

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR

CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE LOS GENES
INVOLUCRADOS EN EL CICLO CELULAR Y APOPTOSIS
DURANTE EL DESTETE EN LA GLÁNDULA MAMARIA
DE RATA LACTANTE. PAPEL DEL GSH

ROSA ZARAGOZA COLOM

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2004

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el día 22 de Juliol de 2004 davant un tribunal format per:

- Dr. D. Luis Franco Vera
- Dr. D. Luis Arola Ferrer
- Dr. D. Antonio Llombart Bosch
- Dr. D. José M^a Medina Jiménez
- Dr. D. Federico Pallardó Calatayud

Va ser dirigida per:

Dr. D. Juan Viña Ribes

Dr. D. Vicente Miralles Fernández

©Copyright: Servei de Publicacions
Rosa Zaragoza Colom

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-6080-X

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

UNIVERSIDAD DE VALENCIA
FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

**CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE LOS GENES INVOLUCRADOS EN
EL CICLO CELULAR Y APOPTOSIS DURANTE EL DESTETE EN LA
GLÁNDULA MAMARIA DE RATA LACTANTE. PAPEL DEL GSH.**

ROSA ZARAGOZÁ COLOM

2004

D. JUAN VIÑA RIBES. Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Valencia.

D. VICENTE MIRALLES FERNÁNDEZ. Profesor Titular de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Valencia.

CERTIFICAN:

Que Dña. ROSA ZARAGOZÁ COLOM, Licenciada en Farmacia por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo nuestra dirección y asesoramiento el presente trabajo de investigación, titulado “Cambios en la expresión de los genes involucrados en el ciclo celular y apoptosis durante el destete en la glándula mamaria de rata lactante. Papel del GSH.”, el cual posee la suficiente calidad científica para ser presentado en la obtención del grado de Doctora en Farmacia.

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

En Valencia, a 22 de Marzo de 2004

Dr. Juan Viña Ribes

Dr. Vicente Miralles Fernández

El presente trabajo ha sido subvencionado con ayudas del Ministerio de Ciencia y Tecnología y Plan Nacional (I+D+I; BFI2001-2842; PM99-0148), del Instituto de Salud Carlos III, RCMN (C03/08) y con una beca de apoyo a la investigación F.P.U. del Ministerio de Educación, Cultura y Deportes.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero expresar mi agradecimiento a mis directores. Al Dr. D. Juan R. Viña, por ofrecerme la oportunidad de realizar esta Tesis, así como por su dedicación y apoyo a lo largo de estos años y al Dr. D. Vicente Miralles, que además de director también ha ejercido de tutor, no ya por haberme introducido en el mundo de la investigación sino fundamentalmente, por la amistad y el cariño brindados.

A Concha García de Mier, porque siempre ha estado ahí y porque sin su ayuda no habría podido desarrollar todo el trabajo de esta Tesis. También debo agradecer la amistad y buenos ratos compartidos con Eli y Begoña que han hecho el día a día mucho más ameno.

A todos los miembros del Departamento de Farmacia: Luís, Teresa, Fernando, M^a Jesús, Ernesto, Julio, Pilar, Mariela, Amelia, Joaquín, Joan y Joana por los buenos momentos compartidos, dentro y fuera del laboratorio (siempre quedarán para el recuerdo esas fiestas de la patrona y cenitas de departamento). En especial quiero agradecer al Dr. Torres sus valiosas clases teóricas y su ayuda en el diseño experimental y al Dr. Aniento, vecino de bancada, el que siempre me haya solucionado cualquier duda a nivel experimental.

A mis compañeros de Farmacia, los que empezamos juntos: Elena, Inma, María, Amparo, y las futuras promesas: Do (siempre nos quedará Heidelberg), Guillermo y Vanesa, con quienes compartí tantas horas de trabajo e inquietudes; por los buenos y malos momentos que hemos pasado juntos y porque con ellos he aprendido a disfrutar más de la vida.

A todos los miembros del Departamento de Bioquímica de la Sección de Medicina, Dr. Cabo, Dr. Sáez, Dra. Puertes, Dra. Alonso y Dr. O'Connor por su colaboración y apoyo, así como a M^a Carmen, Olga y Domingo, que parecen vivir en la facultad, por las risas compartidas.

A todos los miembros del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina, en especial al Dr. Pallardó por su ayuda desinteresada y los sabios consejos recibidos. También a Chelo, Ana, M^a Carmen, Diana, Pain y un largo etcétera (son muchos) porque siempre han estado ahí cuando he recurrido a ellos.

Al Dr. Morris Birnbaum (UPENN, Philadelphia) y la Dra. Fátima Bosch (UAB, Barcelona) por haberme permitido realizar estancias en sus respectivos laboratorios y a los diferentes miembros de sus equipos (Todd, Bob, Maureen, Eileen, Miquel, Sergio, Carles, Xavi, Virginia, Mireia, Marta, María, Ana, Ari, Ainara, etc.) por haber hecho que mi estancia en ambas ciudades haya sido inolvidable.

Por último a Victoria, Lali, Laura y M^a Carmen, con quienes he compartido viajes y horas de conversaciones telefónicas y me han ayudado a superar mi fobia a hablar en público.

A mi madre,

por ser un apoyo incondicional

A la memoria de mi padre,

que siempre ha estado presente

ÍNDICE

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
1.- LA GLÁNDULA MAMARIA DE RATA LACTANTE COMO MODELO EXPERIMENTAL EN BIOQUÍMICA.....	2
1.1 Introducción.....	2
1.2 Estudio de la captación de nutrientes.....	3
1.3 Iniciación y mantenimiento de la secreción láctea. Señales reguladoras durante la lactancia.....	5
1.3.1 Desarrollo del tejido mamario.....	5
1.3.2 Señales reguladoras del desarrollo y mantenimiento de la secreción láctea.....	8
1.4 Producción de leche.....	10
2. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS DE LA APOPTOSIS.....	11
2.1 Concepto de muerte celular programada.....	11
2.2 Características morfológicas de la apoptosis.....	12
2.3 Mecanismos moleculares que rigen la apoptosis. Fases de la apoptosis.....	13
2.3.1 Fase de iniciación.....	13
2.3.2 Fase de ejecución.....	16
2.3.3 Fase de degradación celular.....	20
2.4 Mecanismos reguladores de la apoptosis.....	21
2.4.1 Inactivación de ligandos.....	21
2.4.2 Proteínas inhibidoras y favorecedoras de la apoptosis.....	21
2.4.3 Activación de factores de transcripción anti-apoptóticos.....	24
2.4.4 Inhibición de las caspasas.....	29
2.5 Mecanismos amplificadores de la apoptosis.....	31
2.6 Significado fisiológico y patológico de la apoptosis.....	31

3. EL ÓXIDO NÍTRICO COMO REGULADOR DE LA APOPTOSIS.....	32
3.1 Síntesis del óxido nítrico.	32
3.1.1 Papel del NO en la glándula mamaria.	33
3.2 Funciones del NO.	34
3.3 El NO como molécula pro- y antiapoptótica.	36
3.3.1 El NO como inductor proapoptótico.	37
3.3.2 El NO como modulador antiapoptótico.	39
4. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DEL GSH.....	41
4.1 Funciones celulares del GSH.	41
4.2 Flujo intertisular de GSH en la rata lactante: redistribución específica hacia la glándula mamaria.	43
4.3 Relación entre los niveles de GSH mitocondrial y la apoptosis celular.	46
OBJETIVOS.....	48
MATERIAL Y MÉTODOS.	51
1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN: CUIDADOS GENERALES.	52
2. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LECHE.....	53
3. OBTENCIÓN DE MUESTRAS TISULARES.	54
4. DETERMINACIÓN DE GLUTATIÓN REDUCIDO (GSH).	54
5. DETERMINACIONES ENZIMÁTICAS.	55
5.1 Determinación de la actividad de la γ -cistationasa.	55
5.2 Determinación de la actividad de la γ -glutamilttransferasa.	56
6. DETERMINACIÓN DE NITRITOS POR FLUORESCENCIA.....	56

7. OBTENCIÓN DE ACINI AISLADOS DE GLÁNDULA MAMARIA DE RATA LACTANTE	57
8. AISLAMIENTO DE DNA Y ENSAYO DE FRAGMENTACIÓN DEL DNA.	57
9. OBTENCIÓN DE RNA TOTAL.	58
10. CUANTIFICACIÓN DE RNA Y DNA.....	58
11. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL mRNA POR RT-PCR.	59
12. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES CON MICROARRAY CHIPS.....	61
12.1 Aislamiento del RNA total y preparación del mismo.....	61
12.2 Hibridación del cRNA marcado con biotina.	63
12.3 Lavados y tinción de las sondas hibridadas.	64
12.4 Escaneado y análisis informático de los datos obtenidos.	65
13. TÉCNICA DEL WESTERN-BLOT.....	65
13.1 Aislamiento de proteínas a partir de tejidos.	65
13.2 Separación de proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida- SDS y transferencia a membrana de nitrocelulosa.	66
13.3 Identificación de las proteínas mediante Western-blot.....	66
14. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.....	67
 RESULTADOS.....	 69
1.- LA DISMINUCIÓN EN LA DISPONIBILIDAD DE GSH MIMETIZA LA INVOLUCIÓN DE LA GLÁNDULA MAMARIA TRAS EL DESTETE.....	70
1.1 Actividades de la γ -cistationasa y de la GGT y concentración de GSH en el hígado y la glándula mamaria de ratas lactantes y de ratas lactantes tratadas con inhibidores de la síntesis de GSH.	70
1.2 La inhibición de la actividad de la γ -cistationasa hepática afecta a la lactancia y su efecto se revierte tras la administración de NAC.	72

1.3	La separación de las crías y la inhibición de la trans-sulfuración hepática por tratamiento con PPG inducen apoptosis en la glándula mamaria de rata lactante.....	73
1.3.1	Liberación de citocromo c.....	74
1.3.2	Activación de endonucleasas y fragmentación del DNA.....	75
1.4	Análisis de la expresión de genes implicados en la involución de la glándula mamaria de rata lactante.....	77
1.4.1	Efecto del destete sobre JNK, c-Jun, p53, p21 y p27.....	77
1.4.2	Efecto de la inhibición de la trans-sulfuración hepática con PPG sobre la expresión de JNK, c-Jun, p53, p21 y p27.....	81
1.4.3	Efecto de la inhibición de la síntesis de GSH con BSO.....	84
2.-	PAPEL DEL ÓXIDO NÍTRICO.....	85
2.1	Determinación de la presencia de las tres isoformas de NOS en la glándula mamaria de rata lactante.....	85
2.1.1	Determinación por RT-PCR de las tres isoformas.....	86
2.1.2	Determinación de las isoformas de NOS en la glándula mamaria por inmunotransferencia.....	86
2.2	Modificaciones en los niveles de proteína de las distintas isoformas de NOS durante la involución de la glándula mamaria y tras el tratamiento con BSO.....	87
2.3	Determinación de nitritos por fluorescencia en la glándula mamaria.....	88
2.4	Nitración de proteínas.....	89
3.	ESTUDIO DE PATRONES DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE MICROARRAY CHIPS.....	91
3.1	Clasificación de los genes que se expresan diferencialmente en el destete de 8 horas o tras el tratamiento con PPG.....	91

DISCUSIÓN.....	99
1. LA INVOLUCIÓN DE LA GLÁNDULA MAMARIA DE RATA LACTANTE COMO MODELO DE APOPTOSIS.....	100
2. CAMBIOS GÉNICOS QUE SE PRODUCEN EN LA GLÁNDULA MAMARIA DE RATA LACTANTE DURANTE LA INVOLUCIÓN Y CUANDO EXISTE UN DÉFICIT DE GSH EN RATAS LACTANTES	103
2.1 Cambios en la expresión de p53 y genes relacionados.....	103
2.2 Estudio de los patrones de expresión génica en la involución de la glándula mamaria mediante “microarray chips”	107
2.2.1 Genes implicados en la apoptosis.....	107
2.2.2 Enzimas implicados en el metabolismo lipídico.	108
3. PAPEL DEL ÓXIDO NÍTRICO EN EL DESTETE Y TRAS EL TRATAMIENTO CON BSO.....	110
CONCLUSIONES.....	114
BIBLIOGRAFÍA.....	116

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de las señales reguladoras de la secreción láctea..... 7

Figura 2. Vía de la alteración mitocondrial en la apoptosis..... 16

Figura 3. Mecanismo de acción de las caspasas. 20

Figura 4. Consecuencias de las reacciones de homo y heterodimerización de las proteínas de la familia Bcl-2. 24

Figura 5. Reacciones del NO cuando se encuentra a altas concentraciones..... 36

Figura 6. Ciclo del γ -glutamilo. 44

Figura 7. Flujo intertisular de GSH total durante la lactancia. 45

Figura 8. Análisis del citocromo c por inmunotransferencia del extracto de proteínas citosólicas de ratas lactantes sometidas a diferentes tiempos de destete y tratadas con PPG, NAC o ambos..... 75

Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 3% de los extractos de DNA nuclear obtenidos de glándula mamaria de rata lactante en distintas situaciones. 77

Figura 10. Niveles de mRNA de c-Jun, p53 y p21 analizados por RT-PCR en la glándula mamaria durante el destete..... 79

Figura 11. Análisis mediante inmunotransferencia de p-JNK, c-Jun, p53, p21 y p27 en glándula mamaria tras el destete. 80

Figura 12. Análisis por RT-PCR de c-Jun, p53 y p21 en ratas lactantes control y en ratas tratadas con PPG, NAC y ambos. 82

Figura 13. Análisis mediante inmunotransferencia de p-JNK, c-Jun, p53, p21 y p27 en tejido mamario de ratas lactantes control y ratas lactantes tratadas con PPG, NAC y ambos.....	83
Figura 14. Análisis por RT-PCR de c-Jun, p53 y p21 y por inmunotransferencia de pJNK, c-Jun, p53, p27 y p21 en ratas lactantes tratadas durante dos días con BSO.	84
Figura 15. Expresión del mRNA de eNOS, iNOS y nNOS en glándula mamaria de rata lactante.	86
Figura 16. Análisis mediante inmunotransferencia de las tres isoformas de NOS.	87
Figura 17. Análisis por inmunotransferencia de los niveles de las distintas isoformas de NOS en glándula mamaria de rata lactante en distintas situaciones.	88
Figura 18. Niveles de nitritos determinados por fluorescencia en glándula mamaria.	89
Figura 19. Análisis por inmunotransferencia empleando un anticuerpo contra nitrotirosina de extractos de proteína total de glándula mamaria en distintas condiciones.....	90
Figura 20. Imagen representativa de tres microarrays realizados para el estudio de los patrones de expresión de las distintas condiciones.	91
Figura 21. Clasificación según el proceso biológico, de aquellos genes que se expresan diferencialmente en el destete de 8 horas y el tratamiento con PPG frente a control.	93
Figura 22. Procesos clave en el desarrollo y la remodelación del tejido mamario durante la lactancia y en la involución.	100
Figura 23. Lipogénesis <i>de novo</i> a partir de D-glucosa.....	109
Figura 24. Posibles mecanismos que conducen a la apoptosis inducida por el NO en la glándula mamaria durante el destete.....	113

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Actividades de la GGT y la γ -cistationasa y concentración de glutatión reducido (GSH) en el hígado y en la glándula mamaria de ratas lactantes control y ratas tratadas con PPG, NAC o ambos.	71
Tabla 2. Producción de leche en ratas lactantes control y ratas lactantes tratadas con PPG, NAC o ambos, durante tres días.	72
Tabla 3. Determinación de la producción de leche en ratas lactantes control y tratadas con PPG durante tres días, con intercambio de la camada.	73
Tabla 4. Cambios en los niveles de transcripción de genes concretos tras el destete de 8 horas.	93
Tabla 5. Cambios en los niveles de transcripción de genes concretos tras el tratamiento con PPG.	96

ABREVIATURAS

Aa: Aminoácido

AIF: Apoptosis-induced factor.

Apaf-1: Apoptotic protease activating factor-1.

BSO: Butionina sulfoximina.

CAD: Caspase-activated DNase.

CDK: Cyclin-dependent kinase.

DIABLO: Direct IAP-binding protein with low pI.

dNTPs: Desoxirribonucleótidos.

EDTA: Ácido etilendiamino tetracético.

GGT: γ -Glutamyltranspeptidasa.

GH: Hormona del crecimiento.

GSH: Glutación, γ -glutamyl-cisteinil-glicina.

GSSG: Glutación disulfuro.

IAP: Proteínas inhibidoras de la apoptosis.

mtDNA: DNA mitocondrial

ME: Matriz extracelular.

NAC: N-Acetilcisteína

NO: Óxido nítrico.

NOS: Óxido nítrico sintasa.

pb: Pares de bases.

PCD: Muerte celular programada.

PPG: Propargilglicina.

PTP: Permeability transition pore.

Rb: Retinoblastoma.

RER: Retículo endoplásmico rugoso.

RNS: Especies reactivas del nitrógeno.

ROS: Especies reactivas del oxígeno.

RT-PCR: Transcripción inversa-Reacción en cadena de la polimerasa.

Smac: Second mitochondria-derived activator of caspases.

TNF: Factor de necrosis tumoral.

INTRODUCCIÓN

1. LA GLÁNDULA MAMARIA DE RATA LACTANTE COMO MODELO EXPERIMENTAL EN BIOQUÍMICA.

1.1. Introducción.

La lactancia es el último eslabón en el ciclo reproductor y una de las funciones fisiológicas más antiguas de los mamíferos. La antigüedad de este proceso se estima en varios centenares de millones de años y su aparición es previa a la gestación placentaria. Es difícil determinar la importancia a nivel evolutivo y funcional del tejido mamario en biología. La glándula mamaria es un tejido diferenciado en el que se expresan unos genes determinados en respuesta a una variedad de señales ya sean hormonales, celulares o de la matriz extracelular (Wiseman y Werb, 2002). Además, es el único órgano en el que la mayor parte del desarrollo ocurre en la edad adulta y que puede sufrir sucesivos ciclos de desarrollo y regresión. En los últimos 15 años, investigadores de diversas disciplinas han comprobado el gran potencial de este tejido al proporcionar modelos experimentales para el estudio de la morfogénesis y desarrollo tisular; de la diferenciación celular; de la biosíntesis y secreción de proteínas, lípidos, pequeñas moléculas y sales inorgánicas y para la coordinación y regulación de estos procesos (Bell, 1995). Así mismo, se ha demostrado que es un modelo de gran utilidad para estudiar la apoptosis (Li y cols., 1997a; Kumar y cols., 2000). Recientemente, la posibilidad de emplear las células epiteliales secretoras del tejido mamario para la producción de proteínas recombinantes en animales lactantes ha centrado la atención de la industria farmacéutica en este campo concreto (Clark, 1998; Houdebine y cols., 2002; Lui y cols., 2003). Además de esta aplicación biotecnológica, el papel tradicional de los animales lactantes persiste, como una fuente muy importante de alimentos para el consumo humano. En este ámbito de producción agrícola las tecnologías genéticas y nutricionales se encuentran en continua investigación y explotación para optimizar la composición de la leche para distintas finalidades, por ejemplo en el procesado de alimentos.

La leche materna, además de proveer de macronutrientes y micronutrientes al recién nacido, le suministra inhibidores de la adherencia bacteriana, confiriéndole inmunidad pasiva hasta que su propio sistema inmune haya madurado. Estos

anticuerpos son transportados de forma selectiva del suero a la glándula mamaria de modo que encontramos una elevada concentración de ellos en el primer calostro (40-200 mg/mL) para posteriormente disminuir durante el período de lactancia a una concentración de 0.7-1.0 mg/mL (Korhonen y cols., 2000). La mayoría de estas inmunoglobulinas son IgA y juegan un papel primordial en la prevención de infecciones gastrointestinales (Van de Perre, 2003), que son la principal causa de mortalidad infantil a nivel mundial. Es importante indicar que no existe fórmula adaptada que ofrezca tal protección inmunológica (Newman, 1996; Hanson y cols., 2003). Estos factores secretados en la leche, no sólo proporcionan protección al lactante sino que favorecen el desarrollo de su propio sistema inmunitario. Además, son esenciales para la protección de la glándula mamaria frente a la colonización por patógenos, que afectaría al proceso de la lactancia (Kelleher y Lonnerdal, 2001).

1.2. Estudio de la captación de nutrientes.

El control bioquímico del metabolismo durante cualquier proceso fisiológico implica dos tipos de regulación: homeostasis y homeorresis. El ejemplo más claro de homeorresis es la lactancia, ya que se producen importantes alteraciones en el metabolismo de los diferentes tejidos con el fin de que la glándula mamaria reciba los metabolitos necesarios para la síntesis de la leche necesaria para el correcto crecimiento del neonato (Bauman y Currie, 1980; Williamson, 1980; Williamson y cols. 1995). La rata durante la lactancia sufre una serie de cambios fisiológicos como son: hipertrofia de la glándula mamaria, hígado, riñón, tracto alimentario (Fell y cols., 1963; Cripps y Williams, 1975) y corazón, junto con un aumento del trabajo cardíaco (Chatwin y cols., 1969). En el pico de la lactancia, la glándula recibe el 10% del gasto cardíaco comparado con el 0.5% en las ratas no lactantes. Esto supone que el flujo sanguíneo a la glándula durante la lactancia es de 0.5 mL/min por gramo de tejido, lo que incrementa la disponibilidad de sustratos y hormonas en este tejido durante este último eslabón del ciclo reproductor.

Teniendo en cuenta la gran variedad de especies de mamíferos, es de esperar que haya diferentes modos de distribuir la energía que se necesita durante la lactancia. A pesar de la variedad de estrategias fisiológicas, existen varias adaptaciones energéticas

comunes, las cuales se observan durante la lactancia en la mayoría de los mamíferos: i) incremento en la ingesta de comida, ii) cambios en la distribución de sustratos metabólicos hacia la glándula mamaria y iii) ahorro en los procesos metabólicos. La mayoría de los mamíferos desarrollan hiperfagia durante la lactancia. En especies con poco y lento desarrollo de las crías, como es el hombre, el incremento en la ingesta de alimentos es del orden del 25% (Thomson y Hytten, 1973; Black y cols., 1986; Prentice y Prentice, 1988). Por otra parte, en mamíferos como la rata, que tienen un desarrollo rápido de múltiples crías, la ingesta de comida puede llegar a ser más del triple en el pico de la lactancia (Fell y cols., 1963; Ota y Yokoyama, 1967; Fleming, 1976). La magnitud de la hiperfagia es directamente proporcional al número de crías (Ota y Yokohama, 1967). Durante la lactancia el vaciamiento gástrico y el tránsito intestinal están aumentados y se regulan por la prolactina sin ejercer ningún efecto el estradiol y la progesterona (Cheng y cols., 1997a). Al final de la lactancia, la ingesta de comida, el vaciamiento gástrico y el tránsito intestinal vuelven a sus valores normales.

Las bases fisiológicas de la hiperfagia durante la lactancia no son bien entendidas. Obviamente, el mayor estímulo para comer es la necesidad de reemplazar la energía y los nutrientes perdidos en la producción de leche. La lactancia viene acompañada por diferentes cambios endocrinos y la cuestión se plantea en saber si estas hormonas tienen algún efecto en la ingesta de comida o si sus efectos no afectan al proceso de la lactancia. La supresión de los niveles de esteroides (o un incremento en la proporción de progesterona/ estradiol) podría contribuir al incremento de la ingesta de comida, pero la magnitud de la hiperfagia durante la lactancia es demasiado elevada para suponer que las hormonas esteroideas juegan un papel importante de forma exclusiva. Se ha sugerido que los elevados niveles de prolactina podrían estimular la ingesta de comida. El incremento en la talla de las crías está asociado con la ingesta de alimento y los niveles de prolactina circulante (Amenomori y cols., 1964; Fleming, 1978; Ota y Yokoyama, 1967). El tratamiento con prolactina a ratas no lactantes incrementa la ingesta de comida (Moore y cols., 1986; Gerardo-Gettens y cols., 1989 a, b). Sin embargo, no siempre se observa esta hiperfagia inducida por la prolactina en ratas no lactantes; se requerirían dosis suprafsiológicas de esta hormona y al igual que con manipulaciones hechas con hormonas esteroideas los efectos no son tan elevados comparados con la hiperfagia observada durante la lactancia.

1.3. Iniciación y mantenimiento de la secreción láctea. Señales reguladoras durante la lactancia.

1.3.1. Desarrollo del tejido mamario.

En la actualidad existen más de 4500 especies de mamíferos (Mepham, 1983) que se diferencian porque las hembras poseen glándulas mamarias, las cuales secretan la leche que provee a los neonatos de una fuente de nutrientes hasta que estos son capaces de alimentarse por sí solos. El desarrollo mamario y la estructura fundamental del referido órgano ofrecen particularidades muy parecidas en todos los mamíferos, si bien existen evidentes diferencias en cuanto a detalles funcionales, arquitectura glandular y número de glándulas existente en cada especie. Los mamíferos se dividen en tres subclases: los Prototerios, los Metaterios y los Euterios o Placentarios, los cuales constituyen el 95% de los mamíferos (Mepham, 1983). En los marsupiales y placentarios, bien sean dimásticos o polimásticos, las mamas se desarrollan produciendo arborizaciones en el mesenquima y las sucesivas arborizaciones forman una pequeña red de canalículos por donde discurrirá la leche. En los mamíferos con gran número de mamas, los esbozos glandulares parten de la región torácica y se continúan por la abdominal e inguinal; mientras que las especies que presentan reducido número de glándulas, los esbozos se establecen en la región torácica, en la abdominal o en la inguinal y el resto de los esbozos terminan por desaparecer. La rata se caracteriza por tener seis pares de glándulas; tres de ellas son torácicas, una abdominal y dos inguinales; la estructura mamaria se presenta en este animal como una tira de tejido desde el cuello al ano (Viña y Puertes, 1988) con la única excepción del área constituida por las costillas.

El tejido secretor de la glándula mamaria se encuentra organizado en lóbulos de los que arrancan los conductos galactóforos; a su vez, cada lóbulo está formado por lobulillos y éstos a su vez se ramifican y terminan en formaciones esferoidales denominadas acini que representan verdaderas unidades secretoras. Cada lobulillo contiene 150-220 alveólos (acini) microscópicos cuyo desarrollo ocurre mayoritariamente durante la gestación. Las modificaciones que se producen en esta etapa pueden dividirse en dos períodos: i) durante el primero existe una activa

proliferación con la aparición de nuevos acini, así como de amplias ramificaciones en el sistema canalicular; puede considerarse como la fase de hiperplasia glandular y tiene lugar durante la primera mitad o los dos primeros tercios de la gestación; ii) en el período restante, se produce una hipertrofia glandular debido al aumento de volumen de las células existentes y, en consecuencia, aumento de tamaño de los lóbulos, mientras que el tejido conjuntivo queda reducido a finos tabiques entre los tubos y acini dilatados, al mismo tiempo que aumenta la vascularización e infiltración celular. Sin embargo, no existe una división neta entre el fin de la fase de hiperplasia y la iniciación de la fase hipertrófica, y existe un momento en que ambas fases se combinan. Bajo la influencia de la prolactina, lactógeno placentario, progesterona y factores de crecimiento locales, el epitelio lóbulo-alveolar sufre una extensiva proliferación (Neville y cols., 2002). Tras el parto, este epitelio pasa a tener un fenotipo secretor y se sintetizan las proteínas de la leche y los enzimas lactogénicos; este inicio de la lactancia ocurre en dos etapas:

1) Diferenciación citológica y enzimática de las células del epitelio alveolar.

Los cambios citológicos asociados a este estado son: hipertrofia del retículo endoplásmico rugoso (RER), hipertrofia del aparato de Golgi, aparición de grandes vesículas que contienen micelas de caseína, un incremento en el número de gotículas de grasa en el citoplasma, un aumento en el número de microvilli en la zona apical y en el número de mitocondrias por célula. Entre los cambios enzimáticos encontramos aumentada la síntesis de acetil CoA carboxilasa, ácido graso sintetasa y otras enzimas asociadas con la lactancia y un aumento en la síntesis de los sistemas de transporte para la captación de glucosa, aminoácidos y otros sustratos para la producción de leche.

2) Secreción de la leche propiamente dicha.

Ésta no se produce hasta que no cesa el efecto inhibitorio de la progesterona sobre la lactogénesis y es estimulada por las elevadas concentraciones en sangre de prolactina y glucocorticoides. A su vez estos cambios hormonales inducen la transcripción del gen de la α -lactoalbúmina; esta proteína participa junto con la galactosiltransferasa en el aparato de Golgi en la síntesis de lactosa. Además, la síntesis de otros componentes de la leche también está aumentada.

El esquema funcional se plantea en el sentido de que los estrógenos preparan la respuesta; la progesterona, los fenómenos de síntesis (madurez glandular) y la prolactina desencadena la producción láctea. La grasa, caseína, lactoalbúmina, lactoglobulina y lactosa son producidas por las células del acini que las vierte al lumen alveolar. Las proteínas se generan en el aparato de Golgi y a través de las vacuolas y sus formaciones son evacuadas al lumen del alveolo.

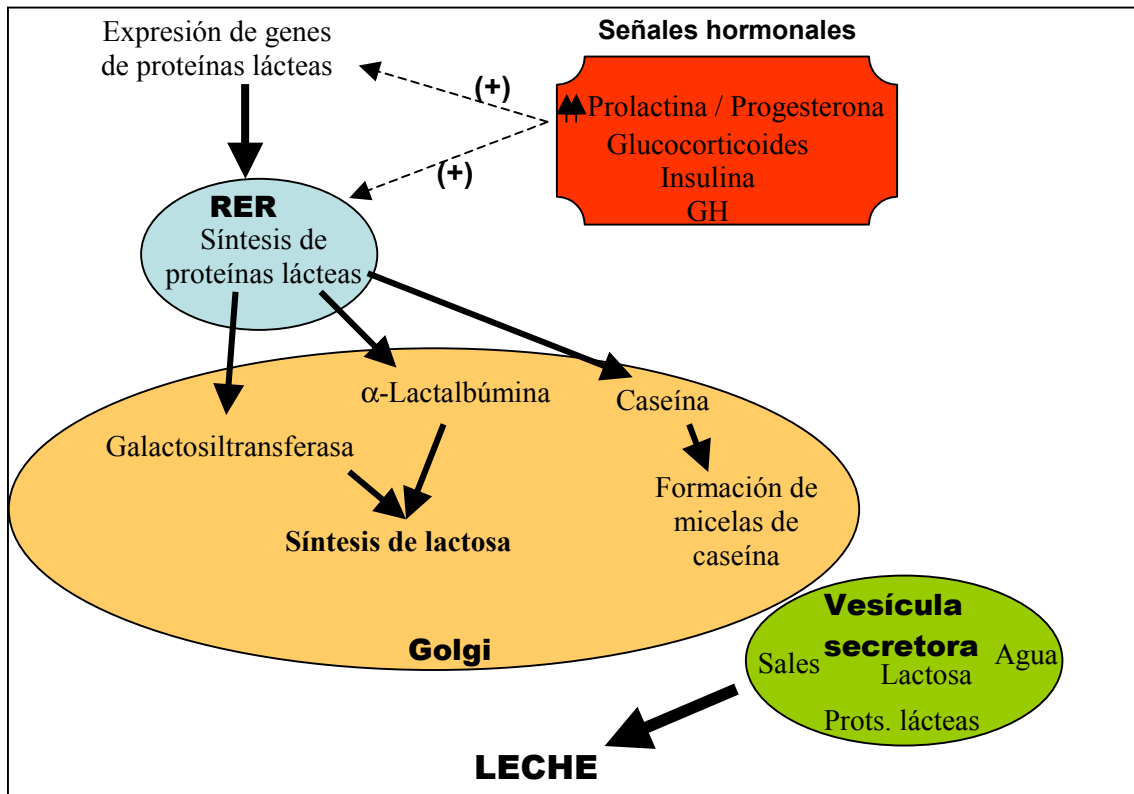


Figura 1. Esquema de las señales reguladoras de la secreción láctea. Las hormonas lactogénicas ejercen su función en el núcleo, donde incrementan la expresión de determinados genes que codifican para proteínas lácteas como la caseína y la α -lactoalbúmina y la insulina es necesaria para la captación de glucosa; a su vez los glucocorticoides también están implicados en el desarrollo del RER, donde tiene lugar la síntesis de proteínas. En cuanto a la hormona del crecimiento (GH) está implicada en el desarrollo del tejido mamario durante la lactancia.

La función mamaria tiene en todos los mamíferos un ciclo natural que corresponde a las exigencias de los recién nacidos. La regresión de la glándula mamaria se produce de un modo gradual a medida que la lactancia declina, en respuesta a una acumulación de leche y un descenso en las hormonas lactogénicas. El incremento de la

presión intralobular por la acumulación de leche en los acini conduce a una detención de la función de estas células secretoras; posteriormente se produce una descamación de las células epiteliales y una remodelación tisular, de modo que el tejido conjuntivo y adiposo sustituye a estas estructuras glandulares.

1.3.2. Señales reguladoras del desarrollo y mantenimiento de la secreción láctea.

Ya desde sus orígenes embrionarios, aunque fundamentalmente durante la gestación, la glándula mamaria sufre un desarrollo ductal que origina una estructura alveolar necesaria para la consecución de la lactancia. Este desarrollo incluye numerosas etapas de proliferación y morfogénesis y está estrechamente regulado por una serie de hormonas clave, factores de crecimiento e interacciones celulares (Hovey y cols. 2002; Neville y cols. 2002).

Los niveles de estrógenos, progesterona, lactógeno placentario, oxitocina y prolactina regulan la función reproductora y actúan directamente sobre la glándula mamaria donde influyen en los cambios morfológicos y funcionales que se producen en dicho tejido. La **progesterona** tiene un efecto inhibitor sobre la lactogénesis; *in vivo* la progesterona: i) incrementa el umbral de respuesta a prolactina, ii) altera la secreción de prolactina de la adenohipófisis y iii) tiene un efecto directo sobre las células del epitelio mamario ya que se une a los receptores de glucocorticoides.

