cell survival." *Science* 281(5379): 998-1001.
- Xia, M., R. Dempski, et al. (1999). "The reductive Half-reaction of Xanthine Oxidase." *J. Biol. Chem.* 274: 3323-3330.
- Xu, P., T. P. Huecksteadt, et al. (1994). "Molecular cloning, tissue expression of human xanthine dehydrogenase." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199: 998-1004.
- Xu, P., T. P. Huecksteadt, et al. (1996). "Molecular cloning and characterization of the human xanthine dehydrogenase gene (XDH)." *Genomics* 34(2): 173-80.
- Xu, P., P. LaVallee, et al. (2000). "Repressed expression of the human xanthine oxidoreductase gene. E-box and TATA-like elements restrict ground state transcriptional activity." *J Biol Chem* 275(8): 5918-26.
- Yamamoto, T., Y. Moriwaki, et al. (1996). "Determination of human plasma xanthine oxidase activity by high-performance liquid chromatography." *J Chromatogr B Biomed Appl* 681(2): 395-400.
- Yonish-Rouach, E., D. Resnitzky, et al. (1991). "Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6." *Nature* 352(6333): 345-7.
- You, M., P. T. Ku, et al. (1997). "ch-IAP1, a member of the inhibitor-of-apoptosis protein family, is a mediator of the antiapoptotic activity of the v-Rel oncoprotein." *Mol Cell Biol* 17(12): 7328-41.
- Yu, J., Z. Wang, et al. (2003). "PUMA mediates the apoptotic response to p53 in colorectal cancer cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(4): 1931-6.
- Zaragoza, R., C. Garcia, et al. (2003). "Inhibition of liver trans-sulphuration pathway by propargylglycine mimics gene expression changes found in the mammary gland of weaned lactating rats: role of glutathione." *Biochem J* 373(Pt 3): 825-34.
- Zarubin, T. and J. Han (2005). "Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway." *Cell Res* 15(1): 11-8.

- Zhang, Y., C. C. Fong, et al. (2005). "Molecular mechanisms of survival and apoptosis in RAW 264.7 macrophages under oxidative stress." *Apoptosis* 10(3): 545-556.
- Zhong, H., H. SuYang, et al. (1997). "The transcriptional activity of NF-kappaB is regulated by the IkappaB-associated PKAc subunit through a cyclic AMP-independent mechanism." *Cell* 89(3): 413-24.
- Zhou, G., Z. Q. Bao, et al. (1995). "Components of a new human protein kinase signal transduction pathway." *J Biol Chem* 270(21): 12665-9.
- Zhu, A. X., Y. Zhao, et al. (1994). "Cloning and characterization of p97MAPK, a novel human homolog of rat ERK-3." *Mol Cell Biol* 14(12): 8202-11.
- Zimmerman, B. J., D. A. Parks, et al. (1988). "Allopurinol does not enhance antioxidant properties of extracellular fluid." *Am J Physiol* 255(1 Pt 2): H202-6.
- Zou, Y., K. J. Jung, et al. (2004). "Alteration of soluble adhesion molecules during aging and their modulation by calorie restriction." *Faseb J* 18(2): 320-2.
- Zurfluh, L. L., S. L. Bolten, et al. (1990). "Isolation of genomic sequence encoding a biologically active bovine TGF-alpha protein." *Growth Factors* 3(4): 257-66.