Al hablar de la regulación de la secreción láctea debemos referirnos a un complejo de hormonas lactogénicas que son: insulina, glucocorticoides y prolactina. La **prolactina** es una hormona hipofisaria que presenta dos mecanismos de acción lactogénica: i) actuando desde el acini y ii) actuando a través del metabolismo general orgánico. Además de ser sintetizada y secretada por las células lactotróficas de la hipófisis anterior, la prolactina también es producida en otras células y tejidos tales como miometrio, glándula lacrimal, timo, bazo, linfocitos circulantes y células linfoides de la médula ósea, fibroblastos de la piel y glándulas sudoríparas (Ben-Jonathan y cols., 1996). Las células del epitelio mamario también son importantes en la síntesis y secreción de prolactina. La prolactina está presente en concentraciones significativas en la leche y es absorbida por el neonato dónde se supone que causa cambios en la maduración del sistema neuroendocrino-hipotalámico. La prolactina aumenta en el

curso de la gestación para adquirir los valores máximos después del parto y va disminuyendo hasta casi desaparecer de la hipófisis una vez establecido el normal ciclo de producción. La prolactina es una hormona fundamental en el desarrollo y diferenciación de la glándula mamaria (Accorsi y cols., 2002); es esencialmente un desencadenante de la producción láctea, pero es incapaz de mantener dicha producción.

Existen otros factores hormonales involucrados en el mantenimiento de la secreción láctea como las hormonas metabólicas, cuyo papel principal es regular el metabolismo en respuesta a los nutrientes o al estrés, pero que también ejercen efectos directos sobre la glándula; en este grupo cabe destacar la hormona de crecimiento, la insulina y los corticoides. Los **glucocorticoides** poseen un efecto estimulante de la lactopoyesis, ya que parecen estar implicados en el desarrollo del RER y en la transcripción de los genes de la caseína y la α -lactoalbúmina. Por otro lado la **insulina**, junto con IGF-1 (insulin growth factor-1), estaría implicada en la captación de glucosa por el tejido, esencial para la síntesis de lactosa (Hovey y cols., 2002). La insulina también podría estar implicada en la regulación de la síntesis de ciertos genes que codifican para proteínas de la leche. En general las hormonas de acción lactopoyética facilitan a la glándula mamaria los elementos necesarios para la formación de la leche a nivel del acini. En cuanto a la **hormona del crecimiento**, gracias a los estudios realizados en ratones transgénicos que no expresan el receptor de esta hormona en el epitelio mamario, se sabe que no es imprescindible para que se produzca el desarrollo funcional de este tejido, si bien la arborización de los ductos mamarios se ve claramente afectada (Kelly y cols., 2002).

Pese a que las hormonas son los factores principales que regulan los procesos asociados al tejido mamario como lactogénesis y secreción láctea se ha visto que existen otros factores implicados. Existe un **mecanismo reflejo de la succión**: los recién nacidos han de succionar o extraer la leche de las mamas a través de los pezones. Se trata de un fenómeno activo en el que los estímulos mamarios, que llegan al sistema nervioso central, actúan a través del lóbulo anterior de la hipófisis desencadenando los factores hormonales estimulantes de la secreción láctea (prolactina y corticoides); pero también actuarían sobre el lóbulo posterior, dando lugar a descargas de oxitocina, que ayuda a la salida activa de la leche. La oxitocina es fundamental para la contracción de las células mioepiteliales que rodean a las células epiteliales secretoras, facilitando así la

secreción de la leche fuera del lumen del alveólo a la cavidad del acini, dentro de pequeños conductos galactóforos, por lo que se considera una hormona de gran importancia para la producción láctea.

Otro factor clave es la **interacción de las células epiteliales con la matriz extracelular** (ME), especialmente la membrana basal. Esta interacción es esencial para la mayoría de los procesos asociados con la lactancia como la expresión de genes, la síntesis de proteínas lácteas y la secreción de dichas proteínas (Wiseman y Werb, 2002). La membrana basal está formada por numerosas proteínas de la matriz extracelular tales como colágeno tipo IV, laminina y proteoglicanos. Estas proteínas interaccionan entre sí y con proteínas de la superficie celular lo que permite a las células desarrollar la polaridad y orientación necesarias para secretar los componentes de la leche en la superficie apical de la célula. Además, la ME puede regular el fenotipo del epitelio mamario. Se cree que la expresión del gen que codifica para la β -caseína está mediada por la adhesión de las células del epitelio mamario a la laminina (Streuli y cols., 1995a), mientras que la actividad del factor de transcripción STAT5, un regulador esencial para la transcripción de genes de la leche, también está controlada por interacciones célula-ME (Streuli y cols., 1995b).

1.4. Producción de leche.

Las células epiteliales que delimitan el lumen alveolar son esenciales para la producción de la leche. Estas células son de naturaleza polar ya que la membrana basal presenta funciones diferentes a las de la membrana apical. El contenido celular también está polarizado, el núcleo tiende a estar localizado en la zona basal de la célula, el aparato de Golgi se sitúa apical al núcleo y la mayoría de las estructuras secretoras (vesículas secretoras, gotículas de grasa) se localizan en la zona apical de la célula. La membrana basal está en contacto con una fina capa de tejido conectivo que le confiere apoyo estructural a las células epiteliales.

La lactancia en la rata dura alrededor de 21 días y se considera el período comprendido entre el 10° y el 14° como el de mayor actividad. En el pico de la lactancia, la rata produce alrededor de 125mL de leche por Kg de peso en 24 horas, lo que equivale a un volumen de 30 mL en 24 horas (Sampson y Jansen, 1984), mientras

que la cifra es de 12-23mL de leche por Kg para el ser humano, lo cual corresponde a un volumen aproximado de 700-900mL en 24 horas (Casey y Hambidge, 1983; Whitehead, 1983). Además, el contenido de lípidos y proteínas es mayor en la leche de rata que en la humana, mientras que ocurre al revés con el contenido de lactosa. Todo esto significa que, para su tamaño, las demandas durante la lactancia en la rata son mayores que en el ser humano. Sin embargo, existen buenas razones para creer que la regulación de la síntesis de macromoléculas de la leche de rata es extrapolable al ser humano (Williamson y cols., 1984).

2. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS DE LA APOPTOSIS.

2.1. Concepto de muerte celular programada.

Las células pueden morir por necrosis o apoptosis. Cuando las células sufren daños graves e irreparables mueren de una forma incontrolada denominada necrosis. La necrosis implica una hinchazón de la célula y de sus orgánulos intracelulares, con lo que la célula pierde la integridad de la membrana, alterándose la regulación de la homeostasis iónica celular lo que culmina en una ruptura de la membrana plasmática y la consecuente liberación al espacio extracelular de su contenido intracelular y disolución de los orgánulos, lo que convierte a la célula en una masa de desechos. A diferencia de la apoptosis, la necrosis produce una respuesta inflamatoria localizada que puede causar un mayor daño al tejido (Majno y Joris, 1995). Por ejemplo, la necrosis es la causa principal del daño tisular que ocurre en tejidos isquémicos, como el infarto tras una trombosis coronaria. Sin embargo, la muerte celular programada o apoptosis es un proceso fisiológico en el cual estímulos del desarrollo o ambientales activan un programa genético para llevar a cabo una serie específica de eventos que culminan en la muerte celular, sin alteraciones de la arquitectura o de la fisiología tisular (Hockenbery, 1995). La apoptosis juega un papel vital en procesos fisiológicos del desarrollo de eucariotas, por ejemplo, durante la embriogénesis al eliminarse el tejido interdigital, o durante la maduración del sistema nervioso cuando se produce la muerte de las neuronas supernumerarias (Vaux, 1993). La muerte celular programada (PCD) también es un proceso importante en el adulto, para la eliminación de linfocitos auto-reactivos o

en la involución y remodelación de la glándula mamaria tras el destete. El recambio regular de las células dentro de un tejido implica esta forma de muerte celular, cuidadosamente controlada y no-inflamatoria que no produce daño al tejido y por la cual células superfluas, enfermas o lesionadas son eliminadas. Ahora bien, la apoptosis también puede provocarse ante situaciones patológicas (Vaquero, 2000), siendo innumerables las enfermedades en las que se ha demostrado una alteración de la apoptosis, bien por exceso o por defecto.

A finales del siglo XIX, el equipo del Dr. Fleming (Fleming, 1885) describe un tipo de necrosis diferente a la necrosis convencional. Mediante microscopía óptica este grupo pudo reconocer morfológicamente la involución fisiológica que se producía en los folículos ováricos o en la mama tras la lactancia y lo denominó cromatolisis. Hasta 1914 este nombre no vuelve a aparecer en la literatura médica, cuando el anatómico alemán Dr. Graper realiza un estudio sobre el desarrollo del saco vitelino (Graper, 1914). Posteriormente, en 1951 Glucksmann describió cómo este fenómeno podía explicar muchos de los cambios acontecidos durante el desarrollo embriológico (Glucksmann, 1951). Ya en la década de los 60, y gracias al desarrollo de la microscopía electrónica se estudió la morfología ultraestructural de este fenómeno y fue en 1972 cuando Kerr, Wyllie y Curie emplearon por primera vez la palabra apoptosis para describir los cambios morfológicos observados, simplificando así la terminología utilizada para designar los tipos de muerte celular (necrobiosis, cromatolisis...).

2.2. Características morfológicas de la apoptosis.

La apoptosis se caracteriza por una serie de alteraciones de la célula, y específicamente del núcleo. Inicialmente se produce una pérdida de contacto entre células debido a una constricción de la membrana. Esto hace que el tamaño celular disminuya y los orgánulos se agrupen lo que confiere al citoplasma un aspecto más denso. Los cambios nucleares son los rasgos más característicos: la cromatina se condensa en la periferia, por debajo de la membrana nuclear, en masas densas bien definidas. Posteriormente se produce una fragmentación del DNA nuclear en múltiplos de 200 pb debido a la activación de una endonucleasa dependiente de Ca^{+2} que rompe el DNA internucleosomal y un desensamblaje hasta formar vesículas rodeadas de

membrana denominadas “cuerpos apoptóticos” que se componen de citoplasma y orgánulos muy agrupados, pudiendo contener también fragmentos nucleares (Kanzler y Galle, 2000). Estos cuerpos apoptóticos serán fagocitados por las células sanas adyacentes del parénquima o por macrófagos, donde se degradarán con rapidez dentro de los lisosomas, gracias a su actividad enzimática. Seguidamente las células adyacentes serían capaces de migrar o proliferar reemplazando así el espacio ocupado por la célula apoptótica suprimida (Cohen, 1993).

2.3. Mecanismos moleculares que rigen la apoptosis. Fases de la apoptosis.

El número de células del organismo está estrictamente controlado. Debe existir un balance entre la proliferación celular y las pérdidas de células, fundamentalmente por muerte, emigración o diferenciación. Desde el punto de vista molecular podemos considerar la existencia de tres fases en el proceso de muerte celular programada que son: i) fase de iniciación, ii) fase de ejecución y iii) degradación celular. Durante las dos primeras fases es posible revertir el proceso, gracias a mecanismos bloqueadores o reguladores.

2.3.1. Fase de iniciación.

Existen múltiples factores inductores de apoptosis, algunos de ellos relacionados con unas condiciones ambientales adversas como pérdida de factores tróficos o de crecimiento, radicales libres, virus, agentes quimioterapéuticos, radiaciones UV, etc. Las dos vías mejor estudiadas en el proceso de apoptosis incluyen:

1-Vía de activación de receptores especializados de la membrana celular.

La propia célula activa directamente su destrucción, está provocada por secreción de ligandos apoptóticos y mediada por receptores de superficie, que al unírseles el ligando correspondiente reclutan moléculas específicas (procaspasas 1, 2 y 8) y median la transducción de las señales de muerte celular (Nagata, 1997). Estos receptores son de la familia del receptor del factor de necrosis tumoral, TNF, siendo los dos más

representativos CD95 (también denominado Fas o Apo1; Krammer, 2000) y TNFR1 (p55 o CD120a; Green, 1998a). Son las células efectoras del sistema inmune las que presentan el ligando de manera conformacional, permitiendo su unión al receptor de membrana de la célula diana, activando, de esa manera, la cascada apoptótica intracelular.

2-Vía de alteración mitocondrial.

Otros estímulos que también inducen apoptosis tales como el estrés oxidativo, agentes que producen daño en el DNA y agentes quimioterapéuticos, actúan a través de un mecanismo mitocondrial. Se conocen al menos tres mecanismos generales por los que la mitocondria está implicada en la activación de este proceso de muerte celular programada: i) liberación de proteínas que potencian la activación de las caspasas, ii) cese del transporte de electrones, fosforilación oxidativa y producción de ATP y iii) alteración del potencial redox celular.

Las mitocondrias están profundamente implicadas en la regulación de la muerte celular, ya que sufre una permeabilización de la membrana que conduce a la apoptosis de la célula (Kroemer y cols., 1997; Susin y cols., 1998). Durante la apoptosis se produce, a nivel mitocondrial, la apertura de canales no selectivos PTP (Permeability Transition Pore), alterándose el equilibrio de iones entre la matriz mitocondrial y el espacio intermembranas, produciéndose la pérdida del potencial de membrana. Estos fenómenos descompensan la cadena respiratoria, creando una hiperosmolaridad en la matriz lo que hace que se expanda y se hinche. La membrana mitocondrial interna se adapta a la expansión disminuyendo sus repliegues, pero la membrana externa acaba rompiéndose y liberando hacia el citosol numerosas proteínas mitocondriales localizadas en el espacio intermembranas (Loeffler y Kroemer, 2000) como el citocromo c y el Smac (Second mitochondria-derived activator of caspases)/ DIABLO (Direct IAP-Binding protein with low pI). Además, las numerosas investigaciones que tienen lugar en el ámbito de la muerte celular programada descubren nuevas proteínas implicadas en la apoptosis celular; entre ellas encontramos el factor inductor de apoptosis (AIF, apoptosis-induced factor) que fue identificado y clonado en 1999 como una proteína que se trasloca de la mitocondria al citosol y de ahí pasa al núcleo, donde favorece la condensación de la cromatina y la ruptura del DNA en fragmentos grandes

(~ 50 kb) (Lorenzo y Susin, 2004). Otra proteína mitocondrial que se trasloca al núcleo tras un estímulo apoptótico es la endonucleasa G, que degrada el DNA nuclear en fragmentos oligonucleosomales similares a los generados por la DNasa activada por caspasas (CAD, caspase-activated DNase) (Parrish y cols., 2001).

Este proceso precede a la apoptosis nuclear y es inhibido por la presencia de proteínas antiapoptóticas de la familia bcl-2, siendo las más representativas bcl-2 y bcl-x_L (Zamzami y cols., 1998). Estas proteínas ejercen su protección sobre las membranas mitocondriales translocando las proteínas proapoptóticas a la membrana mitocondrial interna e impidiendo la formación de poros PTP a través de varios mecanismos: i) formando dímeros con otras proteínas homólogas antiapoptóticas o proapoptóticas, ii) uniéndose a proteínas no homólogas como la Apaf-1 y la calcineurina y iii) formando poros iónicos mitocondriales pequeños y protectores que regulan el equilibrio iónico mitocondrial.

Las proteínas proapoptóticas de la familia bcl-2 (bax, bak y bid) se translocan a la membrana mitocondrial externa, induciendo la salida del citocromo c al citosol, lo cual no siempre implica pérdida del potencial de membrana ni alteración de la morfología mitocondrial ya que serían los canales VDAC (voltaje-dependent anion channel) los implicados en la liberación de citocromo c y Smac/ DIABLO al citoplasma (Green, 2000).

El citocromo c (citosólico) forma un complejo con los factores citoplásmicos Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1) y procaspasa-9 en presencia de dATP. Este complejo, denominado apoptosoma produce la activación de la caspasa-9, que a su vez corta y activa otras caspasas, como las caspasas -3 y -7. Esto constituye la fase de ejecución de la apoptosis y parece ser el punto de no retorno de la apoptosis. Smac/ DIABLO además de actuar activando las caspasas se une a la familia de las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP), inhibiendo su actividad anti-apoptótica (Martinou, 1999)

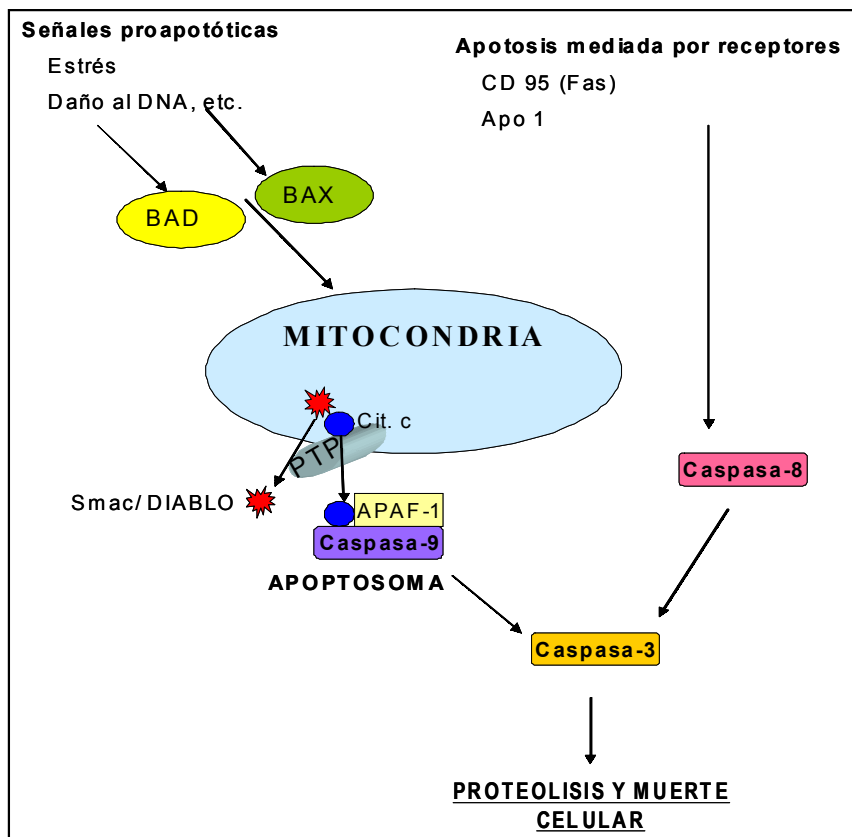


Figura 2. Vía de alteración mitocondrial en la apoptosis. *Los efectos antagónicos pro- y anti-apoptóticos de los miembros de la familia Bcl-2 regulan la liberación mitocondrial de los cofactores apoptóticos citocromo c y Smac/DIABLO. El citocromo c se adapta a la molécula de Apaf-1 citoplásmica que, a su vez, recluta y oligomeriza a la procaspasa-9 activándola, iniciándose así la casacada apoptótica. El cofactor Smac/DIABLO no sólo activa a la caspasa-9, sino que además se une a IAP, inhibiendo su actividad antiapoptótica.*

2.3.2. Fase de ejecución.

Las caspasas son una familia de cisteína-proteasas que han sido identificadas como reguladores clave y efectores de la respuesta apoptótica en varias especies. En el nematodo *Caenorhabditis elegans*, empleado como modelo para el estudio de la muerte celular, fueron identificados numerosos genes “ced” (*C. elegans* death) de los que posteriormente se han encontrado homólogos en células de mamíferos; por ejemplo el gen *ced-3* codifica para una proteína necesaria para la muerte celular y comparte homología en su secuencia con la cisteína-proteasa de mamífero interleukina-1 β -enzima convertidora (ICE, caspasa-1). En mamíferos, la familia de las caspasas consta de 11 enzimas proteolíticas (caspasas 1-10 y caspasa 14) que inicialmente se expresan

en la célula como zimógenos o proenzimas (30-50 KDa) que contienen un prodominio seguido de dos subunidades: una grande (20 KDa) y otra pequeña (10 KDa) (Degterev y cols., 2003).

Las caspasas pueden a su vez subdividirse según distintos criterios tales como análisis filogenético, especificidad de sustrato y/o el tamaño del prodominio. Los miembros de la sub-familia de la caspasa-1 (caspasas -1, -4, -5 y -11) parece que juegan un papel más importante en la inflamación que en la apoptosis. Se ha propuesto que las caspasas que actuarían en la fase inicial de la apoptosis (señalización de muerte celular), que son aquellas con un prodominio más largo como la caspasa-8, podrían activar directa o indirectamente caspasas denominadas “efectoras” (desensamblaje de la célula) que serían las caspasas -3, -6 y -7, de forma que se establecería una especie de cascada de activación de las caspasas (Cohen, 1997). Estas caspasas efectoras, que presentan un prodominio más pequeño, son las responsables de los cambios morfológicos y bioquímicos característicos de la apoptosis (Sun y cols., 1999). Tras su activación por una señal apoptótica, ya sea mediada por receptores específicos de la superficie celular o bien a través de mecanismos de señalización intracelular, las caspasas actúan concertadamente en cascada produciendo la ruptura de sustratos celulares clave como la poli (ADP-ribosa) polimerasa, citoqueratinas y lamininas, lo que conduce a un desensamblaje celular y a la muerte de la célula (Cohen, 1997). La cascada de activación de las caspasas finaliza con la activación de la caspasa-3 que ocurre al inicio de la apoptosis, mucho antes de que tenga lugar la fragmentación del DNA. Una vez se ha activado la caspasa-3 no existe vuelta atrás a la viabilidad celular, el programa para la muerte de la célula se ha activado irreversiblemente.

Las caspasas no se unen indiscriminadamente a las proteínas sobre las que actúan sino que existen unas proteínas diana, ya que la ruptura ocurre sobre unas secuencias de péptidos específicas (Thornberry y Lazebnik, 1998). La destrucción de estas proteínas está programada genéticamente y se lleva a cabo sistemáticamente para asegurar la correcta muerte de la célula. Esta especificidad se pone de manifiesto al observar el efecto en la maquinaria de transporte nuclear de la célula. Las cuatro nucleoporinas (Nup153, Nup214, RanBP2 y Tpr) sufren una digestión por parte de las caspasas, en cambio los factores de transporte nuclear (importina α y β y Ran) no son procesados sino que sufren una redistribución en la membrana (Ferrando-May y cols.,

2001). Basándonos en un análisis de su función celular, las proteínas diana de las caspasas pueden clasificarse en seis categorías: (1) proteínas directamente implicadas en la regulación de la apoptosis (Bid, Bcl-2, Bcl-x_L, XIAP, etc.), (2) proteínas reguladoras de la señal de transducción apoptótica (e.g. protein-quinasas, FAK, Akt), (3) proteínas estructurales (actina, gelsolina, fodrina), (4) proteínas necesarias para los sistemas de reparación celulares (PARP, ATM), (5) proteínas reguladoras del ciclo celular (p27, p21, Mdm2) y (6) proteínas implicadas en patologías humanas (ataxina-3, huntingtina, etc.) (Utz y Anderson, 2000; Degterev y cols., 2003).

Como ya se ha comentado, cada caspasa es sintetizada como zimógeno, por lo que requiere ser procesada para generar la enzima activa; las caspasas que se activan en primer lugar serán las responsables de iniciar la cascada proteolítica. Sin embargo para su activación necesitan proteínas mediadoras que, bien concentran los zimógenos en cantidad suficiente para que se produzca la autocatálisis (Salvesen y Dixit, 1999) o bien activan alostéricamente el zimógeno sin procesarlo (Rodríguez y Lazebnik, 1999). Estos mediadores de la activación de las caspasas, que actúan en un gran complejo denominado apoptosoma, incluyen CED-4 en *Caenorhabditis elegans* (Apaf-1 en mamíferos) (Zou y cols., 1997; Adams y Cory, 2002).

Se han propuesto dos modos distintos de activación de las caspasas “iniciadoras”. La procaspasa-8 es activada por la agregación de receptores en la membrana plasmática: al unirse el ligando a los receptores de membrana de la familia del TNF la procaspasa-8 es reclutada por el FADD (Fas-associated protein with death domain) hasta el receptor; la elevada concentración a nivel local de este zimógeno promueve su autocatálisis, activándolo (Strasser y cols, 2000). Por el contrario, la procaspasa-9 requiere de la formación de un complejo citoplásmico para su activación. Este complejo, denominado apoptosoma está formado por la procaspasa-9, Apaf-1 y citocromo-c proveniente de mitocondrias dañadas. Por tanto esta procaspasa sólo se activaría cuando se utiliza la vía mitocondrial, necesitando además citocromo-c y ATP (Hengartner, 2000).

Una vez activadas las caspasas pueden actuar de forma directa o indirecta:

1-Mecanismo indirecto.

Las caspasas actuarían inactivando proteínas que protegen a la célula de la muerte celular. Por ejemplo, las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-x_L son digeridas por las caspasas, originándose factores proapoptóticos (Cheng y cols., 1997b) Es interesante destacar aquí el mecanismo de acción de la nucleasa responsable de la fragmentación internucleosomal de DNA típica de la apoptosis (Enari y cols., 1998). Esta degradación del material genético constituye un “punto de no retorno” en el proceso apoptótico: el mecanismo subyacente a la condensación de cromatina, consiste en una fragmentación del DNA nuclear existente en las regiones de unión entre los nucleosomas. El producto de dicha degradación son fragmentos de DNA con longitudes múltiplos de 180-200 pares de bases que originan un patrón en escalera típico de las células apoptóticas mediante electroforesis en gel. Dicha enzima, denominada CAD, está presente en las células de forma constitucional e inactiva, formando un complejo con una subunidad inhibitoria, denominada ICAD. La caspasa-3 se une a esta subunidad ICAD produciendo así la liberación y activación de la subunidad catalítica (Sakahira y cols., 1998).

2-Mecanismo directo.

Las caspasas también realizan su función directamente, alterando distintas estructuras celulares, como por ejemplo la destrucción de la lámina nuclear o del citoesqueleto. La lámina nuclear es una estructura rígida que se localiza por debajo de la membrana nuclear, constituida por polímeros de filamento intermedio denominado laminina y que está involucrada en la organización de la cromatina (Rao y cols., 1996). Ante las caspasas, los filamentos intermedios se anclan por un solo sitio, produciendo el colapso de la lámina nuclear lo que favorece la condensación de la cromatina. En el caso del citoesqueleto, las caspasas inactivan a proteínas que regulan la homeostasis, como la fodrina o la gelsolina, que despolimerizan los filamentos de actina por lo que son clave en la rápida aparición de los cambios morfológicos (Kothakota y cols., 1997). Además modifican la quinasa de adhesión focal (FAK) y la quinasa 2 p21-activada (PAK2), pudiendo colaborar en los cambios estructurales de la membrana citoplasmática (Rudel y Bokoch, 1997).

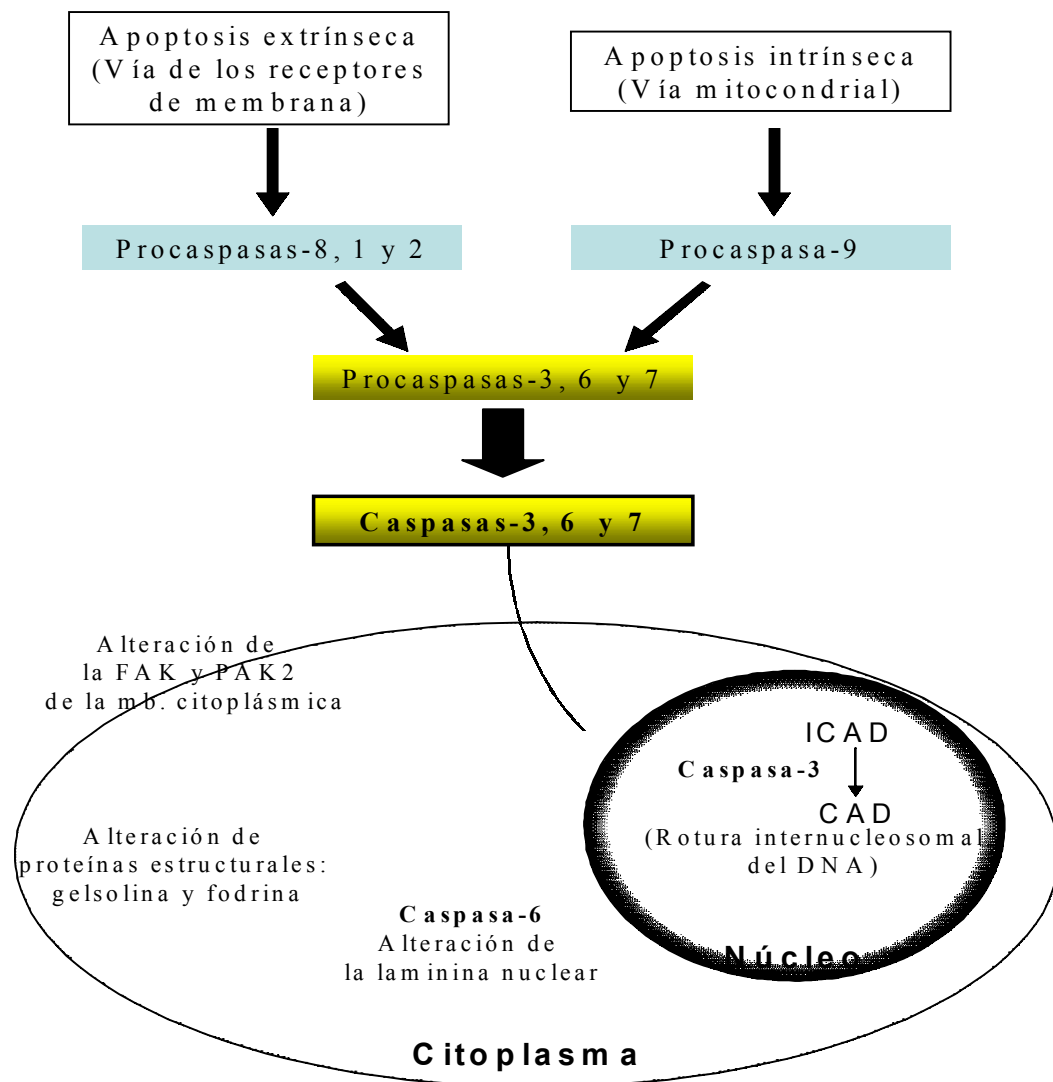


Figura 3. Mecanismo de acción de las caspasas.

En resumen, las caspasas participan en la apoptosis de un modo muy bien organizado: cortan los contactos con las células adyacentes, reorganizan el citoesqueleto, entorpecen la replicación y reparación del DNA, interrumpen el splicing y rompen la estructura nuclear, inducen la liberación de señales que favorecerán la fagocitosis y desintegran la célula en cuerpos apoptóticos (Chang y Yang, 2000).

2.3.3. Fase de degradación celular.

En la superficie de los macrófagos y de las células apoptóticas han sido identificadas moléculas que actuarían como mediadores en el proceso de reconocimiento y adhesión, facilitando así la desintegración de los cuerpos apoptóticos (Savill y Fadok, 2000). Los receptores presentes en los macrófagos pueden clasificarse

como de clase A, a los que pertenecen el receptor de macrosialina, ABC 1 y receptor de vitronectina ($\alpha v\beta 3$ integrin), y los de clase B, donde se incluyen los receptores CD 14 y CD 36 (Platt y cols., 1998).

Los cambios que se producen en la membrana de las células apoptóticas favorecen que los lípidos subyacentes queden expuestos (fosfatidilserina y fosfolípidos) lo que permite que los cuerpos apoptóticos puedan ser reconocidos por los receptores situados sobre los macrófagos. Estos receptores pueden unirse a la trombospondina, una molécula que forma puente con la fosfatidilserina e ICAM 3 (Intercellular adhesion molecule 3) de la célula apoptótica (Marguet y cols., 1999).

2.4. Mecanismos reguladores de la apoptosis.

Existen procesos moduladores de la apoptosis que actúan a diferentes niveles:

2.4.1. Inactivación de ligandos.

Este nivel de regulación se produciría al inicio de la apoptosis y consiste en la proteólisis o inactivación de los ligandos de los receptores de membrana, específicos de la apoptosis, a través de algunos polipéptidos. Por ejemplo, la proteína SODD (silencer of death domain) se une a uno de los dominios de TNFR1 y previene la oligomerización del receptor; otro ejemplo es la tirosin fosfatasa, que al unirse al dominio citoplasmático de Fas atenúa la muerte celular mediada por Fas.

2.4.2. Proteínas inhibidoras y favorecedoras de la apoptosis.

Las proteínas de la familia Bcl-2 son capaces de formar heterodímeros cuya relación dentro de la célula resulta en una estimulación o inhibición de la apoptosis. El gen bcl-2 (B-cell Lymphoma 2) fue el primer miembro de una familia de genes implicados en la regulación de la apoptosis que, a diferencia de otros oncogenes, prolonga la supervivencia celular bloqueando específicamente la muerte celular por apoptosis (Chetty y cols., 1997). El producto de este gen es una proteína de 26 KDa que se localiza principalmente en la membrana externa de la mitocondria, aunque también

en la nuclear y en el citosol a nivel del retículo endoplásmico liso (De Jong y cols., 1994). La amplia expresión *in vivo* de *bcl-2* en tejidos normales, embriológicos, fetales y adultos, sugiere que este gen tiene un importante papel en la homeostasis tisular normal (LeBrun y cols., 1993); se ha llegado a hipotetizar que *bcl-2* es un factor de supervivencia muy importante para células progenitoras precoces, presumiblemente a través de la prevención de la muerte celular programada en el compartimento regenerativo, y para células completamente diferenciadas que son de larga vida (Hockenberry y cols., 1990; Hawkins, 1994).

En mamíferos se han identificado otros 15 genes que comparten homología con el gen *bcl-2* por lo que se consideran miembros de la familia de genes *bcl-2*. A su vez, se pueden dividir en dos grupos, en base al efecto que tienen en el ciclo celular. Los antiapoptóticos son *bcl-2*, *bcl-x_L*, *bcl-W*, *Mcl-1*, *A1*, *NR-13*, *BHRF 1* y *DRF 16*, mientras que los que promueven la apoptosis son *bax*, *bcl-x_S*, *bok* y *bak* entre otros (Adams y Cory, 1998). Las proteínas de esta familia poseen, al menos, uno de cuatro dominios homólogos al *bcl-2* (BH1, BH2, BH3 y BH4); las inhibidoras de la apoptosis contienen los dominios BH1 y BH2, incluso las de mayor homología con *bcl-2* presentan los cuatro dominios (Reed, 1997). Sin embargo, las proteínas proapoptóticas pueden subdividirse en dos grupos, en relación a la homología estructural que comparten con *bcl-2*: i) el grupo Mdt, que incluye *bax*, *bak* y *bok*, contiene tres dominios (BH1, BH2 y BH3) homólogos al *bcl-2*; ii) por el contrario, existen otras proteínas que tan sólo coinciden estructuralmente con una pequeña región central (9 a 16 residuos) del dominio BH3 como son *Bik*, *Blk*, *Hrk*, *Bad*, *Bid* y *EGL-1* (McDonnell y cols., 1999).

- **Bax:** La primera proteína que se descubrió que estaba asociada al *bcl-2*, *in vivo*, fue *bax* (Bcl-2 associated protein X), una proteína de 21 KDa con la habilidad de suprimir la capacidad de *bcl-2* para bloquear la apoptosis (Antonsson y Martinou, 2000). En algunos tejidos, entre los que se incluyen mama, estómago, piel, ganglios linfáticos, colon e intestino delgado, los patrones de expresión de *bax* y *bcl-2* están regulados de forma paralela, lo que sugiere que existe un antagonismo activo entre ambas proteínas (Krajewski y cols., 1994). Por otro lado, también se ha visto que la expresión de *bax* se localiza en aquellas zonas con una alta tasa de apoptosis (Zhan y cols., 1994), por lo que se han propuesto varios mecanismos para explicar el papel

regulador de esta interacción proteína-proteína en el control de la apoptosis (Oltvai y Korsmeyer, 1994): i) bax podría funcionar como una molécula inductora de muerte celular que es neutralizada por bcl-2; ii) bcl-2 podría funcionar como un represor de muerte celular que es neutralizado, por competencia, con una molécula inerte de bax o iii) bcl-2 podría tener una función bioquímica totalmente expuesta a la acción de bax.

- **Bcl-x:** Los transcritos del gen Bcl-x pueden originar dos productos: una forma larga (L) y otra corta (S). La proteína producida por la forma larga, Bcl-x_L tiene un 47% de homología con bcl-2 y una distribución celular similar a ésta, lo que sugiere que ambas proteínas funcionan de una manera similar. Por el contrario, el producto derivado de la forma corta, Bcl-x_S, antagoniza la acción de los dos anteriores y es proapoptótico (Boise y cols., 1993).

- **Bak:** La proteína bak (bcl-2 homologous antagonist/ killer) aumenta la tasa de apoptosis inducida por privación de los factores de crecimiento de fibroblastos, neuronas y células linfoides murinas, lo que sugiere que funciona principalmente como un promotor de apoptosis (Chittenden y cols., 1995). Bak se expresa ampliamente en epitelios complejos, incluyendo nasofaringe, esófago, colon y vejiga, en los cuales tiene un papel proapoptótico.

- **Mcl-1:** El gen Mcl-1 (Mieloid cell leukemia-1), descubierto en células de la leucemia mieloblástica, funciona de manera similar a bcl-2 bloqueando la apoptosis en células hematopoyéticas más diferenciadas. Este gen codifica una proteína de 37 KDa que tiene una homología significativa con bcl-2, pero al contrario que ésta su expresión es mayor en las células más diferenciadas de epidermis, intestino, colon, próstata, nasofaringe y vía aérea superior. Por tanto es posible que ambos desempeñen funciones diferentes en la regulación *in vivo* de la apoptosis (Krajewski y cols., 1995).

Los miembros de la familia pueden formar homo o heterodímeros, antagonizando o potenciando sus funciones (ver figura 4); de esta forma, la proporción entre inhibidores y activadores existente en la célula puede determinar el destino de dicha célula (Kanzler y Galle, 2000). Por ejemplo, cuando bax aparece como un homodímero aumenta la sensibilidad de las células ante el estímulo apoptótico, sin embargo, si forma heterodímeros con proteínas antiapoptóticas actúa protegiendo a la

célula de la apoptosis. Por otro lado bad puede formar heterodímeros con las moléculas antiapoptóticas, permitiendo a bax aumentar su función proapoptótica (Yin y cols., 1997). Pese a todo, las proteínas de esta familia del grupo Mtd tienen un impacto citotóxico e incluso ante la presencia de inhibidores de caspasas las proteínas bax o bax-like conducen a la muerte celular, por permeabilidad mitocondrial, formando canales iónicos en su membrana y facilitando así la liberación de factores apoptogénicos mitocondriales (Shimizu y cols., 1999).

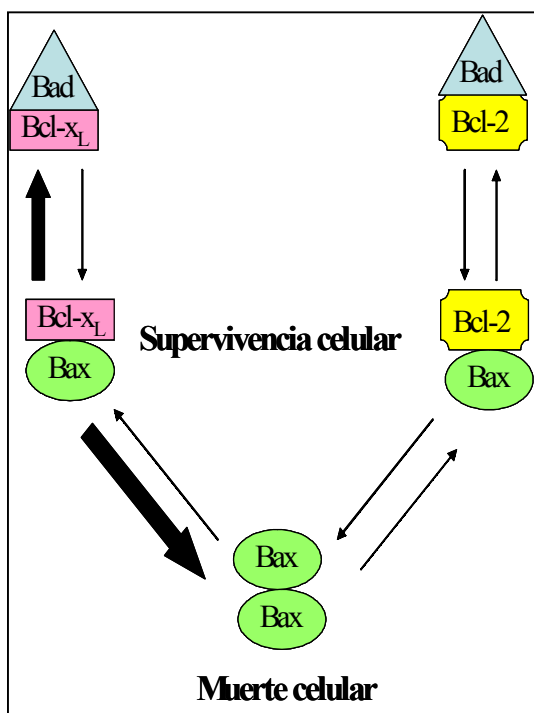


Figura 4. Consecuencias de las reacciones de homo y heterodimerización de las proteínas de la familia Bcl-2. El dímero Bax/Bax provoca la apoptosis mientras que los heterodímeros Bcl-x_L/Bax y Bcl-2/ Bax protegen a la célula de la muerte celular. La proteína Bad aparece para anular la actividad antiapoptótica de Bcl-x_L y Bcl-2, uniéndose a ellas y desplazándolas de Bax, lo que permite un aumento del homodímero Bax/Bax.

2.4.3. Activación de factores de transcripción anti-apoptóticos.

Los factores de transcripción son proteínas reguladoras que se unen a lugares específicos del DNA y modulan la expresión de genes. Existen factores de transcripción pro- y antiapoptóticos que activan o reprimen la transcripción de genes implicados en la apoptosis.

- **Gen supresor tumoral p53:** El gen p53 es un regulador fundamental en el normal crecimiento y la homeostasis de las células y tejidos (Lane, 1992). El gen p53 fue identificado y descrito por vez primera en 1979, en las células transformadas por el virus SV40, formando un complejo con el antígeno T, el producto proteico de dicho virus. Dado que dicho antígeno es necesario para mantener el fenotipo transformado, se

sugirió que esta interacción era importante para la transformación y por ello, inicialmente se pensó que pertenecería a los oncogenes y actuaba como acelerador del ciclo celular (Tan y cols., 1986). Diez años después se mostró que todos los clones obtenidos eran formas mutantes de p53 y se planteó que éste fuera un gen supresor tumoral que regularía el ciclo celular. Esta hipótesis se reforzó al evidenciarse que la expresión de clones de p53 salvaje suprimía la transformación de células en cultivo activadas por oncogenes; por ello, y por el hecho de la frecuente delección de la zona del gen en varios tumores, se llegó a la conclusión de que p53 era, efectivamente, un supresor tumoral. No obstante puede comportarse como un oncogén en algunas formas mutantes (Batsakis y El-Naggar, 1995).

El gen p53 se localiza en el brazo corto del cromosoma 17 (17 p13), está constituido por 11 exones dentro de un dominio cromosómico de 20Kb. En condiciones normales actúa como “guardián del genoma” ya que previene la proliferación de células que presentan un DNA dañado. Esta función es realizada por la proteína p53, una fosfoproteína nuclear de 53 KDa, constituida por 393 aminoácidos. Contiene tres dominios con funciones diferentes: la región N-terminal controla la transactivación transcripcional, mientras que la región carboxi-terminal controla la oligomerización, modulando la unión de los tetrámeros al DNA (Kern y cols., 1991). La mutación a este nivel puede modificar la localización de la proteína del núcleo al citoplasma (Marchenko y cols., 2000). Además, dentro de la región C-terminal, existe otra zona adicional que regula el cambio de la forma latente a la forma activa de la proteína, permitiendo así su unión con secuencias específicas (Jayaraman y Prives, 1995). Por último, el dominio central es la región por la que se une la proteína como tetrámero, a las secuencias dianas de los genes en el DNA; esta zona está muy conservada entre las especies y es donde se encuentran la mayoría de las mutaciones en tumores humanos (Prives y Hall, 1999). Dichas mutaciones interfieren con el plegamiento tridimensional de la proteína y por lo tanto, con la interacción en el DNA, evitando así la activación transcripcional de genes diana (Vogelstein y Kinzler, 1992).

Es importante la degradación de p53, se trata de un proceso proteolítico ATP-dependiente, mediado por ubiquitina y la proteína MDM-2 (Murine double minute) que estimula la unión de la ubiquitina al extremo carboxi-terminal de p53 (Haupt y cols., 1997). El oncogen MDM2 codifica una proteína de 90KDa que forma un complejo

estable con el p53, inhibiendo su unión secuencia-específica al DNA y favoreciendo la salida de p53 del núcleo al citoplasma (Momand y cols., 2000). Además, le incumbe mediar la ubiquitinización de la proteína p53 y permitir que el proteosoma la reconozca y degrade. Por ello, la sobreexpresión de MDM2 inhibe la capacidad de p53 para estimular la expresión de determinados genes dianas importantes en su función como supresor tumoral (Kubbutat y cols., 1997). La proteína MDM2, inducida por p53, se ubiquitina a sí misma y regula su propia estabilidad. Pero en la regulación de la función de MDM2 interviene también la proteína p19^{ARF}; ésta forma un complejo ternario con MDM2 y p53 inhibiendo la ubiquitinización y degradación de p53 mediada por MDM2 (Kamijo y cols., 1998).

Existen tres mecanismos independientes que activan a la proteína p53 (Vogelstein y cols., 2000). Todos ellos actúan inhibiendo la degradación de la proteína p53, estabilizándola a altas concentraciones lo que favorece que ejerza su función sobre el DNA dañado, como un tetrámero que estimulará la expresión de los genes adyacentes, con el fin de reparar el daño genómico (Hansen y Oren, 1997). Los mecanismos de activación son:

i) La primera vía se produce por daño en el DNA, como el que pueden causar las radiaciones ionizantes. Las proteínas de vigilancia o “checkpoint” detectan el daño producido y retrasan el progreso del ciclo celular, permitiendo así la reparación del daño. Entre estas proteínas de vigilancia encontramos la ATM que es estimulada por roturas en la doble cadena, ChK1, ChK2 y la proteína-quinasa DNA-dependiente. Todas ellas ejercen su función fosforilando al p53 en residuos del dominio amino terminal, que están cerca de los sitios de unión de las proteínas MDM2, lo que favorece la estabilización de p53 (Moll y cols., 1996).

ii) La segunda vía es inducida por múltiples fármacos quimioterapéuticos, luz ultravioleta e inhibidores de la proteína-quinasa, y se caracteriza por estar involucrada la proteína ATR y la caseín-quinasa II.

iii) La última ruta de activación se produce por señales de crecimiento aberrantes, como las producidas por la expresión de los oncogenes Ras o Myc, en ausencia del daño al DNA. Estos oncogenes estimulan la transcripción del gen p14^{ARF} o la estabilización de la proteína que, a su vez, se une a MDM2 inhibiendo su función.

La proteína p53 actúa sobre numerosos genes; podemos clasificarlos en cuatro categorías:

i) Genes involucrados en la inhibición del ciclo celular: La proteína p53 se une a secuencias específicas del DNA, inhibiendo la transcripción de genes reguladores del ciclo celular. Estos genes ejercen un control negativo paralizando el ciclo celular en G1 y bloqueando la entrada en fase S, la fase de síntesis del DNA (Agarwal y cols., 1998). Uno de estos genes es el p21^{WAF1/CIP1}, un potente inhibidor de las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) que junto con las ciclinas son responsables de la inactivación de la proteína del retinoblastoma (Rb) durante las fases G1 y G2 del ciclo celular (El-Deiry y cols., 1993; Cox, 1997). Otra proteína involucrada en el control del ciclo es GADD45 (Growth arrest and DNA damage) que se une a PCNA (Proliferating cell nuclear antigen) (Wang, 1999). Con esta interrupción del ciclo se permite a los mecanismos reparadores celulares actuar antes de la replicación del DNA.

ii) Genes de la apoptosis: El p53 ejerce un papel crucial en la inducción de la apoptosis en respuesta a un daño en el DNA. Si el daño es extenso e irreparable entonces el p53 activa los mecanismos de apoptosis, para evitar la proliferación de células que han sufrido la mutación (Evan y Littlewood, 1998). La transcripción del gen Bax es activada directamente por la proteína p53. Los genes NOXA y p53AIP1 también son activados directamente por p53 y, al igual que Bax, sus proteínas a nivel mitocondrial tienen una acción inductora de la apoptosis (Oda y cols., 2000). Entre otros mediadores de la apoptosis inducida por p53 encontramos proteínas similares a los receptores de apoptosis TNF y Fas, como la PIDD (Lin y cols., 2000). La proteína p53 también puede actuar directamente sobre la mitocondria, produciendo un exceso de tóxicos con potencial redox, sin inducir la translocación de Bax.

iii) Genes implicados en la estabilidad genómica: Al inactivarse los genes de reparación del DNA se produce inestabilidad genómica pero la proteína p53 compensa dicho efecto al regular la expresión de genes implicados en los mecanismos de reparación y recombinación (Wahl y cols. 1997). p53 controla también la inducción de genes como el de la ribonucleótido reductasa (RNR), implicada en las respuestas celulares al daño en el DNA, ya que cataliza la síntesis de los desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) requeridos para la síntesis del DNA (Lozano y Elledge, 2000; Tanaka, 2000).

iv) Inhibición de la angiogénesis: El p53 estimula la expresión de genes como la trombospondina, que previenen la formación de nuevos vasos. La angiogénesis es un paso crítico y precoz en el desarrollo de los tumores primarios (Hendrix, 2000).

El p53 parece tener una función pivote en la carcinogénesis humana, ya que se encuentra mutado en más del 50% de los tumores (Hollstein y cols., 1991). La inactivación de p53 puede ocurrir a través de varios mecanismos, incluida la pérdida de alelos, deleciones, inserciones o mutaciones puntuales, la mayoría de las cuales responden a la sustitución de una base en la secuencia codificante de p53, con lo que cambia un aminoácido en el dominio central, lo que conduce a un cambio conformacional y de estabilización de la proteína translocada. El polimorfismo más frecuentemente encontrado en las neoplasias humanas se localiza en el codón 72 y resulta en una sustitución de prolina por arginina (Ahuja y cols., 1990). Sin embargo los tumores pueden tener diferentes patrones de cambios de bases en el DNA, dependiendo de si los cambios genómicos ocurren espontáneamente o bien son por carcinógenos exógenos. Por ejemplo, en los tumores de piel los rayos ultravioleta producen la sustitución de bases CC por TT (Ziegler y cols., 1994). Asimismo la inactivación del gen también puede producirse porque la proteína transcrita es silenciada por formaciones complejas, bien por interacción con productos víricos, como el antígeno T SV40, la proteína adenovirus E1b o la proteína E6 del HPV de alto riesgo, o bien por interacción con otras proteínas celulares como MDM2 (Midgley y Lane, 1997). En cualquier caso, la inactivación de p53 conduce a una reducción de los niveles de p21^{WAF1/CIP1}, a la fosforilación del producto genético de Rb y a la progresión del ciclo celular de la fase G1 a la fase S (Ohki y cols., 2000).

- **Factores de crecimiento:** Los factores de crecimiento evitan la apoptosis ya que la activación de sus receptores activa a la quinasa Akt que, a su vez, fosforila la proteína proapoptótica Bad. El Bad fosforilado permanece inactivo en el citosol y no interfiere con las proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 (Brunet y cols., 1999).

- **Receptores apoptóticos:** Los receptores TNFR1 y TNFR2 son capaces de activar factores transcripcionales que favorecen la supervivencia celular, siendo el más importante el NF- κ B. El dominio citosólico del receptor TNFR activado se une a una familia de proteínas citosólicas que activan al gen NF- κ B que favorece la producción de

moléculas antiapoptóticas, inhibiendo la activación de la procaspasa 9 (Baker y Reddy, 1998).

- **Proteínas myc y ras:** Las proteínas myc y ras presentan una dualidad supervivencia-apoptosis. El gen c-myc es un elemento importante en el control de la proliferación celular. La sobreexpresión de c-myc puede inducir bien proliferación o bien apoptosis (Amati y cols., 1993) y la decisión celular entre estas dos respuestas está determinada por otras señales; por ejemplo, en ausencia de factores de crecimiento, oxígeno o ante determinados factores citotóxicos, c-myc podría secuestrar un hipotético factor proapoptótico conocido como Saf (supressor of apoptosis by Fas) favoreciendo así la apoptosis (Green, 1997). Además es capaz de activar la vía apoptótica de p53 (Green, 1998b). Por tanto el efecto de c-myc, como el de p53, está en función del tipo celular y de estímulos específicos y no es necesario para todas las formas de apoptosis. La inducción de la apoptosis por ras es independiente de p53 y se produce mediante la activación de factores de transcripción específicos (c-Jun) que pueden ser suprimidos, a su vez, por la activación del NF- κ B (Mayo y cols., 1997).

2.4.4. Inhibición de las caspasas.

Las caspasas son las únicas proteasas que no se encuentran compartimentalizadas en la célula; debido a sus efectos catastróficos sobre el microambiente celular es crucial que la activación y la actividad de las caspasas estén estrechamente reguladas. Este proceso está controlado por varios mecanismos, como la localización subcelular, la regulación de los niveles de procaspasas (por ejemplo el factor de transcripción Stat1 regula la expresión de las procaspasas 1, 2 y 3) o, más probablemente, por la actividad de una familia de inhibidores de las caspasas: los inhibidores de las proteínas apoptóticas (IAP) (Richter y Duckett, 2000).

Las IAPs se identificaron por primera vez en baculovirus y después se vio que están conservadas evolutivamente en múltiples especies (Holcik y cols., 2001). Presentan dos dominios importantes: el BIR (Baculovirus inhibitor of apoptosis repeat) y el RING Zn “finger”, implicados en la interacción con el DNA. La expresión de las cIAPs 1 y 2 está regulada por el factor de transcripción NF- κ B y su función es inhibir la activación de la procaspasa 9. Otras IAPs, como la XIAP y la survivina, inhiben la

activación de las procaspasas 3, 7 y 9. Además de bloquear la activación/ actividad de las caspasas esta familia de proteínas IAP puede tener un papel en la eliminación de las caspasas vía su ubiquitinización y degradación mediada por el proteosoma (Huang y cols., 2000).

La regulación de las caspasas por la familia de proteínas IAP se ve complicada por una interesante observación en *Drosophila melanogaster* donde siete únicas caspasas y al menos dos IAPs, DIAP1 y DIAP2, han sido identificadas (Doumanis y cols., 2001). En este sistema se ha visto que una de las dos caspasas identificadas recientemente (STRICA) está fuertemente asociada a DIAP2, lo que sugiere una única función celular para esta caspasa y este complejo. Este tipo de asociación inusual también se ha observado de una forma ligeramente diferente en otra proteína, survivina, que parece funcionar como una proteína antiapoptótica. La survivina es una proteína nuclear que se expresa en el límite G₂/ M donde controla la citoquinesis. En el núcleo esta proteína se asocia con caspasa-3 y p21^{WAF1/CIP1} (Cdk1) en los centrómeros. Tras la ruptura de este complejo trimérico se activa la caspasa-3 que rompe p21^{WAF1/CIP1} y otras dianas. También se sabe que la survivina interacciona con la caspasa-9 en el núcleo, donde existe en un estado fosforilado mantenido por p34^{CDK2}/ciclina B. Tras la defosforilación, el complejo se disocia y la caspasa-9 es activada para iniciar la apoptosis (O'Connor y cols., 2000).

Esta última observación nos conduce a preguntas más interesantes como ¿Cuál es la relación entre la apoptosis y el ciclo celular? ¿Por qué se encuentran las caspasas formando complejos con reguladores clave del ciclo celular? Está ampliamente aceptado que la apoptosis y el ciclo celular son procesos complementarios, cada uno alerta frente defectos o fallos del otro. Esto es particularmente evidente en la estrecha relación entre la regulación de la expresión de *bax* por p53 y la observación de que Rb es un sustrato para las caspasas, así como MDM2 y p21^{WAF1/CIP1}. Por tanto todo parece indicar que las caspasas participan no sólo en la respuesta apoptótica sino también están directamente implicadas en la regulación del ciclo celular (Los y cols., 2001).

2.5. Mecanismos amplificadores de la apoptosis.

Cuando una célula entra en apoptosis se produce una amplificación local y propagación del estímulo apoptótico a las células vecinas. Los mecanismos por los que las células vecinas podrían verse afectadas parecen implicar la vía de la quinasa Akt: si faltan factores de crecimiento la citada vía deja de funcionar y el factor FKHR-1 sin fosforilar se transloca al núcleo activando la transcripción de factores proapoptóticos como Bax, TNF y FasL (Earnshaw, 1999).

Otra vía implica a la proteína proapoptótica Bid, que actúa creando un circuito amplificador entre la vía Fas y la mitocondrial. La activación de la procasasa 8 transloca Bid hasta la mitocondria, donde libera el cocktail de factores letales como el citocromo-c, que amplifica la señal apoptótica utilizando la vía mitocondrial (Chou y cols., 1999).

2.6. Significado fisiológico y patológico de la apoptosis.

La apoptosis es responsable de numerosos acontecimientos fisiológicos y patológicos incluyendo los siguientes:

1. Destrucción programada de las células durante la embriogénesis, desde la implantación pasando por la organogénesis e involución del desarrollo hasta la metamorfosis. Los espacios interdigitales, los órganos huecos y la muerte del epitelio redundante en la fisura palatina son algunos ejemplos de la apoptosis durante el desarrollo (Duke y cols., 1996).
2. Involución dependiente de hormonas en el adulto como por ejemplo: destrucción de células endometriales durante el ciclo menstrual (Arends, 1999), la atresia folicular y regresión del cuerpo lúteo del ovario (Thomas y cols., 1978) y la regresión de la mama tras la lactancia (Strange y cols., 1992).
3. Muerte celular inducida por células T citotóxicas, como en la reacción inmunitaria celular (McCarthy y cols., 1992).
4. Muerte de las células inmunitarias, tanto linfocitos T como B, tras la depleción de citocinas (Schmid y cols., 1986), además de la delección de células T autorreactivas en el desarrollo del timo.

5. Delección celular en la proliferación de poblaciones celulares, como por ejemplo el epitelio de la cripta intestinal (Potten, 1992) o células de la epidermis.
6. Lesiones celulares producidas en enfermedades virales, como es el caso de las hepatitis víricas.
7. Muerte celular en tumores, con más frecuencia durante la regresión, pero también en tumores con crecimiento celular activo (Wyllie, 1992).
8. Atrofia patológica de los órganos parenquimatosos tras la obstrucción de conductos, como el páncreas (Oates y cols., 1986), riñón (Ledda y cols., 1989) o glándulas salivares.
9. Atrofia patológica de tejidos hormona-dependientes, como la atrofia prostática después de la castración (Kerr y Searle, 1973) y la pérdida de linfocitos en el timo tras la administración de glucocorticoides (Wyllie, 1980).
10. Muerte celular por estímulos nocivos que son capaces de producir necrosis, pero administrados a dosis bajas inducen apoptosis. Entre estos estímulos se incluyen lesión térmica leve, fármacos citotóxicos (Kerr y cols., 1994) e hipoxia (Wyllie y cols., 1987).

3. EL OXIDO NÍTRICO COMO REGULADOR DE LA APOPTOSIS.

3.1. Síntesis del óxido nítrico.

El óxido nítrico (NO), es sintetizado a partir del aminoácido L-arginina por una familia de NO sintasas (NOS) (EC 1.14.13.39); además del substrato L-arginina, la reacción catalizada por NOS requiere oxígeno molecular, NADPH y otros cofactores como tetrahidrobiopterina, FMN, FAD y el grupo hemo para producir NO y citrulina (Marletta, 1994). Existen tres isoformas de la enzima NOS: neuronal (nNOS o NOS-1), inducible (iNOS o NOS-2) y endotelial (eNOS o NOS-3) (Ignarro y cols., 1987; Nathan, 1992); cada una de ellas está codificada por un gen distinto y difieren en sus propiedades inmunológicas, moleculares y catalíticas, en su distribución celular, en su regulación y en la sensibilidad frente a los distintos inhibidores. Tanto la eNOS como la nNOS se consideran constitutivas, están reguladas por fosforilación, son calcio/calmodulina-dependientes y generan el NO implicado en la señalización celular.

Por el contrario iNOS, que se expresa en numerosas células incluyendo macrófagos y hepatocitos, produce elevadas cantidades de NO durante reacciones inmunológicas o inflamatorias cuando existe un daño tisular (Moncada y cols., 1991; Jun y cols., 1994). El NO también puede sintetizarse por mecanismos NOS-independientes a partir de nitratos o nitritos, aunque parece ser que en mamíferos el nitrato es un producto inerte y únicamente el nitrito podría considerarse como una fuente importante de NO en células y tejidos. Así, en tejidos isquémicos, como el corazón, se ha visto que el nitrito es una fuente de NO (Zweier y cols., 1999) y parece ser que la enzima que cataliza esta reacción en condiciones de hipoxia es la xantina oxidasa (Godber y cols., 2000; Millar y cols., 2002).

3.1.1. Papel del NO en la glándula mamaria.

Durante la lactogénesis, en el tejido mamario se produce una proliferación de los ductos mamarios y un aumento tanto del tamaño como de la actividad de las células alveolares mioepiteliales encargadas de secretar la leche. Estas fases están reguladas, como ya se ha comentado anteriormente, por hormonas y factores de crecimiento autocrinos como el EGF y la prolactina. Estudios previos han demostrado la existencia de las tres isoformas de NOS en la glándula mamaria de rata (Onoda e Inano, 1998), localizándose eNOS en el endotelio de los vasos sanguíneos que riegan el tejido mamario (Inano y Onoda, 2003) y en el endotelio de los conductos lactíferos; además tanto eNOS como iNOS están presentes en la membrana basal del epitelio mamario (compuesta de células mioepiteliales que forman los alvéolos y los conductos lactíferos) y nNOS se encuentra en las células que componen los acini así como en las células musculares y las células que conforman las glándulas sebáceas (Iizuka y cols., 1998).

El papel fisiológico de la producción de NO en este tejido no está determinado, pero esta molécula podría influir indirectamente en el desarrollo de la glándula mamaria ya que en los órganos endocrinos la liberación hormonal podría verse regulada por el NO, por ejemplo, niveles elevados de NO producido por iNOS en la hipófisis anterior pueden atenuar la liberación de prolactina y de GH (Vankelecom y cols., 1997). Además algunos estudios han demostrado que la producción de NO por parte de las NOS está asociada con la secreción salivar (Bodis y Haregewoin, 1993) y hepatobiliar

(Mascolo y cols., 1994) por lo que el NO también podría desempeñar un papel en la secreción de leche en la glándula mamaria.

Por otro lado, la involución de la glándula mamaria tras la lactancia es un proceso en el que se produce una remodelación del tejido, caracterizada por una muerte celular programada de las células epiteliales secretoras. El inicio de esta involución irreversible coincide con un descenso en los niveles de hormonas sistémicas y un aumento de las proteasas que degradan la matriz extracelular y la membrana basal. La producción de NO puede jugar un papel importante en el proceso apoptótico ya que media la expresión de proto-oncoproteínas como c-myc y p53.

Otro posible papel del NO en la glándula mamaria vendría determinado por su actividad citotóxica. En la rata, los niveles de mRNA de la xantina oxidasa, así como su actividad son relativamente bajos hasta el final de la gestación. En el momento del parto los niveles aumentan y se mantienen elevados hasta 10 días después de separar a las crías de la madre, tras lo cual vuelven a los valores iniciales, previos a la gestación. La leche es pues una fuente de xantina oxidasa que podría producir tanto ROS como RNS de modo que, en presencia de organismos infecciosos, el peroxinitrito formado podría causar una disminución en la viabilidad de estos microorganismos. Podríamos considerar por tanto que la producción de NO durante la lactancia por la xantina oxidasa secretada en la leche presenta una función antibacteriana ayudando a mantener la integridad de la mucosa gástrica (Benjamin y cols., 1994; Millar y cols., 2002).

3.2. Funciones del NO

El NO es una molécula de pequeño tamaño, que difunde fácilmente a través de medios acuosos y de las membranas, y es altamente reactiva ($t_{1/2} = 5\text{s}$), por lo está implicada en numerosos procesos fisiológicos y patológicos. Las actividades biológicas del NO pueden dividirse según sigan mecanismos cGMP-dependientes o independientes (Schmidt y cols., 1993; Schmidt y Walter, 1994). Si bien el NO puede mediar en las funciones celulares a través de modificaciones postraduccionales de las proteínas directa (e.g. nitrosilación y nitración) e indirectamente (e.g. metilación y ribosilación), la principal vía de señalización fisiológica del NO es la activación de la guanilato ciclasa,

al unirse al grupo hemo de la misma. Esta unión induce un cambio conformacional en la enzima que aumenta su actividad catalítica favoreciendo la formación de GMP cíclico (cGMP) a partir de GTP. Este segundo mensajero actúa sobre proteín-kinasas con la consiguiente fosforilación de proteínas (Schmidt, 1992), mediando así las acciones fisiológicas del NO entre las que destacan la vasodilatación, la inhibición de la agregación plaquetaria y de la activación de glóbulos blancos, neurotransmisión central y periférica y modulación inmunológica (Moncada y cols., 1991; Alderton y cols., 2001). Sin embargo, los mecanismos por los que el NO ejerce sus acciones citostáticas o citotóxicas no están totalmente elucidados. Se han propuesto numerosos mecanismos diferentes por los que se induciría la muerte celular por el NO, entre ellos destacan: i) acumulación de p53 por daño al DNA lo que conduciría a apoptosis, ii) activación de la poli(ADP)-ribosa polimerasa (PARP) que produciría una depleción de NADH y ATP y necrosis celular, iii) liberación de glutamato y excitotoxicidad y iv) daño oxidativo debido a la inhibición de la catalasa, depleción de glutatión, liberación de hierro y producción de peroxinitrito (Murphy, 1999).

El NO puede originar derivados más reactivos, denominados comúnmente especies reactivas de nitrógeno (RNS). A altas concentraciones, el NO reacciona directamente con oxígeno para producir dióxido de nitrógeno (NO_2), que a su vez reacciona con otra molécula de NO generando trióxido de dinitrógeno (N_2O_3). El NO_2 puede oxidar o nitrar (esto es, añadir un grupo NO_2^+) a una gran variedad de moléculas, mientras que el N_2O_3 produce la nitrosilación (adición de un grupo NO^+) de aminas o tioles; los S-nitrosotioles generados (RSNO) pueden alterar la función proteica y liberar el NO o transferir el NO^+ a otro tiol. El NO también reacciona con el anión superóxido (O_2^-) produciendo peroxinitrito (ONOO^-) que puede oxidar o nitrar otras moléculas o bien puede reaccionar y producir otras especies altamente reactivas como el radical hidroxilo OH^\cdot y NO_2 (Brown y Borutaite, 2001).

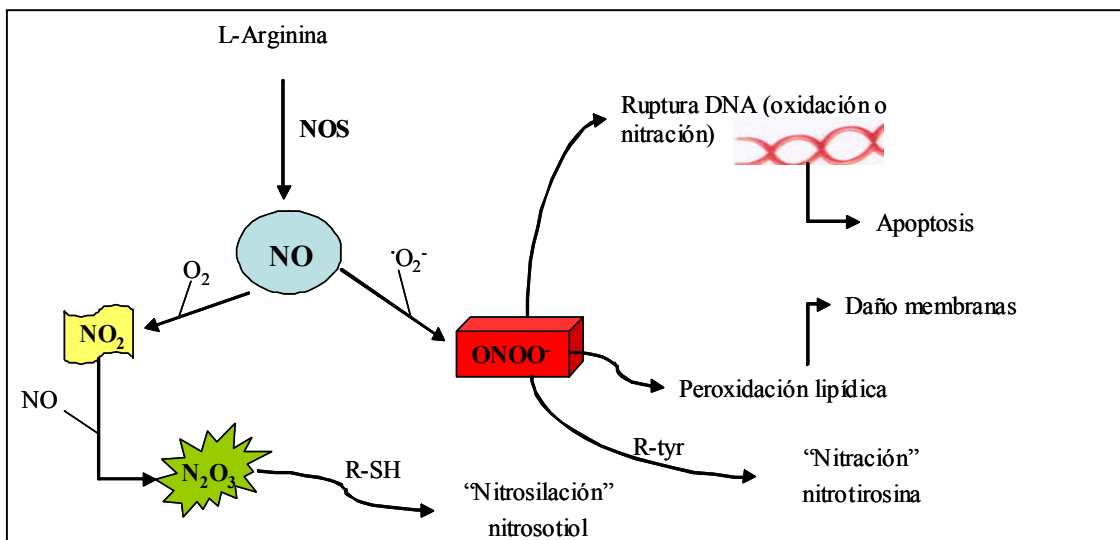


Figura 5. Reacciones del NO cuando se encuentra a altas concentraciones. Formación de especies más reactivas que serán, en última instancia las responsables de las patologías generadas por el NO.

3.3. EL NO como molécula pro- y antiapoptótica.

La homeostasis del organismo se mantiene debido a un delicado equilibrio entre la proliferación y la muerte celular; las alteraciones en este equilibrio pueden contribuir a la patogénesis de numerosas enfermedades humanas. El NO puede alterar este equilibrio ya que previene o induce la apoptosis. Por ejemplo, la apoptosis mediada por NO puede disminuir la función de un determinado órgano, causando enfermedades como aterosclerosis, esclerosis amiotrófica lateral y desórdenes neurodegenerativos. Por otro lado, la producción de cantidades fisiológicas de NO inhiben la muerte celular por apoptosis, previniendo el desarrollo de enfermedades como fallo hepático en sepsis, apoptosis de las células endoteliales y muerte de células neuronales inducida por hipoxia. No obstante, el efecto antiapoptótico del NO en células con el DNA dañado, que deberían morir por apoptosis, contribuye a la supervivencia celular lo que podría desencadenar un cáncer. Por tanto, la regulación de la producción de NO es importante para el mantenimiento del equilibrio interno.

3.3.1. El NO como inductor proapoptótico.

Elevadas concentraciones de NO o de peroxinitrito (ONOO⁻) inducen muerte celular por apoptosis en numerosos tipos celulares (Chung y cols., 2001), entre los que se incluyen macrófagos (Messmer y cols., 1996), timocitos (Fehsel y cols., 1995), islotes pancreáticos (McDaniel y cols., 1997) y células tumorales (Cui y cols., 1994). La mayoría de los efectos proapoptóticos del NO en estas células parecen ser independientes de cGMP. Los factores que influyen en la sensibilidad específica de cada tipo de célula a la apoptosis mediada por el NO están relacionados con el estado redox y los complejos con metales de transición en las células (Kim y cols., 2000) y con la expresión de determinados genes de supervivencia (Kim y cols., 1997a). Por lo tanto, el nivel umbral de NO que desencadena la apoptosis difiere de una célula a otra.

1- Activación de la vía mitocondrial.

El NO o sus derivados ejercen tres acciones directas sobre las mitocondrias que influyen en la muerte celular: i) inhiben la respiración mitocondrial, ii) estimulan la producción de superóxido, peróxido de hidrógeno y peroxinitrito y iii) inducen la apertura del poro de permeabilidad transitoria. El NO puede inducir directamente la liberación de citocromo c a través de la pérdida de potencial de membrana mitocondrial y este citocromo c citosólico activará la cascada apoptótica dependiente de caspasas.

El NO se une a la citocromo c oxidasa (complejo IV) en la cadena de transporte electrónico mitocondrial inhibiendo el flujo de electrones y con ello es capaz de inhibir rápida, potente y eficazmente la respiración mitocondrial (Poderoso y cols., 1996; Moncada y Erusalimsky, 2002); a su vez las RNS producen una inhibición no selectiva pero irreversible de numerosos componentes mitocondriales, entre ellos el complejo I, aconitasa y el complejo II (Cassina y Radi, 1996; Clementi y cols., 1998). En estas condiciones se generan iones superóxido en la mitocondria, favoreciendo la formación de otras especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS) que producen una depleción del pool de GSH (Clementi y cols., 1998) y formación de peroxinitrito. Esta situación induce una disfunción mitocondrial, facilitando la inducción del poro de permeabilidad transitoria, que produce en última instancia una rotura de la membrana mitocondrial externa y liberación de citocromo c (Borutaite y cols., 2000). De hecho, el peroxinitrito induce muerte celular por apoptosis en timocitos (Salgo y cols., 1995),

células neuronales (Bonfoco y cols., 1995) y células tumorales (Lin y cols., 1995). Es probable que el efecto del NO sobre la liberación de citocromo c dependa del potencial redox intracelular y de los niveles de las moléculas diana, como son hierro, glutatión y superóxido.

2- Activación de la ruta de señalización de las caspasas vía p53.

El NO puede causar daño al DNA por alguno de los siguientes mecanismos: i) modificación directa del DNA o ruptura de la hebra de DNA por el NO o intermediarios de las reacciones redox, ii) inhibición de los sistemas requeridos para reparar el DNA, iii) formación de especies intermediarias más tóxicas que el NO, como el peroxinitrito que se produce de la reacción de NO con O_2^- y iv) formación de nitrosaminas, que son carcinogénicas (Wink y cols., 1998).

Los efectos citotóxicos del NO y del peroxinitrito son debidos al daño que se produce al DNA, que induce una acumulación de p53 (Messner y Brune, 1996). Esta acumulación de p53 mediada por NO favorece la detención del ciclo celular debido a un incremento de p21 (Moncada y Erusalimsky, 2002) o bien la apoptosis al aumentar el cociente Bax/ Bcl-x_L, facilitando la liberación de citocromo c y la activación de las caspasas. Los mecanismos moleculares no están del todo elucidados pero parece ser que el NO produce un descenso en los niveles de la proteína Mdm2, que se corresponde con una reducción en la ubiquitinización de p53, por lo que éste no es degradado y se acumula en la célula (Wang y cols., 2002).

No obstante, también existen vías de señalización independientes de p53 en la apoptosis mediada por NO de modo que se produce la liberación directa de citocromo c o se ve implicada la ruta de las MAPK (Mitogen activated protein kinases), como se ha observado en células U937 que no expresan p53 (Messmer y Brune, 1996).

3- Activación de JNK/ SAPK y p38 kinasa.

El NO activa la JNK/ SAPK (c-Jun N-terminal kinase/ stress-activated protein kinase) dentro del grupo de las MAPK, e induce muerte celular por apoptosis activando además la p38 MAPK y la caspasa-3 (Jun y cols., 1994; So y cols, 1998). Se ha demostrado que la activación por NO de la p38 MAPK favorece la traslocación de Bax a la mitocondria, causando muerte celular por apoptosis (Ghatan y cols., 2000).

4- Apoptosis por generación de ceramida mediada por NO.

Las sustancias donantes de NO aumentan los niveles de ceramida al aumentar la actividad de la esfingomielinasa neutra dependiente de magnesio y la actividad de la caspasa-3 en la línea celular HL-60 (Takeda y cols., 1999). La formación de ceramida puede inducir numerosas vías de señalización apoptótica, incluyendo la liberación del citocromo c mitocondrial al citosol, la activación de las caspasas -9 y -3, la activación de JNK/ SAPK (Verheij y cols. 1996), la inhibición de la protein-kinasa B (PKB/Akt) (Schubert y cols., 2000) y la supresión de la expresión de Bcl-2 (Di Nardo y cols., 2000).

3.3.2. El NO como modulador antiapoptótico.

El NO puede proteger determinadas células de la apoptosis inducida por distintos tipos de estímulos como el factor de necrosis tumoral (TNF- α) y el estrés oxidativo (Kim y cols., 1995). El mecanismo bioquímico por el que el NO puede contribuir a mantener la viabilidad celular depende del tipo celular, la cantidad de NO liberada y el estado de activación de la célula; existiendo múltiples rutas de señalización implicadas.

1- Inhibición de la señalización apoptótica por la vía NO/ cGMP.

La vía de NO/ cGMP puede prevenir la apoptosis en hepatocitos (Kim y cols. 1997b); los efectos antiapoptóticos del NO están asociados a la producción de cGMP que suprime la liberación de citocromo c mitocondrial (Kim y cols., 1995), la generación de ceramida (De Nadai y cols., 2000) y la activación de las caspasas (Kim y cols. 1997b). Además tanto el NO como el cGMP protegen a los linfocitos B esplénicos de la muerte celular programada al aumentar los niveles de expresión de Bcl-2 (Genaro y cols., 1995) y la activación de PKB/ Akt (Li y cols., 2000) que induce la fosforilación de Bad y de la procaspasa-9 así como la expresión de genes citoprotectores a través de la activación de NF- κ B.

2- Inhibición de la actividad de las caspasas por S-nitrosilación.

Como ya se ha comentado anteriormente, las caspasas son una familia de cisteín-proteasas que juegan un papel esencial en la cascada de señalización apoptótica. Existen 14 isoformas y todas ellas presentan un residuo de cisteína en el sitio catalítico de la

enzima; este grupo tiol es susceptible de sufrir modificaciones redox y puede sufrir S-nitrosilación en presencia de NO. Esta modificación redox supone una inhibición reversible del enzima por el NO (Li y cols., 1997b), como se ha observado *in vivo* tanto en la caspasa-3 como en las caspasas-1 y -9 (Torok y cols., 2002). Al inhibir por S-nitrosilación la actividad de las caspasas, el NO inhibe la apoptosis en hepatocitos (Kim y cols., 1997b) y en células endoteliales dado que no sólo inhibe la activación proteolítica de las mismas sino que directamente suprime la actividad de las caspasas.

El NO es una molécula neutra y presenta una débil reactividad química con los grupos tiol a pH neutro, si se compara con otros productos del NO altamente reactivos como NO^+ , el cual se genera por la pérdida de un electrón del NO. Entre los aceptores de electrones encontramos el oxígeno molecular y los metales de transición como hierro y cobre, que reaccionan directamente con el NO *in vivo*. Las especies S-nitrosilantes pueden generarse al interaccionar el NO con complejos hierro-sulfuro (Boese y cols., 1995), por tanto la capacidad del NO para nitrosilar a las caspasas dependerá de la abundancia de estas moléculas y de la disponibilidad de otros grupos tiol susceptibles de ser modificados como el glutatión y la L-cisteína.

3- Regulación de la expresión de genes antiapoptóticos por el NO.

El NO puede inducir potencialmente la expresión de numerosos genes citoprotectores, induciendo HSP70 (heat shock protein 70) y HSP32 (hemooxigenasa), que protegen a los hepatocitos de la apoptosis inducida por el $\text{TNF}\alpha$, y el estrés oxidativo o nitrosativo (Kim y cols., 1995; Kim y cols., 1997a; Klein y Brune, 2002). Existen dos posibilidades que explicarían el mecanismo molecular por el que HSP70 ejerce su efecto antiapoptótico: la primera es que HSP70 inhibe la oligomerización de Apaf-1 al unirse al dominio de unión a caspasas (CARD, caspase-recruitment domain) de Apaf-1 lo que impediría la formación del apoptosoma (Saleh y cols., 2000). El otro posible mecanismo es que el HSP70 interviene en el transporte, mediado por chaperonas, de precursores de proteínas a la mitocondria por lo que inhibiría la liberación de citocromo c (Mosser y cols., 2000).

El NO también puede regular los niveles de proteínas de la familia Bcl-2. Las sustancias donantes de NO elevan la expresión de Bcl-2 tanto a nivel del mRNA como de la proteína y previenen la muerte celular por apoptosis (Genaro y cols., 1995).

Además recientemente se ha publicado que el NO, a dosis fisiológicas y mantenidas, protege de la apoptosis por mecanismos que implican un aumento en los niveles de las IAPs: cIAP-1, cIAP-2 y xIAP, disminuyendo a su vez los niveles de p53 y la translocación de Bax a la mitocondria

4. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DEL GSH.

4.1. Funciones celulares del GSH.

El glutatión (GSH, γ -glutamil-cisteinil-glicina) es un tripéptido no proteico presente en prácticamente todas las células animales que es sintetizado en el interior celular a partir de los aminoácidos que lo constituyen (glutamato, cisteína y glicina); estos aminoácidos no esenciales pueden ser sintetizados en el organismo pero también se obtienen a partir de la dieta. Muchas de las funciones del GSH se deben a sus especiales características químicas, ya que contiene un grupo tiol y un enlace γ -glutamilo que es resistente a la degradación por las peptidasas habituales.

Probablemente el glutatión sea el antioxidante celular más importante. Su poder reductor es utilizado para mantener los grupos tiol en las proteínas intracelulares y en otras moléculas (Jones, 2002). Una de sus funciones, demostrada *in vivo* (Mårtensson y Meister, 1991) es reducir el dehidroascorbato a ascorbato; además también mantiene el α -tocoferol en su forma reducida y por tanto juega un importante papel en el mantenimiento del medio reductor de las células, protegiéndolas de radicales libres, peróxidos y otros agentes tóxicos (Meister, 1994). No sólo es imprescindible por su poder reductor, además también es necesario para la conversión de ribonucleótidos a desoxirribonucleótidos (síntesis y reparación del DNA), actúa como reservorio fisiológico de cisteína, y está implicado en la regulación de la síntesis proteica, detoxificación de la célula, síntesis de leucotrienos, y otros más.

Diversos estudios sobre la evolución biológica han demostrado que existe una estrecha correlación entre el GSH y el metabolismo eucariótico aerobio; en ellos se propone que el GSH evolucionó como molécula para proteger las células contra la toxicidad del oxígeno (Fahey y Sundquist, 1991). El GSH es capaz de reducir, mediante

la acción de la glutatión peroxidasa, el peróxido de hidrógeno y otros peróxidos involucrados en la iniciación de las reacciones en cadena de los radicales libres. El par oxidado, GSSG formado, se reduce nuevamente a GSH mediante la glutatión reductasa, lo que hace que en condiciones normales se mantenga el cociente GSH/GSSG elevado (Meister, 1994). También actúa directamente interrumpiendo reacciones en cadena, reparando radicales oxidantes. Esto lo consigue al reaccionar con especies ROS, altamente oxidantes, como HO[·], RO[·] ó ROO[·], generando H₂O, ROH o ROOH y GS[·]. El radical GS[·] es menos oxidante que los otros, sin embargo, puede reaccionar con otra molécula de GSH vía GS[·] dando lugar a especies altamente reductoras como GSSG^{·-} (GS[·] + GS[·] → GSSG^{·-}). El potencial altamente negativo del par GSSG/GSSG^{·-} hace que el GSSG^{·-} sea una de las especies más reductoras de los sistemas biológicos. Esta especie puede reaccionar con el O₂ y produce O₂^{·-} y GSSG, lo que hace que la combinación superóxido dismutasa y GSH sean fundamentales en la defensa antioxidante celular.

La interrelación entre los efectos de diferentes antioxidantes con las funciones celulares del GSH es notable, ya que este tripéptido tiene una función muy importante como es mantener el poder reductor celular. La administración de butionina-(S,R) sulfoximina (BSO), un inhibidor de la γ -glutamilcisteína sintetasa, produce una deficiencia de GSH en ratas recién nacidas que se acompaña de un descenso significativo en los valores de ascorbato en riñón, hígado, cerebro y pulmones. Estas ratas tienen una alta tasa de mortalidad, pero la administración de dosis elevadas de ascorbato la disminuye, los valores de ascorbato se restablecen y se ahorra GSH (Mårtensson y Meister, 1991). La inducción de un déficit de GSH producido por la administración de BSO a ratas recién nacidas y cobayas es incompatible con la vida; sin embargo, los ratones adultos son capaces de sobrevivir con dicha deficiencia porque pueden sintetizar ascorbato. Esto avala la hipótesis de que una de las consecuencias del déficit de GSH en ratones es la inducción de la síntesis de ácido ascórbico en el hígado (Meister, 1994); esto no ocurre en las ratas recién nacidas ya que no se sintetiza el ascorbato como en las adultas. En cobayas con una dieta deficitaria en ascorbato se desarrolla el típico escorbuto a las tres semanas de iniciarse la dieta. Sin embargo, cuando estas cobayas con un déficit de ascórbico fueron tratadas con GSH-monoéster la aparición del escorbuto se retrasó de forma significativa (Mårtensson y cols., 1993). Estos estudios y los anteriormente comentados concluyen que el ácido ascórbico ahorra

GSH y que el GSH puede ahorrar ascorbato. Además el GSH también mantiene el tocoferol en su forma reducida, de un modo directo o bien a través del ascorbato.

Las células con una concentración anormalmente baja de GSH sufren un severo estrés oxidativo que se asocia con degeneración mitocondrial. Es interesante indicar que el daño severo y la muerte celular originado por el estrés oxidativo no solo se deben a una alteración en el metabolismo citoplasmático y mitocondrial del glutatión sino que también está implicada la poli ADP-ribosa polimerasa que es un enzima de ubicación nuclear (Sánchez-Góngora y cols. 1996).

4.2. Flujo intertisular de GSH en la rata lactante: redistribución específica hacia la glándula mamaria.

El ciclo del γ -glutamilo es el responsable de la síntesis y degradación de este tripéptido (Meister, 1973, 1994; Meister y Anderson, 1983). El GSH se sintetiza en el hígado a partir de sus aminoácidos precursores glutamato, cisteína y glicina por la acción consecutiva de la γ -glutamilcisteína sintetasa y de la GSH sintetasa (figura 7). La primera reacción de la síntesis que es catalizada por la γ -glutamilcisteína sintetasa es la limitante del proceso y se regula por retroalimentación negativa por el GSH, por la disponibilidad de L-cisteína (Meister y Anderson, 1983) y por fosforilación/defosforilación (Sun y cols., 1996). La utilización metabólica del glutatión sigue diversas vías, entre las que se encuentran las reacciones catalizadas por las glutatión S-transferasas. El GSH es un substrato de las glutatión peroxidasas que destruyen el peróxido de hidrógeno y peróxidos orgánicos; el glutatión oxidado (GSSG) formado es reducido a glutatión (GSH) en una reacción mediada por la GSSG reductasa y en la que está acoplado el par redox nicotinamida dinucleótido fosfato (NADP⁺/ NADPH), actuando el NADPH como cofactor.

Una vez sintetizado, el GSH es exportado por el hígado al plasma y a la bilis. El GSH plasmático es empleado por numerosos tejidos (riñones, pulmones, cerebro, glándula mamaria). El hígado proporciona ~85% de la cisteína plasmática, que será esencial para la síntesis de GSH en células no hepáticas. La utilización del GSH se inicia extracelularmente por la acción de la γ -glutamil transpeptidasa (GGT, E.C.

2.3.2.2.) y de dipeptidasas ya que ambas enzimas se encuentran unidas al exterior de la membrana celular. La GGT actúa sobre el glutatión tanto reducido como oxidado, así como sobre glutatión S-conjugados. La transpeptidación ocurre en presencia de algunos aminoácidos originando γ -glutamil aminoácidos; la cisteína es el aminoácido aceptor de este grupo γ -glutamilo más activo (Tate y Meister, 1974) pero otros aminoácidos neutros como metionina y glutamina también son buenos aceptores. Estos γ -glutamil aminoácidos son transportados al interior celular donde pasan a ser sustratos de la γ -glutamil ciclotransferasa que los transforma en 5-oxoprolina y el correspondiente aminoácido libre. La 5-oxoprolina da glutamato en una reacción catalizada por la 5-oxoprolinasa siendo ésta la etapa limitante en el ciclo del γ -glutamilo.

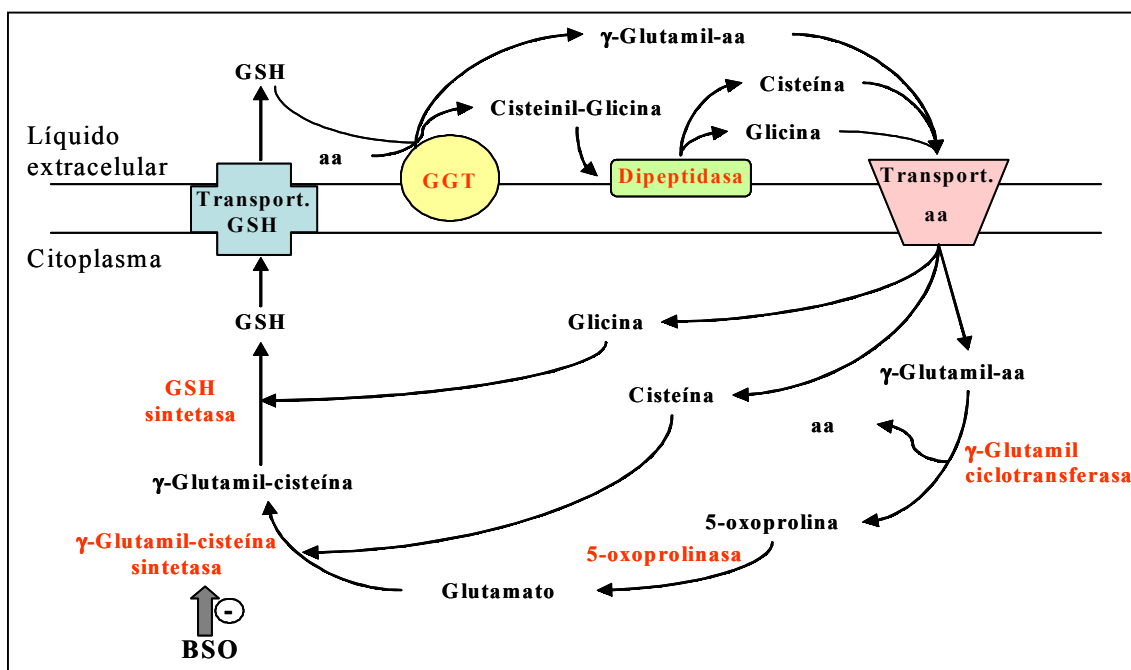


Figura 6. Ciclo del γ -glutamilo. El GSH sintetizado intracelularmente sale fuera de la célula, donde es degradado por la acción consecutiva la GGT y de una dipeptidasa, generándose γ -glutamil-aminoácidos, cisteína y glicina. Estos productos pasan al interior celular donde serán empleados para la síntesis del GSH.

Los niveles plasmáticos de GSH están significativamente elevados cuando se administran inhibidores de la GGT, mientras que el tratamiento con BSO, que es un inhibidor de la γ -glutamilcisteína sintetasa, produce una rápida y significativa disminución en los niveles plasmáticos de GSH. Estos experimentos demuestran el elevado recambio del GSH plasmático. De todo esto se deduce que, únicamente aquellos tejidos con una elevada actividad de la enzima GGT, serán capaces de

hidrolizar el GSH plasmático; el tejido con mayor actividad GGT es el riñón, pero la actividad de la GGT en la glándula mamaria aumenta de forma gradual durante la gestación hasta alcanzar un máximo en la lactancia, que progresivamente disminuye conforme ésta avanza.

Este flujo intertisular de GSH tiene diferentes funciones fisiológicas y entre ellas cabría destacar que es una manera eficiente de asegurar una disponibilidad de L-cisteína a los tejidos periféricos: el GSH exportado interacciona con cistina y con la GGT produciendo γ -glutamilcistina que es transportada al interior de la célula y reducida para dar cisteína y γ -glutamilcisteína que serán empleadas en la síntesis intracelular de glutatión y proteínas (Cotgreave y Schuppe-Koistinen, 1994). Esto se pone de manifiesto durante la lactancia, cuando la captación de L-cisteína y L-cistina por la glándula mamaria es muy baja y la síntesis de L-cisteína en este tejido no es posible ya que carece de actividad γ -cistationasa. Las necesidades de L-cisteína de la glándula mamaria se cubren con el GSH debido a una mayor disponibilidad de éste por el aumento de la liberación del GSH hepático y por el incremento del flujo sanguíneo hacia la glándula mamaria, junto con una elevada expresión y actividad de la GGT (Barber y cols., 1999).

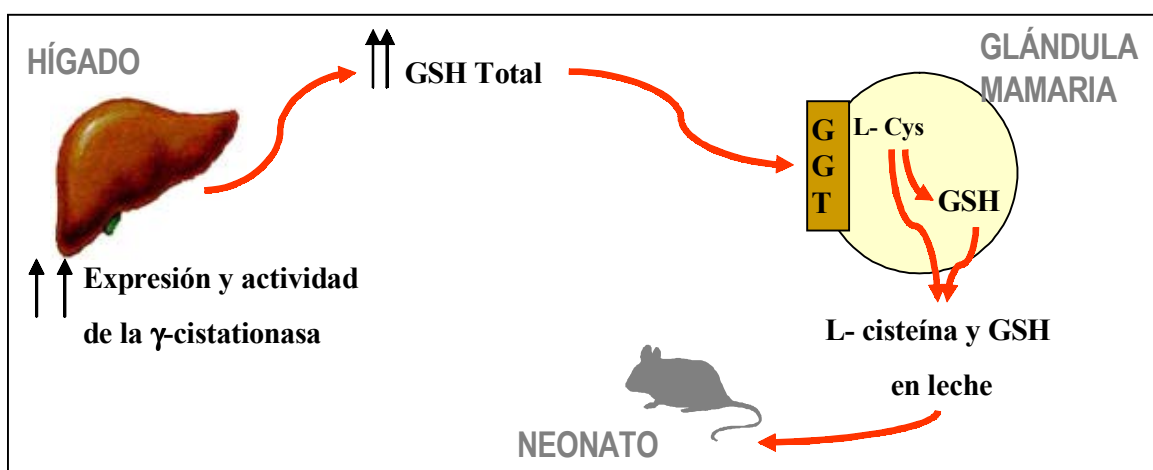


Figura 7. Flujo intertisular de GSH total durante la lactancia. Existe un flujo intertisular de GSH desde aquellos tejidos con una elevada tasa de expresión de la γ -cistationasa a aquellos en los que la actividad de la GGT sea elevada. Este es el caso de la glándula mamaria durante la lactancia, de modo que la disponibilidad de GSH en este tejido es elevada y cubre las necesidades de L-cisteína, no sólo para la síntesis de GSH intracelular sino también como aminoácido presente en la leche y semi-esencial para el neonato.

Por tanto, se puede decir que la GGT tiene una importante función fisiológica en la glándula mamaria ya que está implicada en el transporte de varios aminoácidos al interior celular donde servirán para sintetizar las proteínas secretadas en la leche. En ratones knockout para la GGT (GGT^{-/-}) se ha descrito una deficiencia crónica de GSH, un retraso en el crecimiento y menor esperanza de vida (<20 semanas) comparados con ratones control. Estos animales, debido a la deficiencia de la GGT, presentan unos requerimientos de GSH en los distintos tejidos que no permiten que se mantenga el nivel normal de GSH en hígado ya que todo el GSH sintetizado es exportado. Por tanto, el contenido de GSH mitocondrial en el hígado está disminuido en un 50% y esta deficiencia causa severos desórdenes metabólicos que conducen a una muerte temprana de los knockout homocigotos (Will y cols., 2000).

La importancia del flujo intertisular de GSH radica en el hecho de que el GSH hepático proporciona el 85% de la cisteína plasmática; este tripéptido actúa como reservorio de cisteína, ya que en aquellos tejidos con una elevada actividad de la GGT se producirá la hidrólisis del GSH, liberándose el grupo γ -glutamilo. Posteriormente, por acción de dipeptidasas presentes en la membrana externa, el dipéptido restante es digerido y la cisteína se libera al plasma de donde será captada por los tejidos para la síntesis intracelular de GSH. Una proporción significativa de esta cisteína plasmática vuelve al hígado, cerrándose así el ciclo del GSH.

4.3. Relación entre los niveles de GSH mitocondrial y la apoptosis celular.

Una fracción sustancial del glutatión intracelular se encuentra en la mitocondria; dado que este orgánulo carece de los enzimas necesarios para su síntesis, el GSH mitocondrial proviene del citosol. El GSH mitocondrial es importante para la detoxificación de ROS generadas por la cadena respiratoria, conjugación de xenobióticos, mantenimiento de proteínas con grupos tiol e incluso para la regulación del PTP (Will y cols., 2000). Alrededor del 2-5% del oxígeno empleado en la mitocondria genera, vía superóxido, peróxido de hidrógeno que de acumularse podría ocasionar daño; de ahí la importancia del GSH mitocondrial que parece ser el principal antioxidante que protegería este orgánulo de la acción de las ROS. Estudios previos

demuestran que una deficiencia de GSH, y específicamente la depleción de GSH mitocondrial, causa una disfunción mitocondrial que produce un daño en la célula e incluso muerte celular (Meister, 1995).

Los mecanismos bioquímicos que modulan la apoptosis o muerte celular programada todavía no están elucidados pero se cree que el estrés oxidativo y el daño al DNA están íntimamente relacionados con la apoptosis. De hecho, existen evidencias que relacionan la generación de ROS o la depleción de los antioxidantes celulares con la inducción de la apoptosis (Polyak y cols., 1997). El par redox del glutatión es un índice de estrés oxidativo, el cociente GSH/GSSG está en equilibrio con grupos tiol y disulfuro de las proteínas y es un importante regulador de las actividades enzimáticas. Durante la apoptosis se produce una oxidación del glutatión, indicativa de la existencia de estrés oxidativo, tanto en el citosol como en la mitocondria. Esta oxidación precede a la degradación del DNA nuclear por lo que podríamos decir que ocurre en una fase temprana de la apoptosis (Esteve y cols., 1999); el estrés oxidativo que se produce en la mitocondria juega un papel clave en la inducción de los mecanismos apoptóticos ya que se produce una alteración en el potencial de membrana mitocondrial que aumenta la permeabilidad de dicha membrana, favoreciendo la salida al citosol del citocromo c y otras proteínas proapoptóticas.

No obstante habría que discernir si la apoptosis es en realidad causada por los oxidantes que se generan o por un desequilibrio en el potencial redox celular. Existen trabajos que indican que una depleción de GSH celular produce una alteración en el equilibrio redox de la célula e induce la apoptosis (Ghibelli y cols., 1998; Pias y Aw, 2002) independiente de la generación de ROS. Pese a que se desconoce el mecanismo de regulación redox, si que se ha demostrado que la apoptosis debida a una oxidación del GSH se produce a través de la vía de señalización mitocondrial: aumento de Bax, una proteína proapoptótica de la familia Bcl-2, pérdida de citocromo c de la mitocondria y salida al citosol lo que favorece la formación del apoptosoma, que procesará la pro-caspasa-3, activándola.

OBJETIVOS

La lactancia se caracteriza por cambios fisiológicos y metabólicos entre los que destacan la hiperfagia, la hipertrofia de la glándula mamaria, hígado e intestino, redistribución de los nutrientes circulantes hacia la glándula y un aumento del gasto cardiaco y del flujo sanguíneo hacia la glándula (Bauman y Currie, 1980). El objetivo de todos estos cambios es asegurar una producción de leche suficiente para el normal crecimiento y desarrollo de las crías (Williamson y cols., 1995)

La retirada de las crías marca el comienzo del destete, donde factores locales y hormonales provocan la involución de la glándula mamaria. Este proceso se caracteriza por distintas fases; una primera donde ocurren cambios apoptóticos en las células epiteliales de los acini, si bien se conserva su estructura (Li y cols., 1997a). Esta fase está regulada por factores locales debido a la acumulación de leche y se caracteriza por un incremento en la expresión de genes de respuesta temprana como son p53, c-myc y otros factores de transcripción. Esta fase es reversible ya que si se reinstaura la succión por parte de las crías la lactancia continúa. Posteriormente, si el destete se mantiene la apoptosis continua, es independiente del p53 y en esta fase se produce un aumento de la degradación de la matriz extracelular por incremento de las proteasas lo que conduce a una remodelación del tejido mamario que será repoblado por adipocitos (Marti y cols., 1999; Jerry y cols., 2002; Stefanon y cols., 2002).

Estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado que el flujo intertisular del GSH es imprescindible para el mantenimiento de la lactancia (Barber y cols., 1999). La mayoría de GSH liberado por el hígado se dirige hacia la glándula mamaria, siendo este el modo de abastecer de L-cisteína a dicho tejido, ya que no expresa las enzimas de la transulfuración. Este aminoácido es imprescindible no sólo para la síntesis de GSH, sino también para proveer de L-cisteína a las crías al ser secretado en la leche. Cuando se bloquea la transulfuración hepática con PPG, un inhibidor irreversible de la γ -cistationasa, hay una menor liberación de GSH y una inhibición de la lactancia. Esto se evita si simultáneamente se inyecta al animal N-acetilcisteína.

El presente estudio se ha diseñado para demostrar que los cambios que acontecen durante el destete se pueden mimetizar en ratas lactantes donde se disminuye la disponibilidad y cantidad de GSH. Para ello utilizamos ratas tratadas con PPG y ratas tratadas con BSO, que inhibe irreversiblemente la γ -glutamylcisteína sintetasa, primera enzima de la síntesis de GSH (figura 6).

Los objetivos a desarrollar son:

- 1) Caracterizar los fenómenos que suceden en el destete, midiendo los cambios bioquímicos y de expresión génica que conducen a la muerte celular programada, y comprobar si ocurren estos cambios en ratas lactantes a las que se les inhibe la producción de leche tratándolas con PPG o BSO. Para ello analizaremos la degradación del DNA internucleosomal, la liberación de citocromo c y con ello la posible implicación de la mitocondria y la expresión (mediante RT-PCR y Western) de factores de transcripción y proteínas relacionadas con el ciclo celular (JNK, C-Jun, p53, p21, p27).
- 2) Se ha demostrado que el NO se produce en la glándula mamaria (Onoda e Inano, 1998) y que está implicado en la inducción de la apoptosis (Chung y cols., 2001). Estudiaremos la expresión (mediante RT-PCR y Western) de las tres isoformas de la óxido nítrico sintasa (eNOS, iNOS y nNOS) y su regulación durante el destete. También se estudiará la producción de nitratos y nitritos así como la nitración de proteínas. Se valorará si esos cambios acontecidos en el destete ocurren también en ratas lactantes inyectadas con BSO.
- 3) Una vez comprobado que la disminución en la disponibilidad y síntesis de GSH durante la lactancia mimetiza los cambios estudiados durante el destete, nos propusimos estudiar de una forma sistemática, mediante la técnica denominada “microarray chips”, los patrones de expresión génica que existen al retirar las crías y también si éstos se reproducen cuando se disminuye la disponibilidad de GSH hacia la glándula mediante el bloqueo de la transulfuración hepática con PPG.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN: CUIDADOS GENERALES.

Para la realización de este trabajo se utilizaron ratas hembra de la raza Wistar alimentadas *ad libitum* con dieta estándar de laboratorio. En todos los casos las ratas escogidas se mantuvieron en jaulas individuales con una camada de entre ocho y diez crías. El estabulario mantuvo durante todo el tiempo una temperatura ambiental de 20-22°C y unos períodos alternativos de luz y oscuridad de 12 horas cada uno (08:00 - 20:00). Las ratas fueron cuidadas y manipuladas de acuerdo con la “Guía para el uso y cuidado de los animales de laboratorio” (National Research Council Guide, 1996) y el comité de investigación de la facultad de medicina de Valencia aprobó el protocolo empleado en el estudio. Todos los experimentos fueron realizados entre las 10:00 y las 12:00 horas para minimizar las posibles variaciones cíclicas diurnas.

Las ratas se dividieron en los siguientes grupos:

- a) Ratas lactantes control: Todos los experimentos se realizaron en el pico de la lactancia, entre los días 11 y 14.
- b) Ratas lactantes sometidas a distintas condiciones de destete: Formado por ratas de las mismas características que las del grupo control, alimentadas y mantenidas en idénticas condiciones a las que se les retiraron las crías 2, 4, 8, 24 y 72 horas antes de realizar los experimentos.
- c) Ratas lactantes sometidas a destete y posterior resucción: Formado por ratas de las mismas características que las del grupo control, alimentadas y mantenidas en idénticas condiciones. Tras separar las crías durante 24 horas éstas fueron de nuevo colocadas con la madre, de modo que la lactancia continuó otras 24 horas antes del experimento.
- d) Ratas lactantes inyectadas con PPG: Para evaluar el efecto de la inhibición de la trans-sulfuración hepática sobre la glándula mamaria se emplearon ratas en el pico de la lactancia, alimentadas y mantenidas como las del grupo control a las que

durante los tres días previos al experimento se les inyectó propargilglicina (PPG, Sigma Chemical) por vía intraperitoneal (50 mg/ Kg de peso y día).

e) Ratas lactantes inyectadas con PPG + NAC: Formado por ratas de las mismas características que las del grupo control, alimentadas y mantenidas en idénticas condiciones a las que se les inyectó simultáneamente propargilglicina (50 mg/ Kg de peso) y N-acetilcisteína (NAC, 80 mg/ Kg de peso tres veces al día) durante tres días por vía intraperitoneal.

f) Ratas lactantes inyectadas con NAC: Formado por ratas control en el pico de la lactancia a las que se les inyectó N-acetilcisteína (80 mg/ Kg de peso tres veces al día) durante tres días por vía intraperitoneal.

g) Ratas lactantes inyectadas con BSO: Grupo formado por ratas de las mismas características que las del grupo control y tratadas en idénticas condiciones a las que dos días antes del experimento se les inyectó butionina sulfoximina (BSO, Sigma Chemical) por vía intraperitoneal (4 mmol/ Kg dos veces al día), un inhibidor de la γ -glutamilcisteína sintetasa, enzima implicada en la síntesis de GSH hepático.

2. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LECHE.

Esta determinación fue realizada según el método descrito por Sampson y Jansen en 1984. Para ello, durante los días previos al experimento (días 10-14 de lactancia) se pesaron todas las crías conjuntamente, a la misma hora (entre las 10:00 y las 12:00 horas) y con la misma balanza. El método se basa en el peso ganado por un número determinado de crías en un período de 24 horas y en condiciones normales de amamantamiento de las crías por parte de la madre. La siguiente ecuación relaciona la producción de leche total por cada cría en 24 horas (mL/ cría x día), con el peso de la cría (g) y el peso ganado por cría en 24 horas (g/ día).

$$\text{Producción de leche: } 0.0322 + (0.0667 \times \text{peso}) + (0.877 \times \text{peso ganado})$$

Este método permite obtener valores similares a los obtenidos con otros métodos más laboriosos.

3. OBTENCIÓN DE MUESTRAS TISULARES.

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (Abbott Laboratories, S.A) por inyección intraperitoneal (60 mg/Kg de peso corporal, en NaCl 0.9%). El hígado y la glándula mamaria inguinal se extrajeron rápidamente. A continuación cada órgano fue lavado con suero fisiológico y secado sobre papel de filtro, pesado e inmediatamente congelado por la técnica del *freeze-clamped* con dos bloques de aluminio previamente enfriados por inmersión en nitrógeno líquido (Wolleberger y cols., 1960). Posteriormente, las muestras se envolvieron en papel de aluminio y se almacenaron a -80°C hasta su procesado.

4. DETERMINACIÓN DE GLUTATIÓN REDUCIDO (GSH).

El tejido congelado se pulverizó en nitrógeno líquido y aproximadamente 1g. se homogenizó con 4 volúmenes de HClO₄ al 6% (w/v) utilizando un homogenizador de Teflón. El extracto se centrifugó a 1500g durante 10 minutos y el sobrenadante se empleó para medir glutatión reducido. Para ello se utilizó el método descrito por Brigelius y colaboradores (Brigelius y cols., 1983). Este método se basa en la conjugación de 1-cloro-2,4-dinitrobenzenu (CDNB) con el GSH, reacción catalizada por la glutatión-S-transferasa (GS-T, EC 2.5.1.18).



El GS-DNB producido absorbe luz a 340nm, siendo proporcional el cambio de extinción medido espectrofotométricamente a la cantidad de GSH presente en la muestra. El coeficiente de extinción molar es 9.6 unidades.

Para evitar la autooxidación del GSH que ocurre cuando se neutralizan los sobrenadantes ácidos, se adiciona EDTA (concentración final 2 mM). Esta modificación permite determinar con precisión concentraciones de GSH del orden de 0.01 μmoles/ mL. Una precaución adicional a tomar, consiste en la neutralización con carbonato potásico en lugar de con hidróxido potásico. Si se realiza con este último, se puede producir una alcalinización local excesiva,

favoreciendo la autooxidación. Además, conviene determinar el GSH en la muestra lo más rápidamente posible a partir del momento de la neutralización. Si el intervalo de la neutralización es inferior a 5 minutos, el error relativo de la medición es menor del 2 %.

Para un volumen final de 0.87 mL se utiliza la siguiente mezcla reactiva: 0.2 M Tampón fosfato potásico pH 7; 1 mM EDTA; 10 mM CDNB disuelto en etanol y 0.1 mL de muestra. Se lee la absorbancia a 340nm, realizando una línea base utilizando el registrador del espectrofotómetro (E_1). Se añaden 10 μ L de GS-T (12 U.I./mL) y se sigue la reacción hasta su conclusión (E_2). E_2-E_1 es proporcional a la cantidad de glutatión existente en la muestra.

5. DETERMINACIONES ENZIMÁTICAS.

5.1. Determinación de la actividad de la γ -Cistationasa.

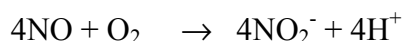
La actividad de esta enzima (EC 4.4.1.1) se midió determinando la síntesis de L-cisteína a partir de cistationina (Heinonen, 1973). El tejido se homogenizó en 30 mM tampón fosfato potásico, pH 6.9 y los homogenados se centrifugaron a 28000g durante 30 minutos empleándose el sobrenadante para la determinación. La mezcla de reacción para el ensayo de la actividad cistationasa contenía: 2 mM L-cistationina (Sigma Chemical), 0.53 mM piridoxal 5'-fosfato (Sigma Chemical) en 0.1 M de tampón fosfato potásico pH 6.9. El ensayo consistió en adicionar 1 mL de este cocktail a 250 μ L de muestra e incubarlo a 37°C durante 0, 15 y 30 minutos. A continuación se añadieron 125 μ L de HClO₄ al 20% para detener la reacción (en estas condiciones de ensayo la formación de L-cisteína fue lineal en el tiempo). Por último se añadió ditioneitol (Sigma Chemical) 10 mM para reducir toda la cisteína de la muestra y la cantidad de cisteína fue determinada por el método espectrofotométrico de Gaitonde (Gaitonde, 1967).

5.2. Determinación de la actividad de la γ -Glutamyltransferasa.

La actividad de la GGT (EC 2.3.2.2) se midió empleando γ -glutamyl p-nitroanilida (Sigma Chemical) como sustrato de la actividad hidrolítica de la GGT y glicilglicina como aceptor del glutamato en la reacción de transpeptidación (Tate y Meister, 1974)

6. DETERMINACIÓN DE NITRITOS POR FLUORESCENCIA.

El nitrito se forma como producto estable mayoritario de la reacción del óxido nítrico con oxígeno en medio acuoso, con estequimetría:



La valoración se basa en la reacción del compuesto aromático 2,3-diaminonaftaleno (DAN) con el NO (que se genera a partir del NO_2^- en medio ácido) que origina cuantitativamente 1H-naftotriazol. El producto es fluorescente, y más estable en medio básico (pH óptimo 11.7), con excitación a 365nm y emisión a 450nm.

Aproximadamente 0,1g de tejido se homogenizaron en 50 mM tampón Tris-HCl pH 7.5 y los homogenados se centrifugaron a 20000g durante 30 minutos empleándose el sobrenadante para la determinación. Para un volumen de 100 μL de muestra añadimos reactivo DAN preparado en medio ácido, de modo que la concentración final es de 4,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de DAN y 54 mM HCl. Tras incubar 10 minutos en oscuridad se añade NaOH hasta una concentración final de 0,12 M; el NaOH para la reacción y estabiliza la fluorescencia, y tras incubar en oscuridad durante 3 minutos se lee la fluorescencia emitida (VICTOR[®]) con $\lambda_{\text{excitación}} = 365$ nm y $\lambda_{\text{emisión}} = 450$ nm.

7. OBTENCIÓN DE ACINI AISLADOS DE GLÁNDULA MAMARIA DE RATA LACTANTE.

Para la obtención de los acini se sigue el método de Katz con la variante de D. H. Williamson (Katz y cols., 1974; Robinson y Williamson, 1977). Tras extraer la glándula mamaria inguinal de la rata lactante de cualquiera de los grupos de estudio, se procedió al aislamiento de los acini por tratamiento con colagenasa (1mg/ mL, Boehringer) a 37°C durante 1 hora. Posteriormente los acini se resuspenden en medio de Krebs-Henseleit (Krebs, 1932) y se realiza el aislamiento de DNA, RNA y proteínas como se describe a continuación.

8. AISLAMIENTO DE DNA Y ENSAYO DE FRAGMENTACIÓN DEL DNA.

Al precipitado de los acini, o en su caso a 0.1mg de tejido, se le añade 1mL de tampón de extracción (100 mM Tris pH 7.5, 10 mM EDTA, 10 mM de NaCl y 0.5% SDS) y 0.5 mg/ mL de proteinasa K (Roche Diagnostics). Esta mezcla se deja en un baño de agua a 50°C durante 4 horas. Tras la incubación, el DNA se purifica mediante extracción con un volumen de fenol: cloroformo: isoamil alcohol (25:24:1, Sigma Chemical) y se separa por centrifugación a 5000g durante 15 minutos a 4°C. Se separa la fase superior acuosa a la que se añade 0.1 volumen de 2.5 M acetato sódico y dos volúmenes de etanol frío al 95% y se deja 24 h a -20°C; el precipitado de DNA se lava con etanol al 95% y se centrifuga a 5000g durante 20 minutos a 4°C. El precipitado formado se seca a temperatura ambiente y se resuspende en tampón TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0). Este DNA en disolución se trata con 0.2 mg/ mL de RNasa A (Sigma Chemical) durante 2 horas a 37°C. Por último se realiza una electroforesis en gel de agarosa al 3% en TBE (89 mM Tris, 89 mM ácido bórico, 2.5 mM EDTA, pH 8.0), cargando 50 µg de DNA por pocillo. Tras la electroforesis a 30 V se visualiza el gel tiñéndolo con bromuro de etidio durante 30 minutos y se observa bajo luz UV para comprobar la fragmentación del DNA (Allen y cols., 1997).

9. OBTENCIÓN DE RNA TOTAL.

Para la obtención del RNA total, tanto de los tejidos empleados en el estudio como de los acini aislados de la glándula mamaria, se empleó el método de Chomczynski (Chomczynski y Sacchi, 1987). Se parte de aproximadamente 0.1g de tejido que se homogeniza en 1mL de una solución que contiene guanidinio- β -mercaptoetanol (4 M guanidinio isocianato, 25 mM citrato sódico, 0,5% sarcosil y 100 mM β -mercaptoetanol). Tomamos la mitad del homogenado que se mezcla con 50 μ L de acetato de sodio 2 M, 1mL de fenol y 100 μ L de cloroformo: isoamil alcohol (24:1) y se deja 15 minutos a 4°C. Se centrifuga a 5000g durante 15 minutos y se guarda el sobrenadante acuoso que contiene el RNA. Tras adicionar un volumen de isopropanol se mantiene 1 hora a -20°C para favorecer la precipitación del RNA. Transcurrido ese tiempo se centrifuga de nuevo a 5000g durante 20 minutos a 4°C. El precipitado se resuspende en 300 μ L de la solución de guanidinio- β -mercaptoetanol y se le añade un volumen de isopropanol. Esta mezcla se deja durante 24 horas a -20°C. Se centrifuga a 5000g durante 30 minutos a 4°C y finalmente el precipitado se lava con una solución de etanol al 70% y se disuelve en agua estéril libre de RNasas. El RNA se cuantificó espectrofotométricamente a 260nm y se guardó a -80°C hasta su procesado.

10. CUANTIFICACIÓN DE RNA Y DNA.

La cuantificación del RNA y del DNA se realizó mediante medida espectrofotométrica a 260 nm, y la comprobación de la pureza mediante la relación de las medidas 260/280 nm. Para hacer el blanco de la medida de RNA se puso 1mL de agua libre de RNasas en la cubeta de cuarzo (A_b) y para la medida se diluyó en esta agua 2 μ L del RNA aislado (A_m). Con los valores obtenidos se hizo el siguiente cálculo:

$$\boxed{A \times 40 \times 1000/2 = \mu\text{g de RNA}}$$

Donde: $A=A_m - A_b$; 1 OD a 260nm = 40 μ g RNA por mL; 1000/2=Dilución del RNA.

La comprobación de la pureza del RNA se llevó a cabo dividiendo el valor de la absorbancia a $\lambda=260\text{nm}$ entre el valor de la absorbancia a $\lambda=280\text{nm}$, de forma que valores comprendidos entre 1.8 y 2.0 indican que se obtuvo un RNA de buena calidad. Además de las medidas de absorbancia, y con el fin de asegurar la integridad del RNA, se realizó una electroforesis en gel de agarosa y tampón MOPS (20 mM MOPS, 5 mM acetato sódico, 1 mM EDTA) de las muestras.

Para la cuantificación del DNA se siguieron los mismos pasos salvo que en la ecuación se multiplica por 50, ya que 1 OD a 260nm equivale a 50 μg de DNA por mL. Además, los valores de la relación A_{260}/A_{280} que indican una buena calidad de DNA son los que están por debajo de 1.5.

11. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL mRNA POR RT-PCR.

La reacción de RT-PCR se llevó a cabo en dos pasos; para la transcripción inversa se empleó oligo (dT)₂₃ (Sigma Chemical) como cebador para generar la hebra de cDNA. A cada tubo de reacción se añadieron 2 μg de RNA, 0.5 μg de oligo y agua libre de RNAsas hasta un volumen final de 12 μL . Esta mezcla de reacción se calentó a 70°C 10 minutos y después se le añadió: 4 μL de 5x “first strand buffer” (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 2 μL de DTT 0.1 M y 1 μL de Superscript reverse transcriptase (200 U/ μL) (Invitrogen Life Technologies). Esta mezcla se incubó a 42°C durante 50 minutos y seguidamente 15 minutos a 70°C.

La amplificación del cDNA sintetizado se realizó empleando una polimerasa gelificada (Biotools, B&M Labs) y 2 μL de cDNA, siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Las condiciones para cada PCR fueron determinadas en experimentos preliminares y optimizadas para cada gen estudiado. Tomamos como control interno el RNA de la proteína ribosomal 26S, dado que este RNA se expresa a un nivel constante en muchos tejidos y líneas celulares cultivadas en diferentes condiciones fisiológicas (Vicent y cols., 1993). Las condiciones de amplificación

MATERIAL Y MÉTODOS

fueron: 2 minutos a 85°C para conseguir un efecto “hot-start”, 94°C durante 2 minutos y a continuación: 94°C durante 45 segundos, 30 segundos a la temperatura de anillado y 68°C durante 1 minuto. Esto último se repite durante un número de ciclos variable y específico para cada gen estudiado. Por último, existe un periodo de extensión final de 5 minutos a 72°C.

Las condiciones de PCR dependen fundamentalmente del oligo empleado y del mRNA que se amplifica ya que cada uno tendrá una temperatura de anillado y un número de ciclos determinado. En el caso de los genes estudiados estas condiciones fueron:

Oligo	Nº de ciclos	Temperatura de anillado	Tamaño (pares bases)
26S RIB	25	51°C	252 pb
c-Jun	30	63°C	460 pb
p53	30	58°C	600 pb
p21 ^{WAF1/CIP1}	30	62°C	400 pb
JNK2	30	62°C	540 pb
iNOS	40	63°C	549 pb
nNOS	40	62,4°C	620 pb
eNOS	30	62,4°C	424 pb

Los cebadores sintéticos específicos para cada gen fueron:

Oligo	Sense (5' a 3')	Antisense (5' a 3')
26S RIB	ATTTGCTGCACGAACTGCG	CAGCAGGTCTGAATCGTGGT
c-Jun	TGAGTGCAAGCGGTGTCTTA	TAGTGGTGATGTGCCCATTTG
p53	CACAGTCGGATATGAGCATC	GTCGTCCAGATACTCAGCAT
p21 ^{WAF1/CIP1}	GTGAGACACCAGCAGAGTGCAA	ACAGCGATATCGAGACACTCAG
JNK2	AGATCCTTGACTTTGGCCTG	TCTCTTTCTTCCAACCTGGGC

Oligo	Sense (5' a 3')	Antisense (5' a 3')
iNOS	TGTGACACACAGCGCTACAA	TGTTGAAGGCGTAGCTGAAC
nNOS	CAGTCATTAGCAGTAGACAG	TTTGTGCGGACATCTTCTGG
eNOS	GACATTGAGATCAAAGGACTGC	CGGCTCGTCACCTCCTGG

La visualización de los productos de la reacción de RT-PCR, se llevó a cabo tomando 10 μ L de los 50 μ L totales y sometiéndolos a electroforesis de agarosa (1.2 % en TBE), tinción con bromuro de etidio y transiluminación con UV. La cuantificación de los productos de PCR derivados de los mRNA se llevó a cabo por densitometría de las bandas en el gel de agarosa-bromuro de etidio utilizando el programa “Genesnap” y “Genetools” del sistema de documentación de geles SYNGENE. Estudiamos la variación entre la relación de densidad de p53 y c-Jun y la banda correspondiente a la proteína 26S ribosomal, que se utiliza como control invariable.

12. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES CON MICROARRAY CHIPS.

La tecnología GeneChip de Affymetrix conlleva una serie de pasos de preparación de la muestra que deben realizarse siguiendo las recomendaciones de la empresa Affymetrix para asegurarse un resultado óptimo. Los principales pasos a seguir con el análisis de expresión de GeneChip son:

12.1. Aislamiento de RNA total y preparación del mismo.

Para el aislamiento del RNA total a partir de acini obtenidos de glándula mamaria de rata lactante se utilizó TRIzol, un reactivo comercial (Gibco BRL Life Technologies) recomendado por Affymetrix. Se siguió el protocolo propuesto; se trata de una modificación del método clásico desarrollado por Chomczynski (Chomczynski y Sacchi, 1987) tras la cual se realizó una precipitación con etanol añadiendo al RNA resuspendido en agua libre de RNasas: 0,1 volúmenes de 3 M acetato sódico y 2,5 volúmenes de etanol y se dejó 1 hora a -20°C ; el precipitado se centrifugó a 12000g

MATERIAL Y MÉTODOS

durante 20 minutos a 4°C y después se lavó dos veces con etanol al 80%. Por último se resuspendió en agua libre de RNasas y se cuantificó mediante análisis espectrofotométrico. También se realizó una electroforesis de agarosa convencional para comprobar la calidad de las bandas del RNA ribosómico.

A partir del RNA total aislado se procedió a la síntesis del cDNA de doble cadena. Para ello se realizó primero la transcripción inversa empleando la “Superscript II Reverse Transcriptase” (Invitrogen Life Technologies) y 10 µg de RNA total. En un primer paso tuvo lugar la hibridación del oligo para lo que se añadieron al tubo de reacción los 10 µg de RNA, 100 pmoles del oligo T7-(dT)₂₄ (sintetizado por la compañía Affymetrix y cuya secuencia es: 5'-GGCCAGTGAATT GTAATACGACTCACTATAGGGAGGCGG-(dT)₂₄-3') y agua libre de RNasas y se calentó a 70°C durante 10 minutos, tras lo cual se procedió a la síntesis de la primera hebra de cDNA; para ello se añaden al tubo de reacción anterior los siguientes reactivos: 1x “first strand buffer”, 10 mM DTT, la mezcla de desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) a una concentración de 500 µM cada uno y 400 U de enzima. Esta mezcla se incubó a 42°C durante 1 hora. Para la síntesis de la doble hebra se añadieron al tubo de reacción anterior los siguientes reactivos: 1x “second strand reaction buffer”, 200µM de cada nucleótido (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 10 U de DNA ligasa, 40 U de DNA polimerasa I y 2 U de RNasa H y se llevó hasta un volumen final de 150 µL con agua libre de RNasas. Esta mezcla se incubó a 16°C durante 2 horas tras lo cual se añadieron 10 U de T4 DNA polimerasa, se dejó 5 minutos más a esa temperatura y se añadieron 10 µL de 0,5 M EDTA. El cDNA de doble cadena así sintetizado se trató con fenol/cloroformo empleando para ello el kit Phase Lock Gels (PLG, Eppendorf) siguiendo las instrucciones de la casa comercial y realizando posteriormente una precipitación con etanol, para lo cual se añadieron 0,5 volúmenes de 7,5 M acetato de amonio y 2,5 volúmenes de etanol absoluto e inmediatamente se centrifugó a 12000g durante 20 minutos. Se procedió al lavado del precipitado con etanol al 80% y se resuspendió en 12 µL de agua libre de RNasas.

A partir del cDNA sintetizado se realizó una transcripción in vitro para obtener cRNA marcado con biotina, empleándose para ello el kit “BioArray HighYield RNA

Transcript Labeling” de ENZO, siguiendo las instrucciones adjuntas. Para ello, partimos de 5 μ L de cDNA al que se añadió el tampón de reacción, los ribonucleótidos marcados con biotina, DTT, una mezcla de inhibidores de RNasa y la T7 RNA polimerasa. La mezcla se incubó durante 5 horas en un baño a 37°C, agitándose el contenido cada 30-45 minutos. Tras la síntesis se purificó el cRNA obtenido usándose las columnas “RNeasy spin columns” de Qiagen y seguidamente se realizó una precipitación con etanol añadiendo 0,5 volúmenes de 7,5 M acetato de amonio y 2,5 volúmenes de etanol absoluto y se dejó precipitando 1 hora a -20°C. El precipitado se centrifugó a 12000g durante 30 minutos a 4°C, se lavó dos veces con etanol y se resuspendió en agua libre de RNasas.

12.2. Hibridación del cRNA marcado con biotina.

Una vez obtenido, el cRNA marcado debe cuantificarse empleando para ello el análisis espectrofotométrico. Como el aislamiento inicial se hizo de RNA total, es necesario calcular un cRNA que se denomina “ajustado” que tendrá en cuenta el que podamos haber arrastrado RNA total sin marcar. La fórmula es la siguiente:

$$\text{cRNA}_{\text{ajustado}} = \text{RNA}_{\text{m}} - (\text{RNA}_{\text{i}}) \times (y)$$

Donde RNA_{m} es la cantidad de RNA determinada tras la transcripción *in vitro*, RNA_{i} es la cantidad de partida de RNA (μ g) y (y) es la fracción de cDNA empleada en la transcripción *in vitro*.

El cRNA marcado se fragmentó por calor; 20 μ g de cRNA se mezclaron con el tampón de fragmentación y agua libre de RNasas y se incubó a 94°C durante 35 minutos. Tras esto se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% para estimar el tamaño de los transcritos marcados y del cDNA de doble cadena, así como para determinar si la fragmentación funcionó correctamente (los fragmentos de RNA deberían oscilar entre 35 y 200 bases).

Una vez obtenido el cRNA fragmentado se prepara el cocktail de hibridación. Para cada una de las condiciones estudiadas se hibridaron dos arrays, en un primer lugar se hibridó un test y tras comprobar que el resultado era el esperado se hibridaron los arrays que contenían el genoma de rata a estudiar. El cocktail de hibridación es el mismo para ambos arrays y consta de: 0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de cRNA fragmentado, 50 pM de oligonucleótido control B2, controles de hibridación eucarióticos (1,5 pM BioB, 5 pM BioC, 25 pM BioD y 100 pM *cre*), 0,1 mg/mL DNA de espermatozoos de salmón, 0,5 mg/mL BSA acetilado, 1x de tampón de hibridación y agua libre de RNasas hasta un volumen final que vendrá determinado por el tamaño del array. Esta mezcla de hibridación se calentó a 99°C durante 5 minutos y después se mantuvo a 45°C otros 5 minutos.

Los array se humedecieron con tampón de hibridación y se incubaron a 45°C durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo se vació el contenido de los mismos, se añadió un volumen apropiado de cocktail de hibridación y se mantuvieron a 45°C durante 16 horas en un horno de hibridación en rotación constante.

12.3. Lavados y tinción de las sondas hibridadas.

Tras la hibridación los chips se rellenaron con un tampón de lavado de baja astringencia (6X SSPE, 0,01% Tween 20 y 0,005% antiespumante) y se colocaron en el aparato Fluidics Station de modo que el lavado y marcado de los mismos fue totalmente automatizado. En primer lugar, se lavaron los arrays con tampón de baja astringencia a 25°C y posteriormente con tampón astringente (100 mM MES, 0,1 M NaCl y 0,01% Tween 20) a 50°C. La tinción consistió en una incubación de los chips con una solución de marcaje (1X tampón de tinción, 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ BSA acetilado, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SAPE - estreptavidina ficoeritrina-) durante 30 minutos a 25°C. A continuación se realizaron de nuevo lavados con tampón de baja astringencia y se incubó durante 10 minutos a 25°C con una solución que contenía el anticuerpo (1X tampón de tinción, 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ BSA acetilado, 0,1 mg/mL IgG cabra, 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ anticuerpo biotinilado). Por último se incubó de nuevo durante 10 minutos a 25°C con solución SAPE y se lavó con tampón de baja astringencia.

12.4. Escaneado y análisis informático de los datos obtenidos.

Por último se procedió al barrido densitométrico de los arrays con el Hewlett-Packard (HP) GeneArray Scanner con una longitud de onda de excitación de 488 nm. La cantidad de luz emitida a 570 nm es proporcional a la cantidad de cRNA unido en cada punto del array. Tras escanear el array, los datos resultantes fueron guardados en el disco duro del “GeneChip Work Station” y se procedió al análisis de cada una de las muestras con el software del ordenador. Cada condición se realizó por triplicado y únicamente se tuvieron en cuenta aquellos genes que variaban en todas las ocasiones estudiadas, realizándose un análisis estadístico (Mann-Whitney test) que permite extraer sólo aquellos genes en los que $p < 0.05$. Posteriormente, con el programa de Netaffx (NetAffx™ Análisis Center) se procedió a caracterizar los resultados, ya que este software permite la agrupación de los distintos genes en función del proceso biológico en el que están implicados.

13. TÉCNICA DE WESTERN-BLOT.

13.1. Aislamiento de proteínas a partir de tejidos.

Los tejidos se homogenizaron con 10 mL de tampón de aislamiento (1.8 mM NaH_2PO_4 ; 8.4 mM Na_2HPO_4 ; 1% Tritón X-100; 0.5g SDS; 2.5g NaN_3 ; 0.1 M NaCl; 8 mg/mL deoxicolato sódico y 1 mM PMSF) por gramo de tejido, al que se le añadió, en el momento de su uso, un cocktail de inhibidores de proteasas (5 μ L/ mL tampón, Sigma Chemical). Los homogenados se centrifugaron a 500000g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido corresponde al extracto de proteínas total del tejido.

Para determinar la liberación de citocromo c de la mitocondria al citosol, se obtuvieron extractos citosólicos de tejido mamario por centrifugación diferencial. Para ello el tejido se homogenizó en 10 mL de tampón de extracción (10 mM Hepes pH 7.9, 10 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 0.5 mM DTT, 1 mM PMSF, 5 mM NaF, 0,5 mM Na_3VO_4 y 0.1% Tritón X-100) por gramo de tejido, en presencia de inhibidores de proteasas. Este homogenado se centrifugó a 800g durante 10 minutos a 4°C y el sobrenadante fue

recogido en otro tubo y centrifugado de nuevo a 20000g durante 15 minutos a 4°C. Tras descartar el pellet el nuevo sobrenadante se empleó para analizar las proteínas citosólicas.

13.2. Separación de proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS y transferencia a membrana de nitrocelulosa.

La electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS se realizó según el método descrito por Laemmli (Laemmli, 1970); se usaron geles verticales de 1mm de espesor y 15µL de capacidad por pocillo. El gel de concentración estaba formado por acrilamida al 4% en tampón 0.125 M Tris-HCl pH 6.8, 5% glicerol y 0.1% SDS. El gel de resolución estaba formado por acrilamida al 10% o 12% (según el caso) en tampón 0.375 M Tris-HCl pH 8.8 y 0.1% SDS.

Se determinó la concentración de proteínas en las muestras empleando “BCA protein assay reagent” (Pierce Chemical). Cantidades idénticas de proteína (entre 25 y 50µg) se diluyeron con un tampón de carga (50% glicerol v/v, 10% SDS, 25% β-mercaptoetanol y 0.05% azul de bromofenol en tampón 0.3 M Tris-HCl pH 6.8) y se calentaron 5 minutos a 100°C. La electroforesis se realizó en cubetas con tampón de electroforesis (50 mM Trizma base, 384 mM glicina y 0.1% SDS pH 8.3) a voltaje constante de 100 V a lo largo del gel de concentración y de 150 V a lo largo del gel de resolución. Las proteínas separadas por SDS-PAGE fueron transferidas electroforéticamente a papel de nitrocelulosa de 0.45µm (Millipore) siguiendo la técnica de Burnette (Burnette, 1981). Las condiciones de transferencia fueron de 150mA durante 20 horas, empleando como tampón de transferencia 192 mM glicina, 25 mM Trizma-base y 20% metanol.

13.3. Identificación de las proteínas mediante Western-blot.

Para la detección de las proteínas se emplearon anticuerpos comerciales: anticuerpos monoclonales de Oncogene para p53 (OP-29), p21 (OP-76), p27 (NA-35); de Santa Cruz para p-JNK (SC-6254) y de Calbiochem para nitrotirosina (487923) y policlonales de Santa Cruz contra c-Jun (SC-1694), citocromo c y α-tubulina (SC-

5286). Los anticuerpos empleados para detectar la presencia de las tres isoformas de NOS (eNOS, iNOS y bNOS) también fueron policlonales, de Affinity BioReagents.

Para la inmunodetección de las proteínas de glándula mamaria se utilizó el substrato quimioluminiscente “SuperSignal West Pico Chemiluminiscent Substrate” (Pierce Chemical). Con este método se detectan antígenos inmovilizados conjugados directa o indirectamente con anticuerpos marcados con peroxidasa. La membrana de nitrocelulosa a la que se habían transferido las proteínas se bloqueó con PBS conteniendo leche en polvo desnatada al 5% y 0.05% Tween 20 durante 1 hora en agitación y a temperatura ambiente. A continuación se añadió la solución del anticuerpo (1 μ g/mL) incubándose 1 hora a temperatura ambiente. Después la membrana de nitrocelulosa se lavó 5 veces con TTBS (0.05 M Tris, 0.15 M NaCl y 0.1% Tween 20) y se incubó 50 minutos con el anticuerpo secundario correspondiente, marcado con peroxidasa tras lo cual se efectuaron de nuevo 5 lavados con TTBS. Finalmente se incubó el soporte de nitrocelulosa con el reactivo de inmunodetección (mezcla 1:1 de los reactivos del kit de Pierce) durante 15 minutos, se colocó la membrana entre láminas de plástico transparente y se expuso frente a una película X-Omat (Kodak).

La cantidad de proteína se determinó por densitometría de las bandas después del revelado del Western-blot, empleando la película X-Omat y el programa Genetools de Syngene determinamos la cantidad de cada una de las bandas comparándolas con sus controles correspondientes.

14. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.

Los resultados presentados en las tablas corresponden a la media aritmética de los valores obtenidos en cada experimento \pm el error estándar de la media (SEM). Además, en las tablas, se indica el número de observaciones diferentes obtenidas en cada grupo experimental. Las comparaciones estadísticas entre el grupo control y otros grupos se realizaron mediante one-way ANOVA, con el programa informatizado SPSS v 9. La homogeneidad de las varianzas se analizó mediante el Test de Levene, y en los casos en

MATERIAL Y MÉTODOS

que las varianzas eran distintas, los datos se transformaban de forma adecuada antes del ANOVA. La hipótesis nula fue aceptada para todos aquellos datos de los grupos en los que F no fue significativa para un valor de $P < 0.05$. Aquellos grupos de datos en los que F fue significativa fueron analizados por el Test Tukey's para un valor de $P < 0.05$.

RESULTADOS

1. LA DISMINUCIÓN EN LA DISPONIBILIDAD DE GSH MIMETIZA LA INVOLUCIÓN DE LA GLÁNDULA MAMARIA TRAS EL DESTETE.

1.1. Actividades de la γ -cistationasa y de la GGT y concentración de GSH en el hígado y la glándula mamaria de ratas lactantes y de ratas lactantes tratadas con inhibidores de la síntesis de GSH.

La γ -cistationasa, una enzima de la trans-sulfuración, hidroliza la L-cistationina en L-cisteína y 2-oxocetobutirato, utilizando la vitamina B₆ como cofactor. Esta enzima cataliza la síntesis de L-cisteína, un aminoácido precursor de la síntesis, no sólo de proteínas, sino también de GSH, siendo la disponibilidad de este aminoácido azufrado el paso limitante para la síntesis de GSH en el hígado. La actividad de la γ -cistationasa hepática aumenta durante la lactancia (Awata y cols., 1993). El inhibidor irreversible de la misma, la propargilglicina (2-amino-4-pentinoico, PPG) se emplea para comprobar si esta enzima es importante para el mantenimiento de la lactancia. Administrado *in vivo* disminuye la actividad de la enzima en más de un 90% (Reed, 1995). La actividad de la γ -cistationasa hepática no es detectable en ratas lactantes tratadas con PPG, al ser este compuesto un inhibidor irreversible de la enzima. Al inyectarse simultáneamente PPG y N-acetilcisteína (NAC) la actividad de la enzima permanece indetectable porque el inhibidor sigue ejerciendo su efecto. Sin embargo cuando se inyecta NAC a ratas lactantes control la actividad en el hígado de esta enzima no varía (**Tabla 1**; Barber y cols., 1999).

La concentración hepática de GSH es significativamente más baja tras la administración de PPG en las ratas lactantes si se compara con ratas lactantes control. La administración de NAC a las ratas lactantes inyectadas con PPG produce un aumento del GSH hepático a los valores control. Del mismo modo, la concentración de GSH en la glándula mamaria de ratas tratadas con PPG es significativamente menor que en ratas lactantes control y en ratas inyectadas con NAC.

RESULTADOS

Para confirmar que los resultados obtenidos tras la inhibición de la transulfuración hepática con PPG son debidos al déficit de GSH realizamos un experimento en el que se administraba a ratas en el pico de la lactancia y por vía intraperitoneal butionina sulfoximina (BSO), un potente inhibidor de la γ -glutamylcisteína sintetasa, una enzima también implicada en la síntesis hepática de GSH; en concreto, cataliza la formación de γ -glutamylcisteína a partir de glutamato y cisteína. La administración de BSO durante dos días produce una caída significativa de la concentración de GSH hepática; como cabría esperar, dado que la síntesis de GSH se ve afectada, la concentración de este tripéptido en la glándula mamaria también está disminuida.

La actividad de la γ -glutamyltranspeptidasa (GGT) en la glándula mamaria lactante no se ve afectada por la administración de PPG o de BSO, sin embargo sí que disminuye al separar a las crías de la madre.

Tabla 1.- Actividades de la GGT y la γ -cistationasa y concentración de glutatión reducido (GSH) en el hígado y en la glándula mamaria de ratas lactantes control y ratas tratadas con PPG, NAC o ambos.

	Control	+PPG 3d.	+PPG +NAC 3d.	+NAC 3d.	+BSO 2d.
Hígado					
GSH ($\mu\text{mol/g}$)	5.8 ± 0.4 (11) ^b	3.2 ± 0.5 (8) ^a	5.9 ± 1.1 (9) ^b	7.6 ± 0.3 (7) ^b	1.1 ± 0.1 (3) ^a
γ -Cistationasa ($\mu\text{mol}/(\text{g min})$)	$0.39 \pm$ 0.02 (9) ^a	ND	ND	$0.37 \pm$ 0.03 (7) ^a	—
Glándula mamaria lactante					
GSH ($\mu\text{mol/g}$)	2.3 ± 0.2 (13) ^{bc}	1.5 ± 0.2 (8) ^{ab}	2.3 ± 0.3 (8) ^{bc}	2.8 ± 0.2 (7) ^c	0.4 ± 0.1 (3) ^a
GGT ($\mu\text{mol}/(\text{g min})$)	11.0 ± 0.3 (4) ^a	10.7 ± 0.9 (4) ^a	9.0 ± 0.4 (4) ^a	8.9 ± 0.5 (4) ^a	11.6 ± 0.6 (3) ^a

Los valores expresados en la tabla son la media \pm SEM; entre paréntesis se indica el número de animales por experimento. Las letras en superíndice diferentes indican que existen diferencias significativas, $P < 0.05$. ND: No Detectable.

1.2. La inhibición de la actividad de la γ -cistationasa hepática afecta a la lactancia y su efecto se revierte tras la administración de NAC.

Para comprobar como afecta la inhibición de la γ -cistationasa en el mantenimiento de la lactancia y comprobar si la administración de NAC revierte los efectos de la inhibición de esta enzima, se determinó la producción de leche en ratas lactantes control, ratas tratadas con PPG, ratas inyectadas con PPG y NAC y ratas lactantes control inyectadas con NAC. Tal como se observa en la **tabla 2**, a las 48 horas de haber inyectado PPG a las ratas lactantes se produce una disminución significativa en la producción de leche frente a las ratas lactantes control; esta producción de leche va disminuyendo progresivamente a lo largo de los tres días en los que se sigue inyectando PPG. La administración de NAC simultáneamente con PPG evita esa disminución tan espectacular en la producción de leche con respecto a las ratas inyectadas con PPG. La administración de NAC a las ratas lactantes control no modifica la producción de leche.

Tabla 2.- Producción de leche en ratas lactantes control y ratas lactantes tratadas con PPG, NAC o ambos, durante tres días.

(mL/ cría por día)	Control (5)	+PPG 3d. (5)	+PPG+NAC 3d. (5)	+NAC (6)
Día previo	3.0 \pm 0.1 ^a	3.3 \pm 0.3 ^a	2.9 \pm 0.1 ^a	3.0 \pm 0.2 ^a
24h. inyectadas	3.2 \pm 0.1 ^a	2.2 \pm 0.3 ^a	2.4 \pm 0.2 ^a	3.1 \pm 0.2 ^a
48h. inyectadas	3.2 \pm 0.1 ^{ab}	2.1 \pm 0.1 ^a	2.3 \pm 0.4 ^a	3.3 \pm 0.2 ^b
72h. inyectadas	3.3 \pm 0.2 ^b	1.3 \pm 0.3 ^a	2.2 \pm 0.4 ^{ab}	3.2 \pm 0.2 ^b

Los valores expresados en la tabla son la media \pm SEM; entre paréntesis se indica el número de animales por experimento. Las letras en superíndice diferentes indican que existen diferencias significativas, $P < 0.05$.

Para evaluar la posibilidad de que la inhibición de la vía de la trans-sulfuración pudiera afectar al crecimiento y vitalidad de las crías y, consecuentemente, el estímulo de la succión se viese reducido, se diseñó un nuevo experimento en el que tras la inyección con PPG se intercambiaba la camada entre la rata lactante control y la tratada con el inhibidor, de modo que las crías control también fueron alimentadas por la madre

inyectada con PPG. Para ello, 24 horas después de la administración de PPG, las crías se pesaron y se intercambiaron de la madre tratada a la control y viceversa. Como puede observarse en la **tabla 3** los resultados no variaron, pese al *cross-fostering*.

Tabla 3.- Determinación de la producción de leche en ratas lactantes control y tratadas con PPG durante tres días, con intercambio de la camada.

	Control (3) (mL/ cría por día)	+PPG 3d. (3)
Día previo	2.9 ± 0.2 ^a	2.8 ± 0.2 ^a
24h. inyectadas	3.5 ± 0.2 ^a	2.1 ± 0.5 ^a
48h. inyectadas	3.3 ± 0.2 ^b	1.1 ± 0.4 ^a
72h. inyectadas	4.2 ± 0.4 ^b	0.8 ± 0.2 ^a

Los resultados expresados son la media ± SEM con el número de animales por experimento entre paréntesis. Letras en superíndice diferentes indican que existen diferencias significativas, $P < 0.05$.

1.3. La separación de las crías y la inhibición de la trans-sulfuración hepática por tratamiento con PPG inducen apoptosis en la glándula mamaria de rata lactante.

Al final de la lactancia la glándula mamaria entra en un proceso de involución caracterizado fundamentalmente por cambios metabólicos inmediatos, muerte celular programada y remodelación de las estructuras lóbulo-alveolares (Lund y cols., 1996). Es posible reproducir estos cambios en el pico de la lactancia (entre los días 9-12 de lactancia) si separamos las crías de la madre. Al no producirse la succión se acumula la leche, el flujo sanguíneo y los niveles de hormonas lactogénicas caen significativamente, lo que supone una disminución neta de la disponibilidad de sustratos hacia la glándula y una involución de dicho tejido (Marti y cols., 1999).

1.3.1. Liberación de citocromo c.

La mitocondria está profundamente implicada en la regulación de la apoptosis. Una de las primeras alteraciones morfológicas que se suceden durante la muerte celular programada es la alteración mitocondrial, que tiene lugar incluso antes de los cambios característicos que ocurren a nivel nuclear. Los cambios que se producen en la mitocondria producen una permeabilización de su membrana, lo que favorece la salida al citoplasma del citocromo c y otras proteínas proapoptóticas como Smac/ DIABLO. Una vez en el citosol, el citocromo c, junto con APAF-1 y en presencia de ATP, forma un complejo denominado apoptosoma, que activa la procaspasa-9 y desencadena la activación del resto de caspasas efectoras (Allen y cols., 1997).

Como ya se ha visto anteriormente, el destete afecta a la producción de leche y conjuntamente se produce un cese en la lactancia; la acumulación de leche en la glándula mamaria puede ser uno de los primeros estímulos que provoque la muerte de las células secretoras del epitelio mamario. Dado que la liberación de citocromo c al citosol es un proceso rápido y específico de la apoptosis, el cual tiene lugar tan sólo una hora después de la inducción de la apoptosis (Renz y cols., 2001), es de esperar que tras el destete se produzca una alteración en la mitocondria que favorezca la salida de esta proteína al citosol. Para comprobar esta posibilidad se aislaron las proteínas citosólicas de glándula mamaria de ratas lactantes sometidas a diferentes tiempos de destete y se realizó una inmunotransferencia que mostró, tal y como se ve en la **figura 8A**, que a las dos horas de destete ya se detecta la presencia de citocromo c en el citosol.

Al realizar el mismo experimento con ratas tratadas con PPG se observa que tras tres días de inhibición de la trans-sulfuración también existe un cese en la lactancia y una liberación de citocromo c al citosol (**figura 8B**). Es interesante comentar que, la administración simultánea de NAC a ratas tratadas con PPG no revierte la tendencia observada.

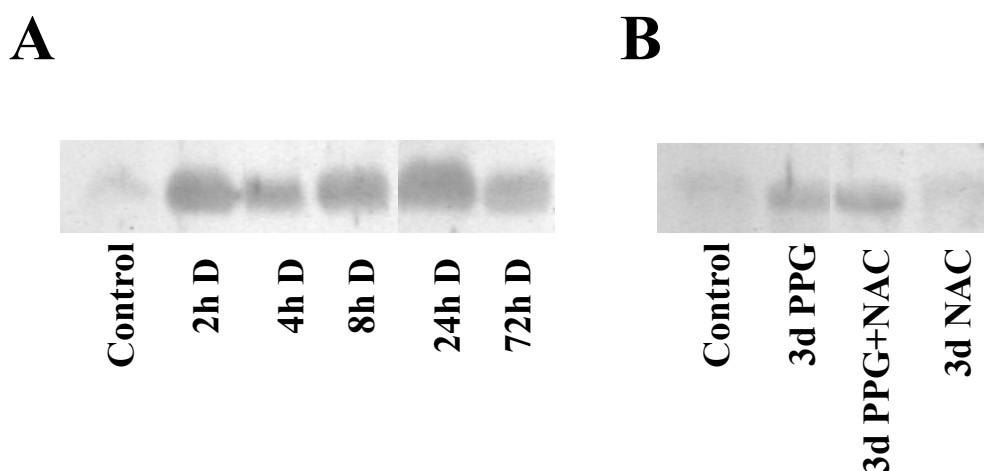


Figura 8. Análisis del citocromo c por inmunotransferencia del extracto de proteínas citosólicas de ratas lactantes sometidas a diferentes tiempos de destete (A) y tratadas con PPG, NAC o ambos (B).

1.3.2. Activación de endonucleasas y fragmentación del DNA.

La fragmentación del DNA es un indicador clásico de muerte celular (Wyllie y cols., 1980). Uno de los primeros cambios producidos en la célula, que indica que se va a producir la muerte celular, es la activación de una endonucleasa dependiente de calcio que produce la fragmentación del DNA nuclear obteniéndose fragmentos de 180-200 pb o múltiplos de este valor, correspondientes al DNA internucleosomal. Al realizar una electroforesis en gel de agarosa del DNA de la glándula mamaria control y de 2, 4, 8, 24 y 72 horas de destete se observa, a partir de las 8 horas tras el destete, un patrón característico de apoptosis, una escalera de DNA correspondiente a los fragmentos digeridos (**figura 9A**).

Si analizamos los extractos de DNA aislados a partir de ratas lactantes tratadas con PPG se observa también el patrón en “escalera” perteneciente a los fragmentos oligonucleosomales que han sido digeridos por la endonucleasa (**figura 9B**). Por tanto la inhibición de la vía de la trans-sulfuración hepática produce apoptosis y regresión de la glándula mamaria de la rata lactante, tal como indica la liberación de citocromo c y la fragmentación del DNA nuclear. Por otro lado la administración simultánea de NAC a ratas inyectadas con PPG no revierte por completo los efectos de la inhibición de la cistationasa hepática. De hecho, tal como se observa en las figuras 8 y 9, existe alteración a nivel mitocondrial y a nivel nuclear si bien en menor escala que si las ratas

se tratan únicamente con PPG. El tratamiento de ratas lactantes con NAC durante tres días en el pico de la lactancia parece no afectar al proceso, ya que ni se inhibe la producción de leche ni se induce la muerte celular de las células secretoras.

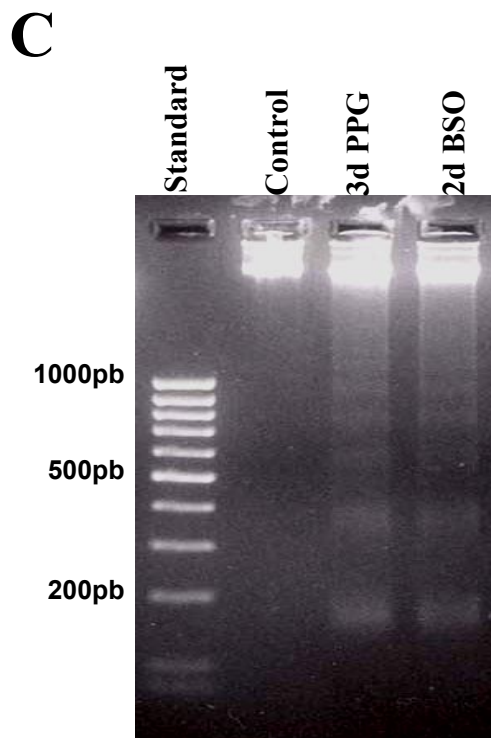
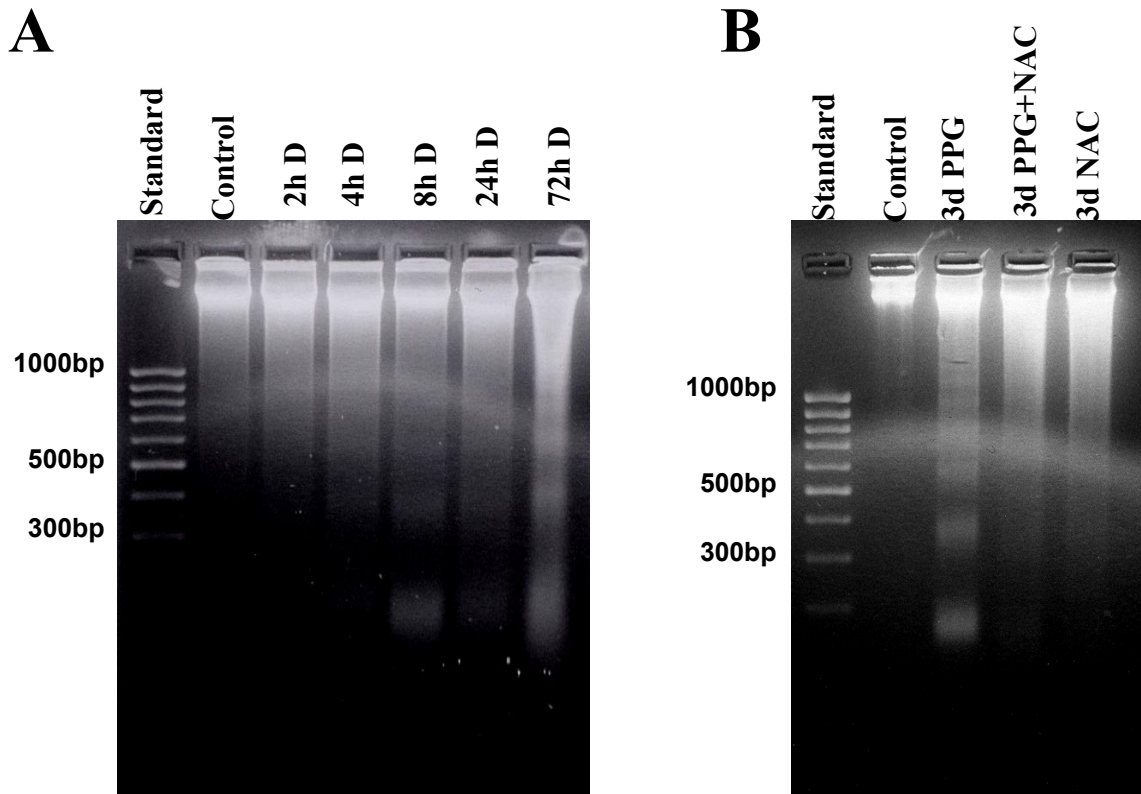


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 3% de los extractos de DNA nuclear obtenidos de glándula mamaria de rata lactante en distintas situaciones. (A) Ratas lactantes a la que se han retirado las crías durante los periodos de tiempo indicados para favorecer la acumulación de leche. (B) Ratas lactantes tratadas con PPG, NAC o ambos. (C) Rata lactante control y ratas lactantes tratadas con distintos inhibidores de la síntesis de GSH: PPG y BSO. Cada una de las condiciones es una muestra representativa de tres o más animales.

El tratamiento con BSO, un inhibidor de la síntesis de GSH, produce una disminución de los niveles plasmáticos de este tripéptido por lo que la disponibilidad de GSH en la glándula mamaria se verá afectada. Al igual que ocurre tras la administración de PPG a ratas lactantes, si realizamos una electroforesis del DNA genómico aislado de ratas lactantes tratadas con BSO durante dos días encontramos que existe una fragmentación de este DNA, evidencia de que se está produciendo la muerte de las células secretoras por apoptosis (**figura 9C**).

1.4. Análisis de la expresión de genes implicados en la involución de la glándula mamaria de rata lactante.

1.4.1. Efecto del destete sobre JNK, c-Jun, p53, p21 y p27.

Se ha visto que existen numerosos factores de transcripción implicados en el control de la muerte celular programada (PCD) en diversos sistemas: Myc/Max (Amati y cols., 1993), c-Fos (Colotta y cols., 1992; Smeyne y cols., 1993), c-Jun (Colotta y cols., 1992), p53 (Yonish-Rouach y cols., 1991) entre otros.

c-Fos y c-Jun son miembros de pequeñas familias de genes de respuesta temprana; complejos diméricos formados por Fos, Jun y miembros de la familia ATF/CREB forman la proteína activadora 1 (AP-1). El complejo AP-1 se une a una secuencia de DNA palindrómica (5'-TGAGCTCA-3') que está presente en la región promotora de genes regulados por AP-1 (Shaulian y Karin, 2001). Se ha demostrado la expresión de Fos y Jun en el contexto de la muerte celular programada en distintos sistemas (Jochum y cols., 2001). Durante la involución de la glándula mamaria se ha

observado una acumulación del complejo AP-1 formado mayoritariamente por c-Fos y JunD (Marti y cols., 1994); la inducción de este factor de transcripción durante la fase inicial de la involución de la glándula mamaria parece ser debida a un incremento de la actividad nuclear de la protein kinasa A (PKA) y precede a la fase irreversible de la involución y a la fragmentación oligonucleosomal del DNA nuclear, ya que si tras 24 horas de destete se vuelven a poner las crías junto con la madre la lactancia se recupera y la capacidad del complejo AP-1 de unirse al DNA vuelve a valores control (Jaggi y cols., 1996). Existen distintos genes como *c-jun*, ciclina D1 y TGF β 1 que se caracterizan por poseer uno o varios elementos de respuesta a AP-1 en sus promotores y todos estos genes son inducidos durante la involución de la glándula mamaria (Marti y cols., 1994; Marti y cols., 1995; Strange y cols., 1992). En la **figura 10** vemos como la expresión de c-Jun aumenta claramente a partir de las 8 horas de destete. En los análisis de proteínas mediante inmunotransferencia se observa que la cantidad de c-Jun y de JNK (Jun N-terminal Kinase) una kinasa que regula directamente c-Jun, están significativamente elevados tras 24 horas de destete y se mantienen elevados a las 72 horas (**figura 11**).

La proteína p53, un supresor tumoral implicado en diferentes procesos celulares (regulación del ciclo celular, apoptosis, senescencia, reparación del DNA, diferenciación y angiogénesis), actúa como mediador de la apoptosis destruyendo células dañadas y previniendo el desarrollo canceroso (Sionov & Haupt. 1999; Vousden. 2000). Como se observa en la **figura 10**, al inicio de la involución de la glándula mamaria se activa la transcripción de este gen; a las 2 horas de destete su expresión ya está aumentada al igual que los niveles de proteína (**figura 11**). Sin embargo, existen fluctuaciones en los niveles de p53, presentando dos máximos a las 2 y 24 horas de destete (**figuras 10 y 11**).

El p53 es un factor de transcripción implicado en el mantenimiento de la integridad genómica que se encuentra en una bifurcación de señalización intracelular, controla la detención del ciclo celular mediante p21, que es un inhibidor de las kinasas dependientes de ciclinas (CDKs), o bien activa la expresión de bax que es una proteína pro-apoptótica que favorece la liberación de citocromo c por parte de la mitocondria con la consiguiente activación de las caspasas 9 y 3. Ya se ha comentado anteriormente que tras el destete se produce una liberación de citocromo c mitocondrial, pero lo que

RESULTADOS

también hemos observado es que la vía del p21 también está activada; tanto los niveles de mRNA como de proteína de p21^{cip1} se encuentran aumentados significativamente durante el destete (**figuras 10 y 11**). Otro inhibidor de las CDKs de la misma familia que p21^{cip1} es el p27^{kip1}, también implicado en la detención del ciclo celular; como se observa en la **figura 11** los niveles de esta proteína también están aumentados al producirse el destete.

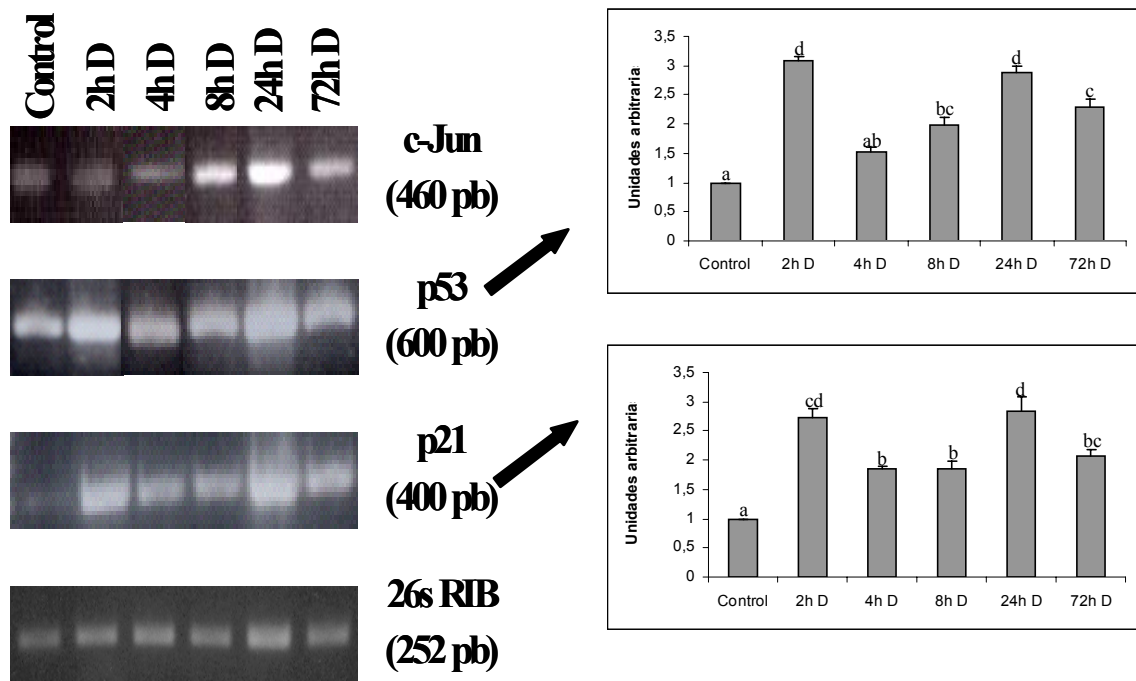


Figura 10. Niveles de mRNA de c-Jun, p53 y p21 analizados por RT-PCR en la glándula mamaria durante el destete. El análisis por RT-PCR del RNA total aislado de tejido mamario se empleó para determinar la expresión de c-Jun, p53 y p21 en ratas lactantes control (control) y ratas sometidas a distintas horas de destete (D). Se emplearon tres ratas diferentes de cada condición para el análisis semi-cuantitativo. Las gráficas muestran el cociente de cada gen con los niveles de mRNA de la proteína ribosomal 26S; los resultados representados son la media \pm SEM de tres experimentos diferentes. Las diferentes letras en superíndice indican diferencias significativas tras el tratamiento estadístico de los datos, $p < 0.05$.

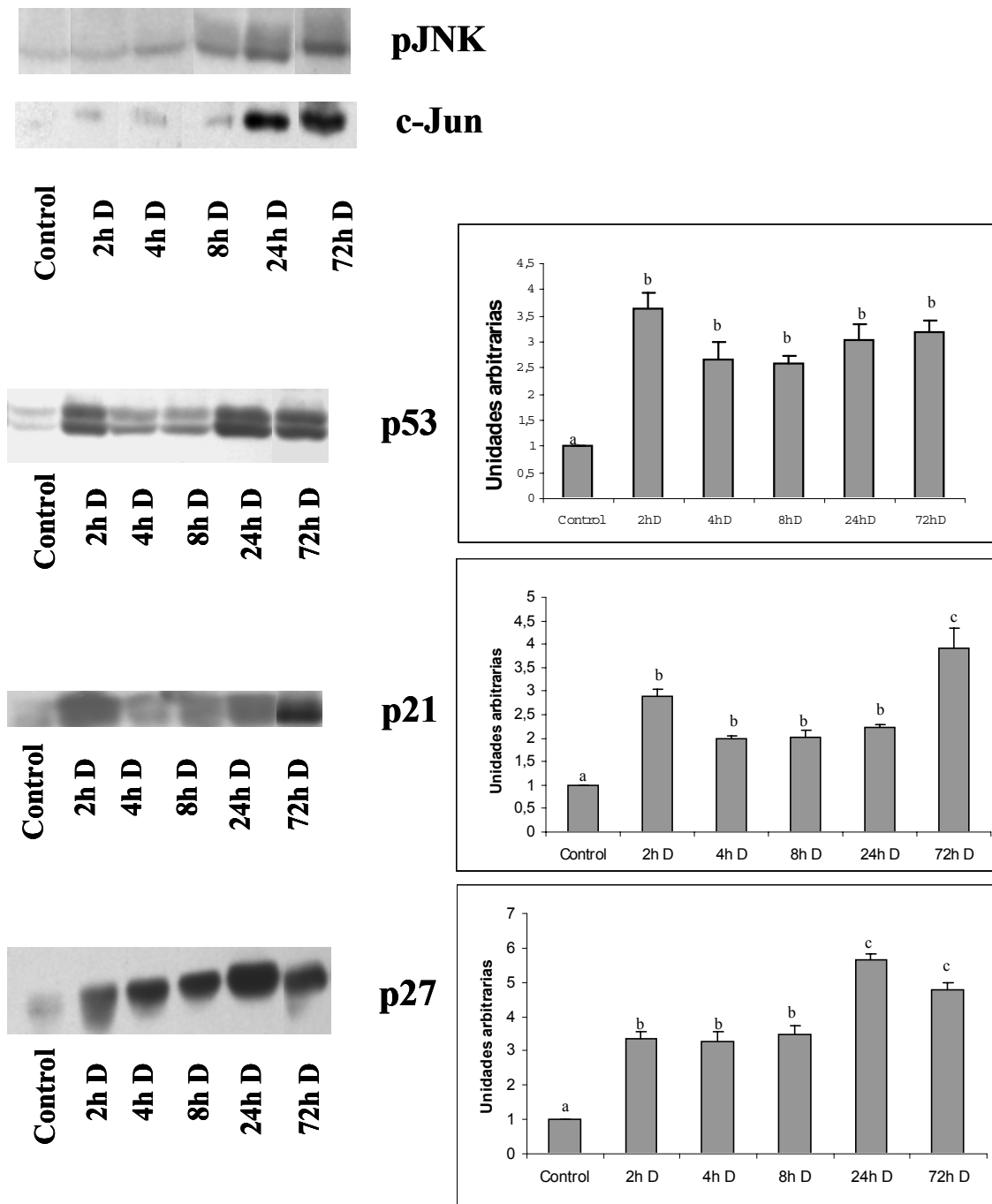


Figura 11. Análisis mediante inmunotransferencia de p-JNK, c-Jun, p53, p21 y p27 en glándula mamaria tras el destete. Extractos de proteínas totales (50µg de proteína/pocillo) aislados de glándula mamaria de ratas en el pico de la lactancia (control) y tras diferentes horas de separación de las crías (2h, 4h, 8h, 24h y 72h D) fueron analizados mediante inmunotransferencia utilizando los siguientes anticuerpos: JNK (Jun N-terminal kinase) fosforilado, c-Jun, p53 y las proteínas Cip/Kip p21^{cip1} y p27^{kip1}. Las gráficas muestran la cuantificación de cada una de las bandas; los resultados son la media ± SEM de tres experimentos diferentes. Las diferentes letras en superíndice indican diferencias significativas tras el tratamiento estadístico de los datos, p < 0.05.

1.4.2. Efecto de la inhibición de la trans-sulfuración hepática con PPG sobre la expresión de JNK, c-Jun, p53, p21 y p27.

Al comprobar que la inhibición de la síntesis de GSH produce muerte por apoptosis de las células secretoras de la glándula mamaria, hemos querido analizar la expresión del gen supresor de tumores, p53, y otros genes relacionados, en ratas lactantes tratadas con PPG durante tres días para determinar si el mecanismo implicaba la activación de los mismos genes, que se sabe están activados durante la involución de la glándula mamaria tras un destete forzado. Como se observa en las **figuras 12 y 13**, los niveles del mRNA y de proteína están aumentados en la glándula mamaria tras el tratamiento con PPG; este incremento llega a ser dos veces el valor de las ratas control. La administración simultánea de PPG y NAC previene el incremento en el transcrito de p53, como se observa en la **figura 12**, pero sin embargo los niveles de proteína siguen manteniéndose ligeramente superiores a los valores control (**figura 13**). Por último, el tratamiento con NAC no altera los niveles de esta proteína ni de ninguna otra de las que se han estudiado.

La administración de PPG a ratas lactantes durante tres días también aumenta la transcripción de c-Jun (**figura 12**), pero la adición de NAC previene este aumento. En cuanto a los niveles de proteína, tanto JNK como c-Jun, ambos reguladores de la expresión de p53, se encuentran elevados (**figura 13**), al igual que ocurría tras un destete de 8 horas. En este caso, la administración simultánea de NAC no es capaz de revertir en su totalidad el aumento observado, al igual que ocurre con la proteína p53.

Por último, el p21^{kip1}, que como ya se ha comentado es un inhibidor del ciclo celular, presenta unos niveles tanto de mRNA (**figura 12**), como de proteína (**figura 13**) significativamente aumentados comparados con ratas lactantes control, como ocurre tras un destete forzado. La administración de NAC mantiene el mRNA en valores control, si bien los niveles de proteína se encuentran más elevados.

El tratamiento de las ratas con PPG también produce un incremento en la proteína p27^{kip1} (**figura 13**), pero la administración simultánea de PPG y NAC previene, al menos en parte, este aumento.

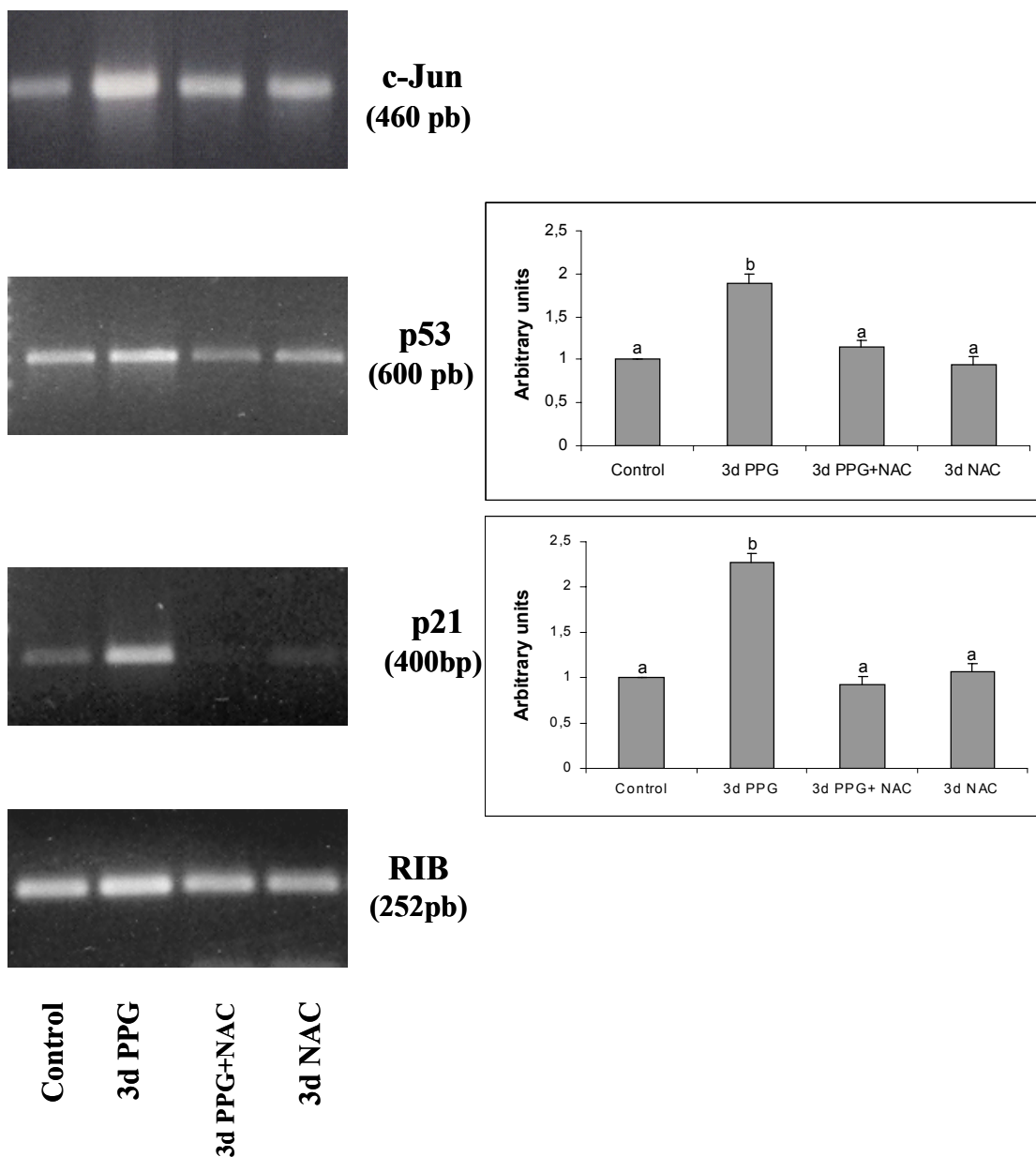


Figura 12. Análisis por RT-PCR de c-Jun, p53 y p21 en ratas lactantes control y en ratas tratadas con PPG, NAC y ambos. *El RNA total se aisló de tejido mamario de rata lactante (control) y de tejido mamario de ratas tratadas con PPG, PPG+NAC o NAC durante tres días y se amplificaron por RT-PCR los mRNAs de c-Jun, p53 y p21. Las gráficas muestran la relación de p53 y p21 con respecto a los niveles de 26S RIB. Los resultados son representativos de tres experimentos diferentes y se expresan con la media \pm SEM. Las diferentes letras en superíndice indican diferencias significativas tras el tratamiento estadístico de los datos, $p < 0.05$.*

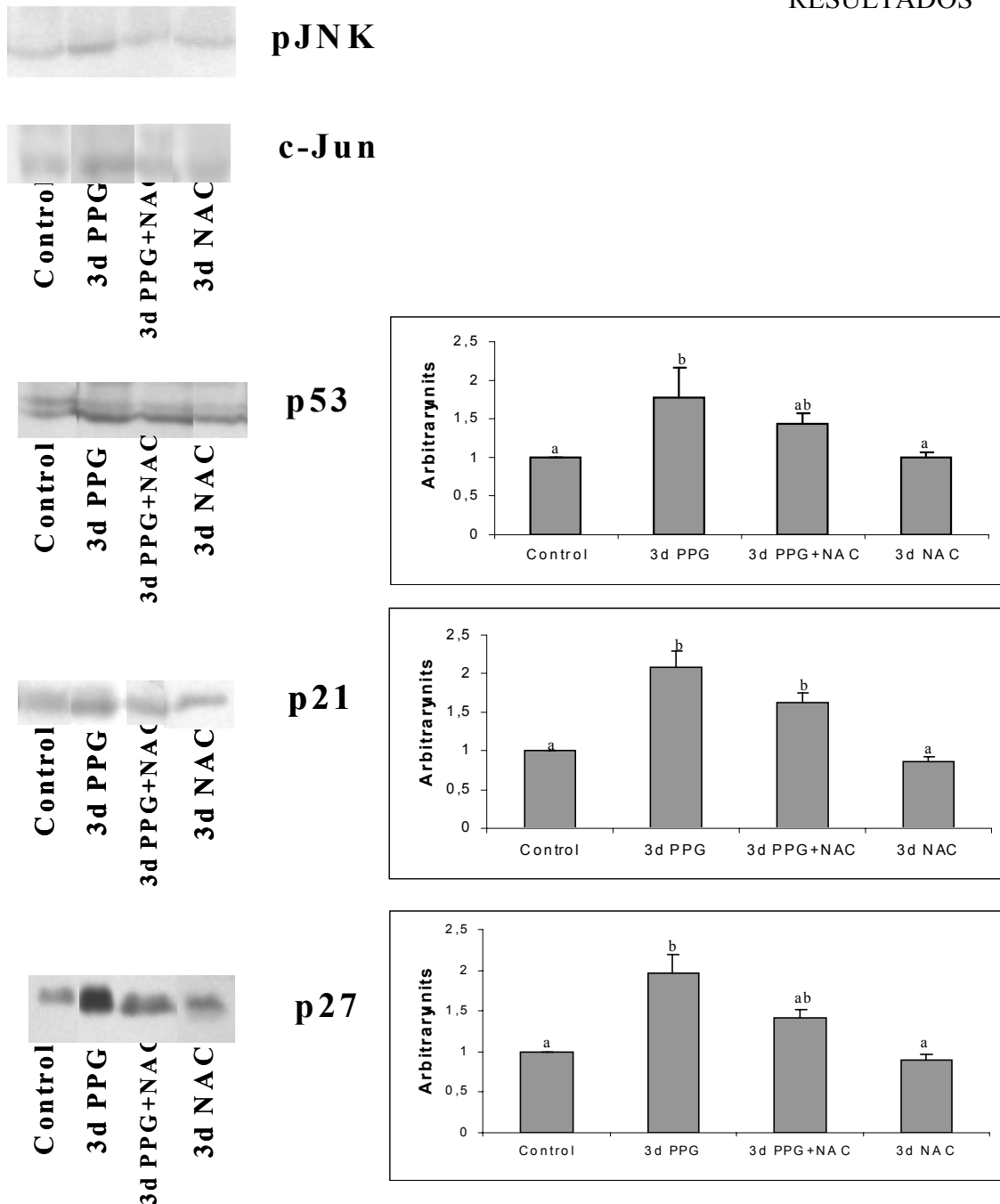


Figura 13. Análisis mediante inmunotransferencia de p-JNK, c-Jun, p53, p21 y p27 en tejido mamario de ratas lactantes control y ratas lactantes tratadas con PPG, NAC y ambos. Extractos totales de proteínas (50µg proteína/ pocillo) de glándula mamaria de rata control y tratadas con PPG, NAC o ambos fueron sometidos a electroforesis e inmunotransferencia con anticuerpos específicos contra pJNK, c-Jun, p53, p21 y p27. Los gráficos muestran las cantidades de cada proteína en las diferentes condiciones estudiadas; los resultados son la media \pm SEM de tres experimentos distintos. Las diferentes letras en superíndice indican diferencias significativas tras el tratamiento estadístico de los datos, $p < 0.05$.

1.4.3. Efecto de la inhibición de la síntesis de GSH con BSO.

La administración de BSO a ratas en el pico de la lactancia reduce la síntesis de GSH en el hígado y en la glándula mamaria (tabla 1), al inhibir la reacción catalizada por la γ -glutamilcisteína sintetasa. De este modo, no sólo la síntesis endógena sino también la disponibilidad de GSH en la glándula mamaria se ve reducida y se reproducen los mismos cambios a nivel genético y proteico que ya se han observado tras el tratamiento con PPG (figura 14).

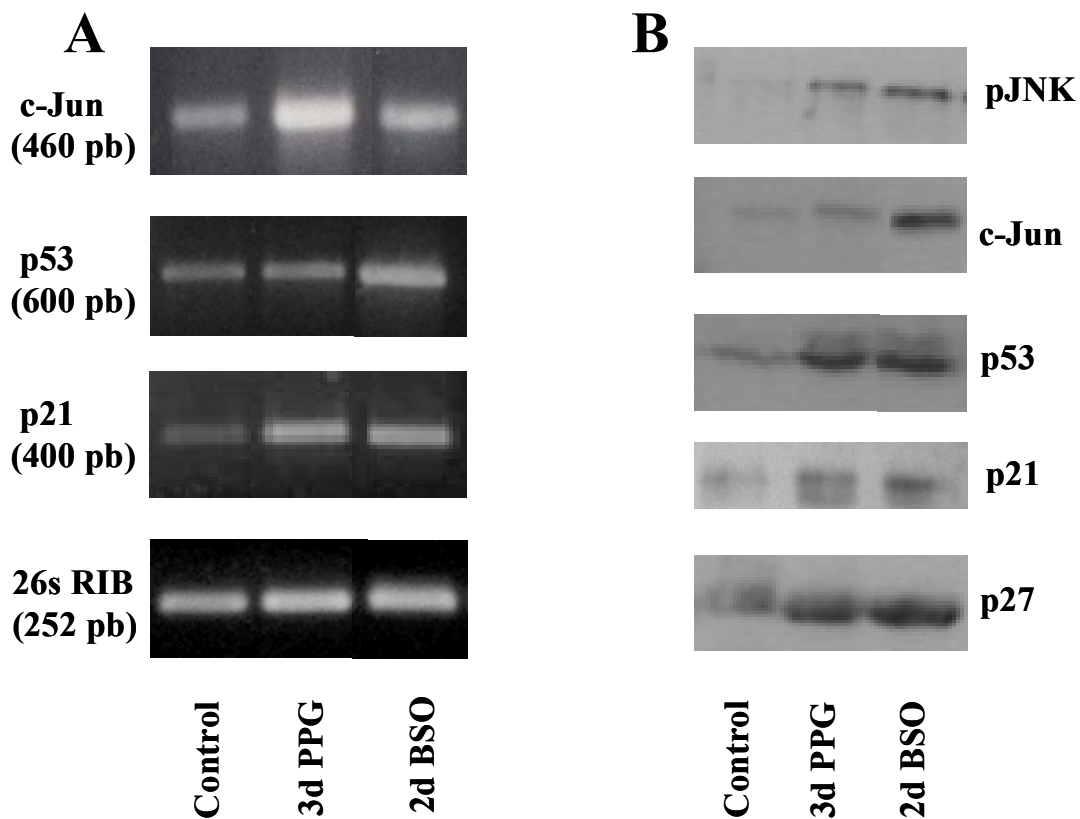


Figura 14. Análisis por RT-PCR de c-Jun, p53 y p21 y por inmunotransferencia de pJNK, c-Jun, p53, p27 y p21 en ratas lactantes tratadas durante dos días con BSO. (A) El RNA total aislado del tejido mamario se empleó para el análisis por RT-PCR de c-Jun, p53 y p21 en ratas lactantes control y ratas tratadas con PPG o con BSO. (B) Análisis por inmunotransferencia de proteínas aisladas de glándula mamaria (50 μ g proteína/ pocillo) de ratas lactantes control y tratadas con PPG o con BSO contra: JNK fosforilado, c-Jun, p53 y las proteínas Cip/Kip p21^{cip1} y p27^{kip1}. Los resultados son representativos de tres experimentos diferentes para cada una de las condiciones estudiadas.

2. PAPEL DEL ÓXIDO NÍTRICO.

2.1. Determinación de la presencia de las tres isoformas de NOS en la glándula mamaria de rata lactante.

El óxido nítrico es sintetizado a partir de la oxidación secuencial de L-arginina en una reacción catalizada por las oxido nítrico sintasas (NOS) que emplean NAPH y O₂ como cosubstratos. Dos de estas tres isoformas se expresan de forma constitutiva en las células, y son Ca²⁺-dependientes. Se denominan nNOS y eNOS y actúan vía la guanilato ciclasa activando cascadas de transducción de la señal. Existe una NOS inducible (iNOS) que se expresa de forma constitutiva en determinados tejidos, pero que mayoritariamente se sintetiza en respuesta a mediadores proinflamatorios.

La existencia de actividad NOS en la glándula mamaria fue descrita por primera vez por Thomsen y cols. (1995) en humanos y por Lacasse y cols. (1996) en el tejido mamario de cabras y vacas. El primer estudio, describía que la actividad NOS era detectable únicamente en tumores invasivos, si se comparaba con tumores benignos o tejido normal; en él se decía que la inmunoreactividad frente a iNOS se daba predominantemente en macrófagos asociados al tumor, mientras que nNOS se observaba en células endoteliales y mioepiteliales. En el segundo estudio nombrado, la actividad eNOS únicamente se detectó en el endotelio vascular y el epitelio secretor de las dos especies. No obstante, en estudios posteriores se ha demostrado la producción de óxido nítrico y la existencia de las tres isoformas de NOS en la glándula mamaria de rata (Onoda e Inano, 1998). Estos autores, mediante inmunohistoquímica, localizaron iNOS en las células mioepiteliales de la membrana basal de los alvéolos y los conductos galactóforos así como en las células endoteliales de los vasos sanguíneos que riegan este tejido, si bien únicamente observaron una expresión basal de iNOS que posiblemente se encuentre de forma constitutiva en la glándula mamaria, como ya se ha observado que ocurre en el riñón de ratas control (Morrissey y cols., 1994). eNOS presentó exactamente el mismo patrón que iNOS; sin embargo la tercera isoforma, nNOS, únicamente se localizó en la membrana basal de los alvéolos y su señal era mucho más débil que en los casos anteriores.

2.1.1. Determinación por RT-PCR de las tres isoformas.

Como se observa en la **figura 15**, la expresión del mRNA de eNOS, iNOS y nNOS ha sido determinada por RT-PCR empleando cebadores específicos para cada una de las tres isoformas, obteniéndose bandas del tamaño esperado en cada caso (424, 550 y 620 pb, respectivamente). Hemos podido determinar la existencia de transcritos de NOS no sólo en el tejido mamario, sino también en los acini aislados por tratamiento con colagenasa (ver material y métodos) de ratas lactantes control.

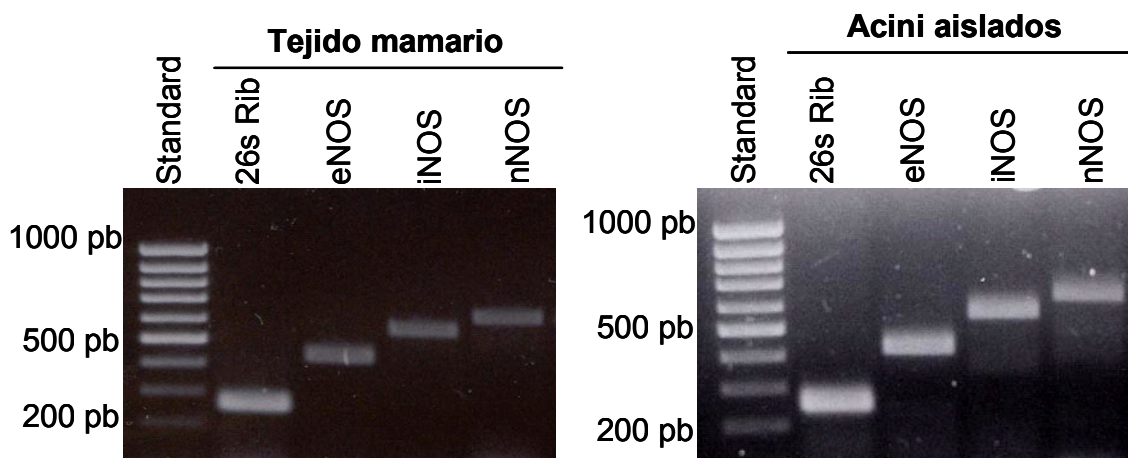


Figura 15. Expresión del mRNA de eNOS, iNOS y nNOS en glándula mamaria de rata lactante. *Mediante RT-PCR se ha determinado la presencia de transcritos de las tres isoformas de NOS en el tejido mamario de ratas lactantes control así como en las células secretoras aisladas de dicho tejido.*

2.1.2. Determinación de las isoformas de NOS en la glándula mamaria por inmunotransferencia.

Las isoformas de iNOS (122 kDa) y eNOS (152 kDa) que han inmunoreaccionado con los anticuerpos anti-iNOS y anti-eNOS, respectivamente, se han detectado en extractos de glándula mamaria de rata lactante control, así como en acini aislados de la misma (**figura 16**). En ambos casos aparecen algunas bandas inmunoreactivas más; esto podría deberse a productos de degradación de iNOS y eNOS, producidos durante la preparación de las muestras debido a la presencia de proteasas. En

el caso de nNOS, la expresión de esta isoforma es mucho menor en el tejido mamario teniéndose que recurrir a condiciones de incubación del anticuerpo primario de 24 horas así como a tiempos de exposición muy prolongados; por todo ello, es de suponer que las cantidades de esta proteína que se expresan en este tejido son ínfimas y su contribución a la síntesis de NO constitutivo, mínima.

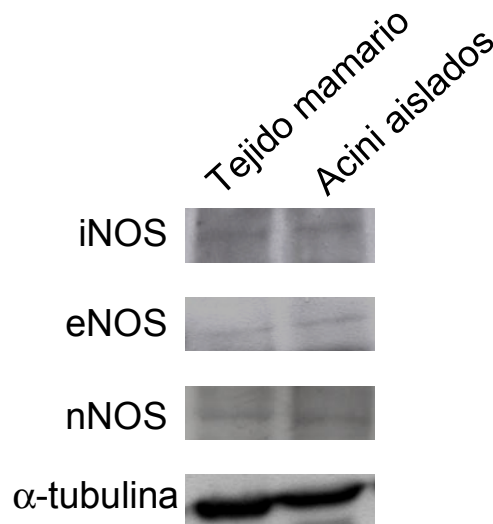


Figura 16. Análisis mediante inmunotransferencia de las tres isoformas de NOS. Los extractos totales de proteínas (20µg de proteína/ pocillo) aislados de tejido mamario de ratas en el pico de la lactancia o de acini aislados de ratas lactantes fueron analizados mediante inmunotransferencia utilizando los siguientes anticuerpos: iNOS, eNOS y nNOS. La α-tubulina se empleó como control de carga.

2.2. Modificaciones en los niveles de proteína de las distintas isoformas de NOS durante la involución de la glándula mamaria y tras el tratamiento con BSO.

Los niveles de proteína que han reaccionado frente al anticuerpo contra iNOS están notablemente aumentados 8 horas después de separar las crías de la madre (**figura 17**), mientras que la expresión de eNOS es aparentemente menor en el control que en el destete de 24 horas. Algo similar ocurre tras el tratamiento de ratas lactantes con BSO durante dos días, si bien el aumento en iNOS no es tan elevado. Esta disminución en la regulación de eNOS por iNOS ya ha sido descrita en estudios previos; no sólo para

eNOS en cultivos de células endoteliales de venas coronarias bovinas (Lu y cols., 1996) y células glomerulares de rata (Schwartz y cols., 1997) sino también para nNOS en el músculo esquelético de cobaya. Es posible que se produzca una autoinhibición por el NO a través de complejas interacciones entre las distintas isoformas de NOS.

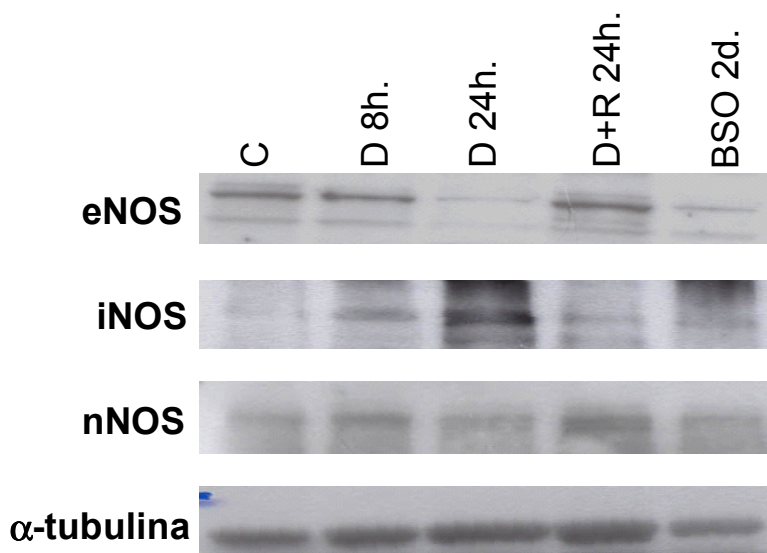


Figura 17. Análisis por inmunotransferencia de los niveles de las distintas isoformas de NOS en glándula mamaria de rata lactante en distintas situaciones. *Extractos totales de proteínas (50µg de proteína/ pocillo) aisladas de tejido mamario de ratas lactantes control (C), sometidas a destete de 8 y 24 horas (D 8h y D 24h, respectivamente), sometidas a destete de 24h y posterior resucción (D+R 24h) y tratadas con BSO fueron empleados para hacer una inmunotransferencia con anticuerpos específicos contra eNOS, iNOS y nNOS. La α-tubulina se empleó como control ya que sus niveles no varían en las distintas situaciones estudiadas. La figura es representativa de tres experimentos diferentes.*

2.3. Determinación de nitritos por fluorescencia en la glándula mamaria.

El NO producido se ha determinado cuantificando sus metabolitos, nitrato y nitrito en el tejido mamario. La cantidad de NO producido por la glándula mamaria en el pico de la lactancia es considerablemente inferior al NO producido en dicho tejido durante la involución del mismo, como se observa al determinar por fluorescencia la

cantidad de nitrito formado a partir del NO. Al separar las crías de la madre se produce un aumento en la producción de NO, viéndose disminuido si se produce la resucción por parte de las crías y la lactancia continua. Este aumento en la secreción de NO en la glándula mamaria también ocurre si se trata a la rata lactante con BSO, aunque en menor medida que tras un destete.

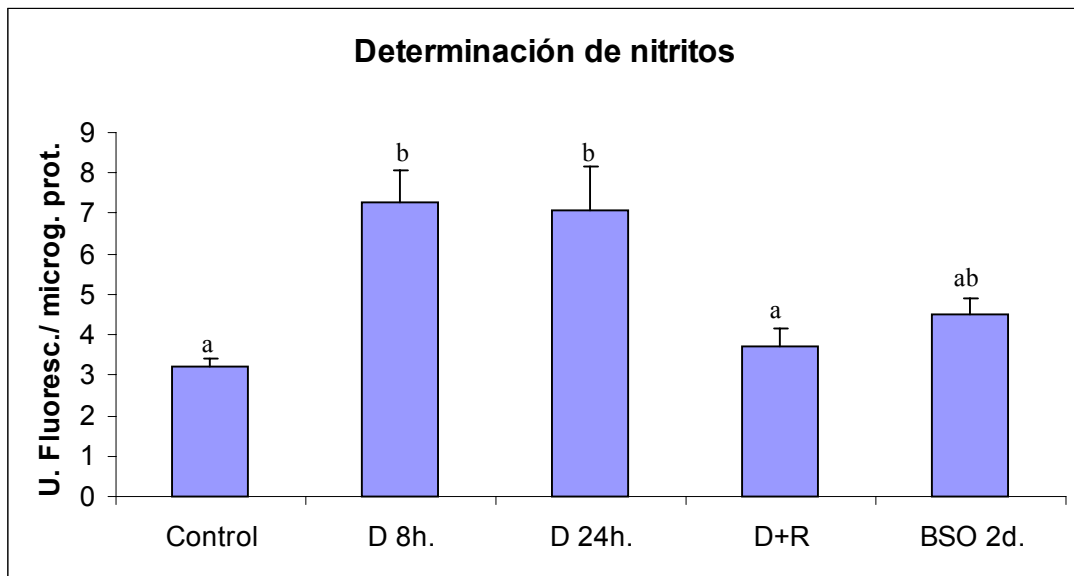


Figura 18. Niveles de nitritos determinados por fluorescencia en glándula mamaria. La cantidad de NO producida por la glándula mamaria de ratas lactantes control, sometidas a destete de 8 y 24 horas o a destete y posterior resucción y de ratas lactantes tratadas con BSO ha sido determinada al cuantificar los niveles de nitratos y nitritos, productos del metabolismo del NO. Como se observa en el gráfico, la producción de NO está significativamente aumentada tras el destete y revierte a valores control después de la resucción.

2.4. Nitración de proteínas.

Una de las consecuencias de la producción de NO es la formación de especies derivadas más reactivas, tales como el peroxinitrito (ONOO^-), generado por la reacción del NO con el radical superóxido. A su vez, el peroxinitrito formado puede reaccionar con residuos de tirosina, produciendo la nitración de determinadas proteínas lo que conlleva a una alteración de la función de estas proteínas nitradas en las diferentes vías de transducción en las que están implicadas (Greenacre y Ischiropoulos, 2001).

Anteriormente se ha determinado que durante la involución de la glándula mamaria, al separar las crías de la madre, se produce un aumento de iNOS y por tanto una mayor producción de NO en el tejido mamario. La consecuencia directa de este aumento de NO es la nitración de proteínas, al añadir un grupo NO_2^+ a un residuo de tirosina. Mediante inmunotransferencia hemos observado que tras el destete se induce la nitración de residuos de tirosina en diferentes proteínas (**figura 19**).

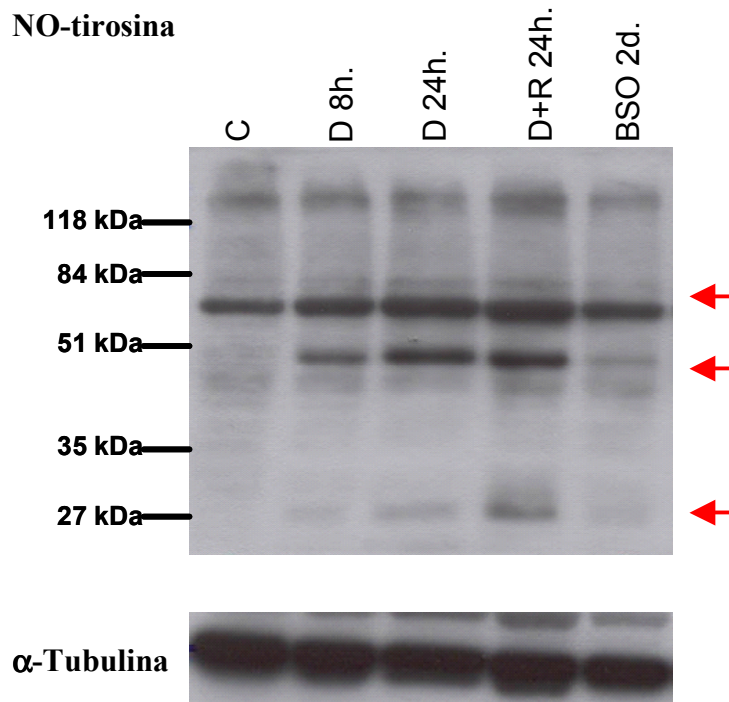
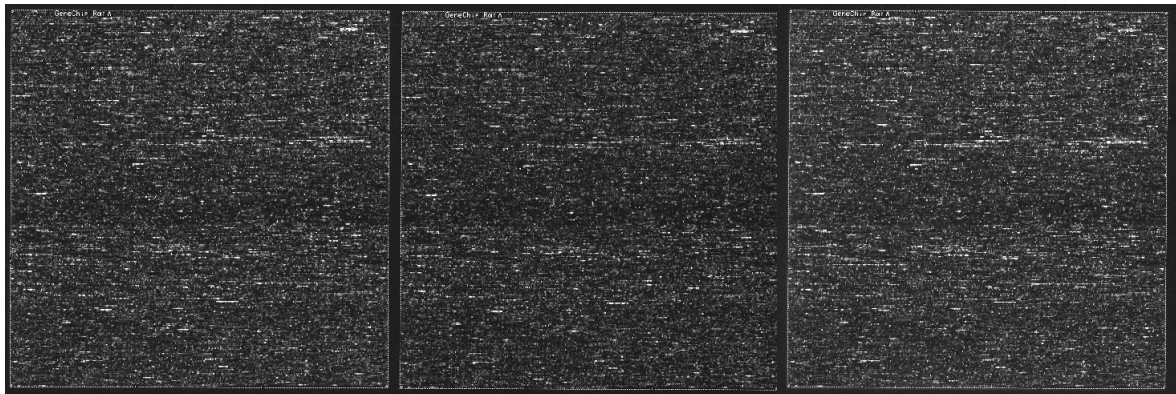


Figura 19. Análisis por inmunotransferencia empleando un anticuerpo contra nitrotirosina de extractos de proteína total de glándula mamaria en distintas condiciones. Los extractos totales de proteínas (50µg proteína /pocillo) de glándula mamaria de rata lactante control (C), sometida a destete de 8 y 24 horas (D8h. y D24h), a destete de 24 horas y posterior reducción (D+R 24h.) y tratadas con BSO se sometieron a electroforesis de poliacrilamida-SDS y se realizó la detección con un anticuerpo anti-nitrotirosina. El anticuerpo contra la α-tubulina se empleó como control de carga.

3. ESTUDIOS DE PATRONES DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE MICROARRAY CHIPS.

Dado que los cambios observados durante el destete, que conducen a la muerte de las células epiteliales y a una remodelación de la glándula mamaria, también se producen cuando la disponibilidad de GSH en este tejido está disminuida hemos querido determinar los patrones de expresión génica que pueden sufrir cambios en el tejido mamario durante la involución del mismo. Para definir estos cambios transcripcionales hemos empleado cDNA “microarrays”, que nos han permitido comparar los mRNAs de acini aislados de glándula mamaria de ratas lactantes control, de ratas sometidas a un destete de 8 horas y de ratas tratadas con PPG.



Control

Destete 8h.

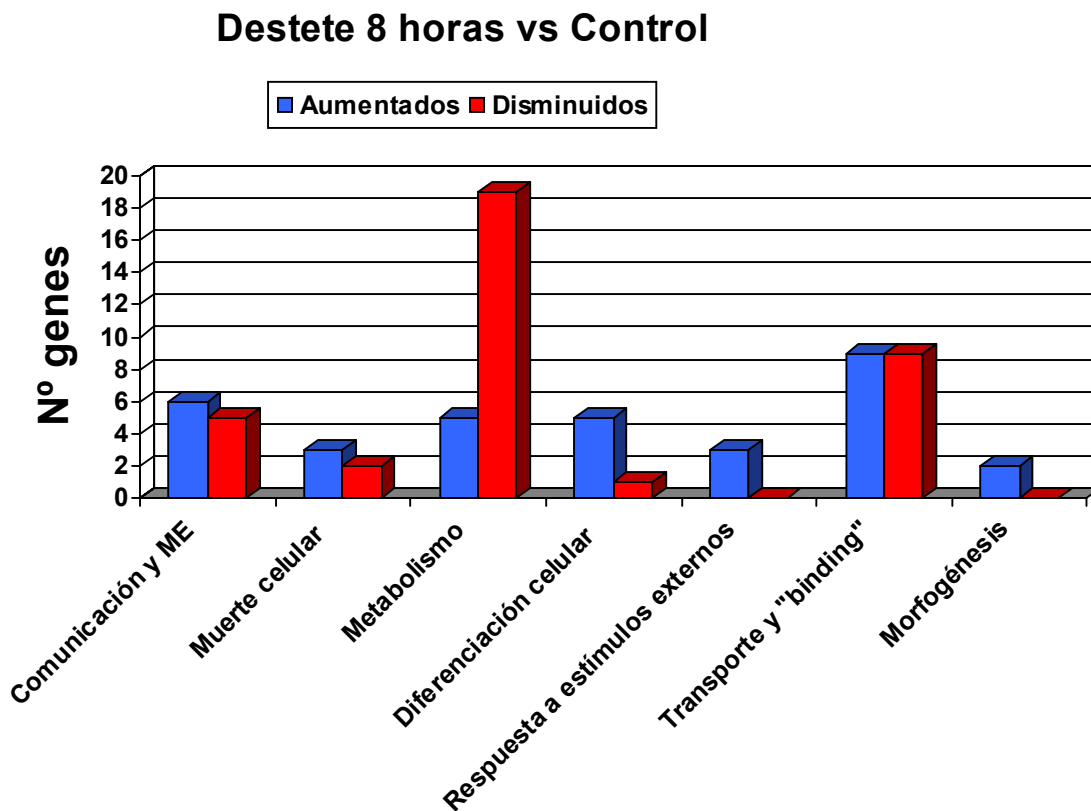
PPG 3d.

Figura 20. Imagen representativa de tres microarrays realizados para el estudio de los patrones de expresión de las distintas condiciones. *Los “gene chips” de Affymetrix se han utilizado para comparar ~9000 transcritos en acini aislados de glándula mamaria de rata lactante (control), de rata sometida a un destete de 8 horas y de rata tratada con PPG. Se han realizado tres experimentos de cada una de las condiciones.*

3.1. Clasificación de los genes que se expresan diferencialmente en el destete de 8 horas o tras el tratamiento con PPG.

RNA total de acini aislados de glándula mamaria se sometió a la técnica del “Microarray chip” para estudiar cambios en la expresión de genes que ocurren en este

tejido a las 8 horas de destete, cuando la acumulación de leche y determinados factores hormonales favorecen la apoptosis de los acini y la involución de la glándula mamaria. Del mismo modo, también se ha querido estudiar los cambios en la transcripción de genes en la glándula mamaria de ratas tratadas con PPG, ya que, como se ha visto anteriormente, este inhibidor de la γ -cistationasa hepática también induce la apoptosis en los acini de la glándula mamaria. Así pues, esta técnica permite comparar cada una de las dos situaciones con el patrón de expresión existente en los acini de la glándula mamaria de una rata en el pico de la lactancia (control). En cada uno de los análisis realizados, únicamente aquellos genes cuyos niveles de mRNA aumentaron o disminuyeron 1.5-veces o más con respecto al control, en los tres experimentos, se consideraron como genes con una expresión diferencial. De los 9000 genes existentes en el array, únicamente varió la expresión de aproximadamente un 2-3%. El listado de estos genes fue procesado empleando un software específico “NetAffyx Análisis center” de Affymetrix, que permite la clasificación de los genes estudiados según el proceso biológico en el que están implicados (**figura 21**).



PPG vs Control

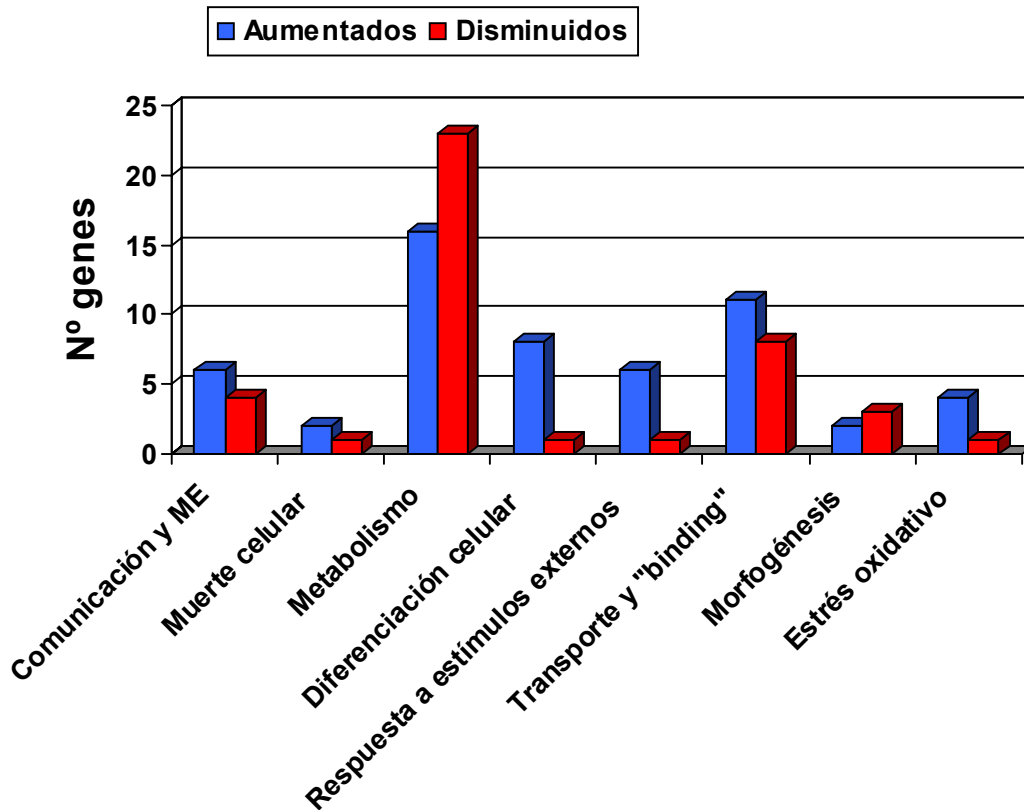


Figura 21. Clasificación según el proceso biológico, de aquellos genes que se expresan diferencialmente en el destete de 8 horas y el tratamiento con PPG frente al control.

El resultado del análisis queda plasmado en las siguientes tablas en las que se han clasificado los genes que están aumentados o disminuidos en función del proceso biológico y de la tasa de variación, tanto en la comparación entre un destete de 8 horas y un control lactante (tabla 4) como en el tratamiento con PPG frente a un control (tabla 5).

Tabla 4.- Cambios en los niveles de transcripción de genes concretos tras el destete de 8 horas. Clasificación de genes que se encuentran aumentados o disminuidos más de 1.5 veces comparando el destete de 8 horas con respecto al control, en los tres experimentos realizados de forma independiente. Los genes subrayados varían su expresión tanto en el destete como en el tratamiento con PPG.

- * Genes aumentados entre 1-2 veces. ■ * Genes disminuidos entre 1-2 veces.
- ** Genes aumentados entre 2-3 veces. ■ ** Genes disminuidos entre 2-3 veces.
- *** Genes aumentados más de 3 veces. ■ *** Genes disminuidos más de 3 veces.

Proceso biológico	Aumentados	Disminuidos
Comunicación y matriz extracelular	-Protein kinase C, delta*	-Syndecan 2*
	<u>-Villin 2*</u>	-Tenascin C*
	-GTP-binding protein (G-alpha-i2)*	<u>-Reversión inducida LIM gene***</u>
	-Occludin**	-Cholinergic receptor, muscarin 4***
	-Latexin**	-Transferrin receptor***
	-Claudin 3**	

Muerte celular	-Caspasa 6*	-Akt 1*
	-Programmed cell death 10; apoptosis related protein 15***	
	<u>-CD 14 antigen***</u>	

Metabolismo	-Myristoylated alanine rich protein kinase C substrate*	-Akt 1*
	<u>-Hairly and enhancer of split 1 (Drosophila) **</u>	<u>-Dihydrolipoamide acetyltransferase*</u>
	<u>-Activating transcription factor 3**</u>	<u>-Succinate-CoA ligase, GDP-forming, alpha subunit*</u>
	-Glutamine synthetase 1**	-Carnithine palmitoyltransferase 2*
	<u>-Carbonic anhydrase 2***</u>	-Gamma-glutamyl transpeptidase*
		-Pyruvate dehydrogenase E1 component beta subunit*
		-Prohibitin*
		<u>-Fatty acid synthase*</u>
		<u>-Beta-galactosidase*</u>
		<u>-Ornithine decarboxylase antizyme inhibitor**</u>
		<u>-Glutamate oxaloacetate transaminase 1**</u>
		<u>-Solute carrier family 25, member 1**</u>
		<u>-Ectonucleotide pyrophosphatase/ Phosphodiesterase 2**</u>
		-Pyruvate carboxylase**
		-NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1***
	-Arginase type II***	
	-Fatty acid CoA ligase, long chain 2***	

		<u>-Acetyl-CoA carboxylase**</u>
Proceso biológico	Aumentados	Disminuidos
Crecimiento y diferenciación celular		
	<u>-Kruppel-like factor 4*</u>	-Akt 1*
	-Myeloid associated differentiation marker*	
	-Lyn protein non-receptor kinase*	
	-Dual specificity phosphatase 6*	
	<u>-Nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha*</u>	
Respuesta a estímulos externos	<u>-MHC class Ib RT1 gene, locus M3 (RT1-M3)*</u>	
	-MHC class Ib RT1.S3**	
	-MHC class I mRNA***	
Transporte y <i>binding</i>	-Hemoglobin, alpha 1*	<u>-Solute carrier family 1, - member 2*</u>
	-Hemoglobin beta chain complex*	-Solute carrier family 5, member 1*
	-ATP-binding cassette, subfamily D, member 3*	<u>-Golgi SNAP receptor complex member 2*</u>
	-Mucin 1*	-Translocase of inner mitochondrial membrane*
	<u>-Zinc finger protein 36*</u>	-Guanine nucleotide binding protein, beta 4 subunit*
	-Adenylate kinase 3**	-FK506 binding protein 4
	-Cellular retinoic acid binding protein 2***	<u>-p105 coactivator*</u>
	-Cytoplasmic linker 2***	-Fatty acid binding protein 3***
	<u>-Brain acidic membrane protein 1***</u>	-ATPase, Ca²⁺ transporting, plasma membrane 2***
Morfogénesis	<u>-Heat shock protein 90*</u>	
	-Transforming growth factor, beta 3***	

Tabla 5.- Cambios en los niveles de transcripción de genes concretos tras el tratamiento con PPG. Clasificación de genes que se encuentran aumentados o disminuidos más de 1.5 veces comparando el tratamiento con PPG con respecto al control, en los tres experimentos realizados de forma independiente. Los genes que aparecen subrayados son comunes al tratamiento con PPG y al destete.

Proceso biológico	Aumentados	Disminuidos
Comunicación y matriz extracelular	-Diphtheria toxin receptor*	-Actinin alpha 2 associated LIM protein*
	-Occludin*	-Collagen, type 1, alpha 1*
	<u>-Villin 2*</u>	-Integral membrane associated protein 1**
	-Sortilin 1*	<u>-Reversión induced LIM gene***</u>
	-Protein kinase C-like 1**	
	-Decorin**	

Muerte celular	-Matrix metalloproteinase 14*	-Defender against cell death 1 (dad1)*
	<u>-CD 14 antigen**</u>	

Crecimiento y diferenciación celular	-Interferon regulatory factor 1*	-Transcription elongation factor (SIII) polypeptide 2*
	<u>-Kruppel-like factor 4*</u>	
	-Thymosin beta-4*	
	-Immediate early gene transcription factor NGFI-B*	
	<u>-Nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha*</u>	
	-Mitogen activated protein kinase kinase kinase 12**	
	-v-myc***	
<u>-Jun D proto-oncogene***</u>		

Respuesta a estímulos externos	<u>-MHC class Ib RT1 gene, locus M3 (RT1-M3)*</u>	-Thymus cell antigen 1**
	-Complement receptor related protein*	
	-CD74 antigen*	
	-MHC class II RT1.u-D-alpha chain*	
	-Complement component 1, q subcomponent**	
-MHC class Ib RT1.S3**		

RESULTADOS

Proceso biológico	Aumentados	Disminuidos
Metabolismo	-Mannosyl-glycoprotein beta-1,2-N-acetyl glucosaminyltransferase*	- <u>Succinate-CoA ligase, GDP-forming, alpha subunit*</u>
	-Cytosolic cysteine dioxygenase 1*	- <u>Ornithine decarboxylase antizyme inhibitor*</u>
	-Phosphatidate phosphohydrolase type 2a*	-Aldo-keto reductase family 1, member A1*
	-Peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase*	-Cytochrome c oxidase, subunit VIIIa*
	- <u>Activating transcription factor 3*</u>	- <u>Glutamate oxaloacetate transaminase 1*</u>
	-Early growth response 1*	-Transketolase*
	- <u>Hairy and enhancer of split 1 (Drosophila)**</u>	-Gamma-glutamyl carboxylase*
	-p21-activated kinase 2**	-Alkaline phosphatase*
	-Guanine deaminase**	-Sepiapterin reductase*
	-Acetyl-CoA dehydrogenase, long-chain**	-Stearoyl-CoA desaturase 2*
	-GTP cyclohydrolase 1**	-Aldolase C**
	-Cysteine-sulfinatase decarboxylase**	- <u>Dihydrolipoamide acetyltransferase**</u>
	-2,4-Dienoyl CoA reductase 1, mitochondrial***	-Acetyl-CoA C-acetyltransferase**
	-Carnitine palmitoyltransferase 1, liver***	-Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II**
	-Sulfotransferase family 1A, member 1***	- <u>Fatty acid elongase**</u>
	-Acyl-CoA: dihydroxyacetonephosphate acyltransferase***	- <u>Ectonucleotide pyrophosphatase/Phosphodiesterase 2**</u>
		-Phospholipase A2, group VI**
		-Phosphoglycerate kinase 1***
		-Farensyl diphosphate synthase***
		- <u>Solute carrier family 25, member 1***</u>
		-Sterol-C4-methyl oxidase-like***
		-Galactose-4-epimerase, UDP***
		-Stearoyl-CoA desaturase 1***
		- <u>Acetyl-CoA carboxylase***</u>

Proceso biológico	Aumentados	Disminuidos
Morfogénesis	-Heat shock protein 90*	-Actin alpha 1***
	-Transforming growth factor, beta 1*	-Actin gamma 2***
		-Transgelin***
Transporte y <i>binding</i>	-Apolipoprotein E*	-Clathrin-associated protein 17*
	-Zinc finger protein 36*	-Solute carrier family 9, member 4*
	-Adenylate kinase 3*	-Golgi SNAP receptor complex member 2*
	-Fatty acid binding protein 4*	-Phosphatidylethanolamine binding protein*
	-GTP-binding protein*	-Solute carrier family 1, member 2**
	-Metallothionein*	-p105 coactivator**
	-Lectin, galactose binding, soluble 3*	-Endoplasmic reticulum protein 29**
	-Brain acidic membrane protein 1**	-Oncomodulin***
	-Cold inducible RNA-binding protein**	
	-Aquaporin 3***	
	-Solute carrier family 17 (vesicular glutamate transporter)***	
Estrés oxidativo	-Catalase*	
	-Glutathione peroxidase 3*	-Glutathione peroxidase 1***
	-Glutathione S-transferase, alpha 1**	
	-Microsomal glutathione S-transferase 1***	

■ * Genes aumentados entre 1-2 veces.

■ * Genes disminuidos entre 1-2 veces.

■ ** Genes aumentados entre 2-3 veces.

■ ** Genes disminuidos entre 2-3 veces.

■ *** Genes aumentados más de 3 veces.

■ *** Genes disminuidos más de 3 veces.

DISCUSIÓN

1. LA INVOLUCIÓN DE LA GLÁNDULA MAMARIA DE RATA LACTANTE COMO MODELO DE APOPTOSIS: IMPORTANCIA DEL FLUJO INTERTISULAR DE GSH.

El mantenimiento de la diferenciación del epitelio mamario y de la producción de leche durante la lactancia es una consecuencia de la succión de la leche por parte de las crías y de la presencia de hormonas lactogénicas, particularmente prolactina, insulina, glucocorticoides, hormona del crecimiento y estrógenos.

Tras el destete los cambios de estas hormonas lactogénicas y la acumulación de leche conducen a la involución de la glándula mamaria, un proceso fisiológico que se caracteriza principalmente por tres eventos: i) cesa la síntesis de macromoléculas y la expresión de genes que codifican proteínas de la leche, ii) pérdida de células epiteliales por apoptosis y iii) remodelación del tejido y preparación de la glándula mamaria para un nuevo embarazo (Marti y cols., 1999; **figura 22**).

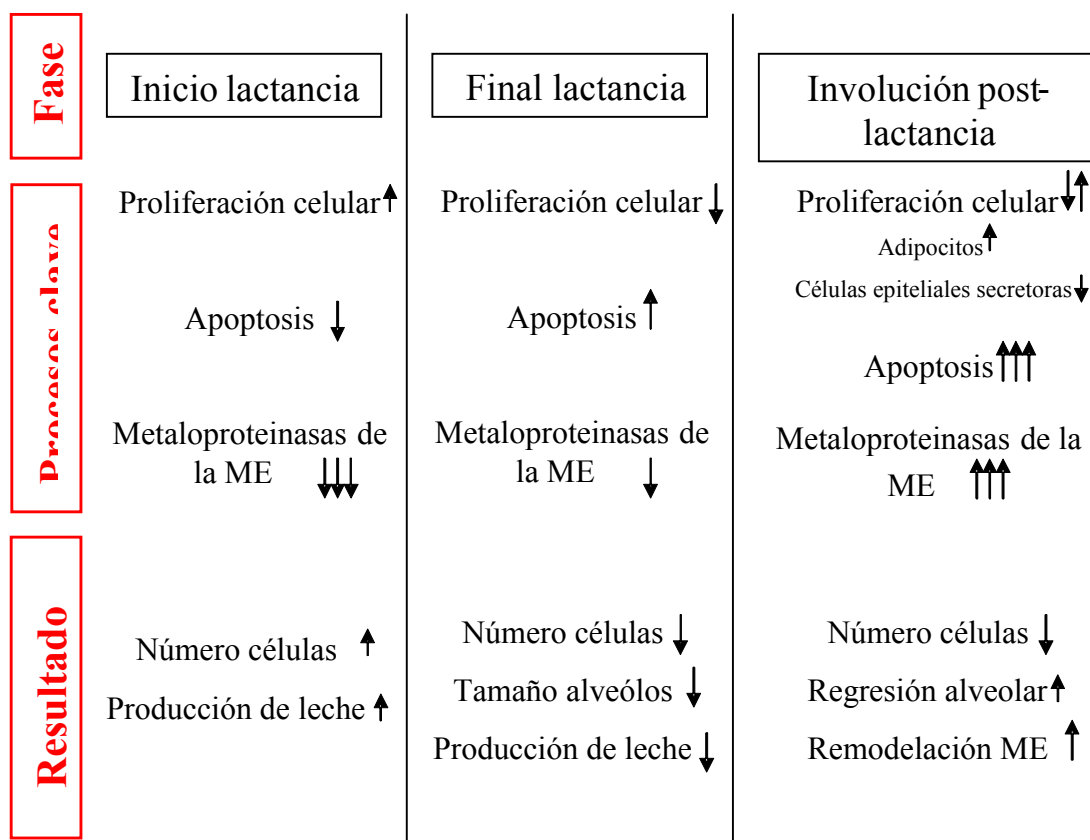


Figura 22. Procesos clave en el desarrollo y la remodelación del tejido mamario durante la lactancia y en la involución. Las flechas indican la actividad relativa de los procesos entre las distintas fases. ME: Matriz extracelular.

Durante la involución de la glándula mamaria un 90% del epitelio mamario muere por apoptosis y los adipocitos reemplazan dicho tejido. Walker y sus colaboradores (1989) demostraron que la involución del tejido mamario tanto en rata como en ratón se acompaña de una ruptura de la cromatina en fragmentos oligonucleosomales, una de las características bioquímicas de la apoptosis (Wyllie y cols., 1980). Dado que el destete produce la involución de la glándula mamaria hemos querido confirmar que en nuestro modelo también se produce muerte de los acini por apoptosis, para lo cual, realizamos una electroforesis del DNA genómico aislado del tejido mamario de ratas lactantes y ratas sometidas a destete de diferentes horas. Como se observa en la **figura 9**, a las 8 horas de producirse el destete ya existe fragmentación del DNA debido a la activación de nucleasas por acción de las caspasas, lo que genera el típico patrón en escalera del DNA.

Se han descrito dos vías diferentes de apoptosis, la vía de los receptores de membrana y la vía mitocondrial. Las mitocondrias están implicadas en el proceso apoptótico, ya que se producen una serie de cambios en el potencial de membrana y en la membrana mitocondrial externa que aumentan la permeabilidad de la misma (Kroemer y cols., 1997), favoreciendo la salida de proteínas mitocondriales, como el citocromo c y determinadas procaspasas, al citoplasma. Este proceso es inhibido por la presencia de proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 (Zamzami y cols., 1998). El citocromo c liberado forma un complejo con factores citoplasmáticos y activa la caspasa-9, que a su vez desencadenará la activación de otras caspasas, lo que constituye la fase efectora de la apoptosis. En este contexto, podemos considerar la liberación de citocromo c como un marcador específico de la vía mitocondrial en la PCD (Zamzami y cols., 1998; Gómez-Lechón y cols., 2002). En nuestro modelo hemos observado que a partir de 2 horas de destete esta proteína se detecta en extractos citosólicos de glándula mamaria (**figura 8**) lo que nos permite implicar a la vía mitocondrial en el proceso de apoptosis de las células secretoras del tejido mamario. La liberación de citocromo c es un proceso muy rápido; Renz y cols. (2001) han detectado la presencia de esta proteína en el medio de cultivo una hora después de la inducción de la apoptosis en células Jurkat. En nuestro caso, este proceso precede a los cambios que acontecen a nivel nuclear ya que ocurre a las dos horas de iniciado el destete, mientras que la escalera de DNA no se observa hasta las 8 horas por lo que la liberación de citocromo c puede considerarse como un marcador temprano de PCD.

Un adecuado abastecimiento de GSH a la glándula mamaria es esencial durante la lactancia. En este período, la glándula mamaria necesita cantidades elevadas de L-cisteína que deben ser abastecidas a través del torrente sanguíneo, ya que la glándula no expresa y no tiene actividad γ -cistationasa. Sin embargo, los valores de captación de L-cisteína y de L-cistina por la glándula mamaria son mucho más bajos que la disponibilidad y utilización de GSH total por este tejido, por lo que podemos decir que el GSH es la fuente más importante de L-cisteína (Barber y cols., 1999). Existen datos que evidencian que la utilización de GSH en la glándula mamaria lactante está mediada por la GGT (Baumrucker y cols., 1981). Existe una relación inversa entre las actividades de la GGT y de la γ -cistationasa, por lo que se produce un flujo intertisular de GSH desde los tejidos con baja actividad de la GGT hacia el plasma, y de este compartimiento hacia los tejidos con alta actividad de la GGT (**figura 7**). La glándula mamaria durante la lactancia presenta la actividad de la GGT muy incrementada y sin embargo no se detecta actividad para la γ -cistationasa, por lo que el GSH plasmático debe ser utilizado por la GGT y los aminoácidos generados transportados al interior celular, donde se emplearan en la síntesis de proteínas y de GSH intracelular (**figura 6**). Tras el destete, la actividad de la GGT en la glándula mamaria desciende a valores significativamente menores que en ratas lactantes control (Viña y cols., 1981) y, por tanto, la utilización de GSH y el abastecimiento de L-cisteína estarán disminuidos durante la involución de la glándula mamaria.

Existen numerosos estudios que destacan el papel del estrés oxidativo y los radicales libres en la inducción de la apoptosis; la generación de estos últimos o la depleción de antioxidantes en la célula inducen apoptosis (Polyak y cols., 1997). Es interesante destacar que estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado, empleando la glándula mamaria durante el destete como un modelo *in vivo* de apoptosis, que existe un daño oxidativo en el DNA mitocondrial (mtDNA) más elevado en células apoptóticas que en control (Esteve y cols., 1999). De igual forma, los niveles de GSSG en las mitocondrias de la glándula mamaria también están elevados en la apoptosis y se ha demostrado la existencia de una relación directa entre la oxidación del mtDNA y el cociente GSSG/GSH mitocondrial, por lo que podemos considerar que el estrés oxidativo mitocondrial juega un papel clave en la inducción de la maquinaria apoptótica (Esteve y cols., 1999). El cociente GSSG/GSH en muestras de tejido, también es un

indicador de estrés oxidativo; cuando se estudia dicho cociente en la glándula mamaria, los valores están elevados durante el destete con respecto a los valores en el pico de la lactancia y la oxidación del GSH precede a la fragmentación del DNA nuclear (Hall, 1999).

El GSH es necesario para el mantenimiento de la producción láctea (Barber y cols., 1999); en la presente tesis se ha demostrado que, cuando se produce una disminución *in vivo* en la disponibilidad de GSH en la glándula mamaria (**tabla 1**), bien por inhibición de la transulfuración hepática, empleando un inhibidor irreversible de la γ -cistationasa, el PPG, o bien por inhibición de la γ -glutamylcisteína sintetasa con BSO, la producción de leche cae significativamente (**tablas 2 y 3**) y las células secretoras del tejido mamario mueren por apoptosis, al igual que ocurre tras un destete forzado, como hemos comprobado al determinar que existe fragmentación del DNA tras el tratamiento con PPG o con BSO (**figura 9**) y que se produce la salida de citocromo c al citosol en ratas tratadas con PPG (**figura 8**). Estos resultados resaltan la importancia de la disponibilidad de GSH en la glándula mamaria no sólo como fuente de L-cisteína, necesaria para el mantenimiento de la lactancia, sino también para el mantenimiento de los grupos tioles de las proteínas y por su papel antioxidante *per sé* ya que al inicio de la apoptosis se genera una mayor cantidad de peróxidos en la mitocondria (Esteve y cols., 1999) y de otras especies altamente reactivas que pueden ser neutralizadas por los antioxidantes celulares como el GSH. En la literatura, existen evidencias que relacionan los niveles de GSH y la apoptosis (Pias y Aw, 2002). En distintos modelos *in vitro* se ha observado que la disminución de los niveles de GSH empleando BSO, que inhibe la síntesis intracelular de GSH, conduce a la liberación del citocromo c mitocondrial, a una mayor producción de ROS y a la apoptosis de la célula, por lo que el mantenimiento de la homeostasis redox en la célula es crucial para evitar la PCD, estando implicada la vía mitocondrial (Swamy y Huat, 2003; Honda y cols., 2004).

2. CAMBIOS GÉNICOS QUE SE PRODUCEN EN LA GLÁNDULA MAMARIA DURANTE LA INVOLUCIÓN Y CUANDO EXISTE UN DÉFICIT DE GSH EN RATAS LACTANTES.

2.1. Cambios en la expresión de p53 y genes relacionados.

La involución que se produce en la glándula mamaria tras la lactancia es un fenómeno muy bien caracterizado, por lo que proporciona un excelente sistema para estudiar la expresión y función de los genes que regulan el proceso de apoptosis. La involución del tejido mamario tiene lugar a través de dos etapas diferentes; en la primera se produce la muerte celular programada de las células alveolares, pero no existe remodelación de la estructura lóbulo-alveolar. Durante la segunda fase la estructura lóbulo-alveolar de la glándula desaparece, ya que distintas proteasas degradan la membrana basal y la matriz extracelular (Lund y cols., 1996; Li y cols., 1997a). En ambas etapas se producen cambios característicos en la expresión de determinados genes que coordinan cada uno de estos procesos. Al acumularse leche en el tejido se induce la expresión de los genes denominados de respuesta inmediata (e.g. myc, fos o jun) y de genes asociados al ciclo celular. En la primera fase existen cambios en la expresión de p53 y bax (Quarrie y cols., 1996; Jerry y cols., 1999). Tras la fase inicial de la apoptosis aumenta la expresión de las metaloproteinasas y existen cambios en la expresión de la estromelisin-1 y del TIMP-2 (Quarrie y cols., 1996), todo esto marca una segunda fase de la involución que permite la remodelación de la arquitectura ductal (Lund y cols., 1996).

El p53 juega un papel importante en la regulación de la apoptosis, sin embargo, el papel del p53 en la involución de la glándula mamaria no está del todo esclarecido, ya que la involución ocurre normalmente en ratones “knockout” para p53 (Chapman y cols., 1999) si bien sucede más tardíamente, lo que sugiere que existe un mecanismo independiente de p53 en la involución definitiva e irreversible del epitelio mamario (Jerry y cols., 2002). El gen p53 se encuentra transcripcionalmente activado durante la involución de la glándula mamaria. En las **figuras 10 y 11** la expresión de p53, valorada mediante RT-PCR e inmunotransferencia, confirma estudios previos (Strange y cols., 1992; Quarrie y cols., 1996; Jerry y cols., 1999) en los que la expresión de este gen aumenta tras 24 horas de destete. En la presente tesis se observa como los niveles de p53, tanto a nivel del mRNA como de la proteína, se encuentran aumentados tras un destete de 2 horas y se mantienen elevados en condiciones de destete más prolongadas (**figuras 10 y 11**), por lo que este gen puede ser responsable de los cambios que acontecen al inicio del destete. Es importante destacar que el aumento del p53 en las primeras horas del destete es previo a la degradación del DNA nuclear que comienza a las 8 horas (**figura 9**); el p53 actuaría como un estímulo proapoptótico que puede verse

frenado si las crías reinician la succión favoreciendo el mantenimiento de la lactancia. Todo esto pone de manifiesto que el proceso de apoptosis en el tejido mamario está funcionando continuamente durante la lactancia y que debe existir un equilibrio entre los factores de supervivencia celular y los factores proapoptóticos, de modo que al producirse la interrupción de la lactancia se activarían estos últimos y se desencadenaría la PCD de las células secretoras. Sin embargo, la interrupción de la lactancia no es irreversible; los ratones pueden recuperar la síntesis de leche tras 48h de acumulación de la misma, pero tras 72h la recuperación ya es muy incompleta. Una acumulación de leche prolongada eliminaría la expresión diferencial de genes e induciría apoptosis de las células epiteliales (Wilde y cols., 1997). Por tanto, el que se produzca una recuperación de la lactancia indica que las células supervivientes presentan un potencial para reinducir la expresión de genes, por lo que será el número de células el que determine finalmente hasta que punto se recupera la producción láctea (Stefanon y cols., 2002).

Una diana del p53 es p21, un inhibidor de las kinasas dependientes de ciclinas (Cdks) (El-Deiry y cols., 1993; Muraoka y cols., 2001). Los niveles de p21^{Waf1/Cip1}, tanto a nivel de mRNA como de proteína, aumentan en la glándula mamaria de ratas sometidas a destetes de 2, 4, 8, 24 y 72 horas (**figuras 10 y 11**), con un incremento similar al observado para p53, lo que sugiere que p21 puede ser un gen sobre el que actuaría p53 como factor de transcripción. Esta proteína, junto con p27^{Kip1} que también está incrementada tras el destete (**figura 11**), pertenece a la familia de las proteínas Cip/Kip; el papel exacto que juegan en la apoptosis todavía es desconocido, sin embargo, podrían ser necesarios para la inducción temprana de la misma (Duttaroy y cols., 1997).

Otros genes que también se encuentran activados durante las fases iniciales de la apoptosis son JNK y c-Jun (**figuras 10 y 11**). Se ha descrito una implicación de JNK en la apoptosis durante la involución de la glándula mamaria (Marti y cols., 1999). Una vez activada, esta kinasa puede actuar sobre distintos sustratos, siendo el mayoritario c-Jun, cuya fosforilación por JNK incrementa su actividad; pero además, entre otros sustratos de JNK también encontramos miembros de la familia Bcl-2 (Davison y cols., 2004). Entre los genes que se activan al inicio de la involución se encuentran algunos pertenecientes a las familias de *jun* y *fos*. Las proteínas Fos y Jun, junto con proteínas

de la familia ATF/CREB, forman el factor de transcripción dimérico AP-1 que reconoce y se une a secuencias de DNA específicas, denominadas TRE (TPA response element) o CRE (cAMP response element) que se localizan en la región promotora y/o amplificadora de numerosos genes (Shaulian y Karin, 2001). En la glándula mamaria, la expresión de *jun* y *fos* y la capacidad del factor AP-1 de unirse al DNA están inducidas por señales locales, ya que se ha observado que un destete unilateral, sellando las glándulas mamarias de un lado, es suficiente para producir un aumento en la expresión de AP-1 (Martí y cols., 1999). Tras el destete, numerosos genes pueden verse directamente regulados por el factor de transcripción AP-1; además de miembros de la familia *fos* y *jun*, la estromelina, Bax y la ciclina D son posibles candidatos. De hecho la estromelina, que está regulada por AP-1, es una metaloproteinasa cuya expresión está inducida al final de la involución, en el momento en que se produce la degradación de la matriz extracelular. Sin embargo, AP-1 puede actuar como pro- o antiapoptótico, dependiendo de la composición del dímero, del tipo celular o de la señal inductora de muerte celular (Metcha-Grigoriou y cols., 2001).

Los cambios observados en el p53 y en los genes relacionados durante el destete de diferentes horas también se reproducen al inhibir la vía de la transulfuración hepática con PPG (**figuras 12 y 13**) y al disminuir la disponibilidad de GSH en la glándula mamaria inhibiendo la γ -glutamylcisteína sintetasa, con BSO (**figura 14**). El incremento de p53 y de otras proteínas implicadas en la detención del ciclo celular como p21^{Waf1/Cip1} y p27^{Kip1}, y de proteínas que podrían tener una función proapoptótica como c-Jun y JNK, es menos marcado en ratas tratadas con PPG o con BSO, comparado con el incremento que se produce tras un destete. Sin embargo, sí que es significativo al compararlo con ratas control en el pico de la lactancia y serían estos cambios génicos los responsables de la apoptosis que previamente habíamos detectado. De hecho, en un modelo de apoptosis inducida por trióxido de arsénico se ha visto que se produce una activación de JNK y además, si se deplecionan los niveles de GSH con BSO dicha activación es todavía más acusada (Davison y cols., 2004). Estos resultados resaltan lo importante que es mantener los niveles de GSH en la glándula mamaria durante el periodo de producción de leche para el desarrollo de las crías.

2.2. Estudio de los patrones de expresión génica en la involución de la glándula mamaria mediante “microarray chips”.

En los últimos años la técnica del “microarray” de oligonucleótidos ha demostrado ser una valiosa herramienta para determinar la expresión de varios miles de genes en una sola hibridación. En el año 2000, Master y sus colaboradores emplearon los “microarrays” para identificar diferentes vías metabólicas y procesos celulares durante el desarrollo de la glándula mamaria del ratón (Master y cols., 2000). En nuestro caso hemos empleado los “microarrays” de Affymetrix para investigar la expresión transcripcional de unos 9000 genes al inicio de la involución de la glándula mamaria y tras el tratamiento con PPG.

2.2.1. Genes implicados en la apoptosis.

Anteriormente se ha mencionado que tras el destete se produce apoptosis en la glándula mamaria de rata lactante (Marti y cols., 1999). Por otro lado, en la presente tesis se ha demostrado que la inhibición de la trans-sulfuración hepática con PPG también genera apoptosis; por tanto no es extraño que aparezcan genes implicados en la muerte celular al realizar el análisis genómico con los “microarray”. En el destete encontramos aumentada la **caspasa-6**, una proteasa considerada como “efectora” de la apoptosis así como otras proteínas pro-apoptóticas como el **antígeno CD14** que está implicado en la fase de degradación celular ya que facilita el reconocimiento de la célula apoptótica por los macrófagos encargados de fagocitarla (Platt y cols., 1998). Este descubrimiento está en concordancia con otros estudios (Clarkson y cols., 2004; Stein y cols., 2004) en los que también se ha empleado la técnica del “microarray” de Affymetrix para identificar los genes implicados en la involución de la glándula mamaria. Los resultados obtenidos por ambos grupos ponen de manifiesto la existencia de una respuesta inmune en la glándula mamaria produciéndose un aumento en mediadores proinflamatorios y citokinas durante la involución. Estos mediadores inducen la activación de neutrófilos y macrófagos lo que explicaría el aumento en la expresión de genes como CD14, una proteína de monocitos y macrófagos. En nuestro estudio, tras el tratamiento con PPG también encontramos inducidos determinados genes que codifican para proteínas pro-apoptóticas; vuelve a aparecer el **antígeno CD14**

y también está aumentada una **metaloproteinasa (MMP 14)**, cuya función sería la de degradar la membrana basal y la matriz extracelular durante la remodelación del tejido mamario (Wiseman y Werb, 2002). Otros genes proapoptóticos como **JunD** o **TGF- β 3**, también están incrementados. Por el contrario entre los genes disminuidos encontramos algunos antiapoptóticos o relacionados con la proliferación celular, como el gen **dad-1** (Defender against cell death) y **Akt1** que se encuentran disminuidos tras el tratamiento con PPG y durante la involución de la glándula mamaria tras la separación de las crías (Clarkson y cols., 2004).

2.2.2. Enzimas implicados en el metabolismo lipídico.

Durante la lactancia las adaptaciones fisiológicas y el incremento del flujo sanguíneo hacia la glándula mamaria hacen de este tejido uno de los más activos en la captación de nutrientes circulantes, como puede ser glucosa, triacilglicéridos, ácidos grasos libres y aminoácidos (Robinson y Williamson, 1977; Viña y cols., 1981; Viña y Williamson, 1981; Williamson y cols., 1995; Viña y cols., 2001).

Con la técnica de “microarray” chips se estudia la regulación de la expresión génica de las distintas proteínas involucradas en las diferentes vías metabólicas como es el caso de la glucólisis y lipogénesis *de novo* que son imprescindibles en la glándula mamaria para una lactancia normal. Más del 50% de la D-glucosa captada por la glándula mamaria durante la lactancia se transforma en lípidos mediante la lipogénesis *de novo*, por lo tanto, en este proceso la glucólisis está muy activa (**figura 23**). El L-piruvato formado entra en la mitocondria y mediante el complejo de la piruvato deshidrogenasa (PDH) se transforma en acetyl-CoA. En nuestro estudio hemos visto que la expresión de dos de las enzimas del complejo mitocondrial PDH está disminuida tanto en el destete como en ratas tratadas con PPG (**subunidades PDHE1 y PDHE2**). Es interesante indicar que también está disminuida la expresión de la **piruvato carboxilasa** durante el destete y en ratas tratadas con PPG. Esta enzima es responsable de las reacciones anapleróticas del ciclo de Krebs, proporcionando el oxalacetato suficiente para condensarse equimolecularmente con acetyl-coA y formar citrato, que sale fuera de la mitocondria donde se desdobra en oxalacetato y acetyl-coA para comenzar la síntesis de lípidos. La expresión de la **acetyl-CoA carboxilasa** y del complejo **ácido graso sintasa**, que son el conjunto de enzimas responsables de la

síntesis de palmitoil-CoA desde el acetil-CoA citosólico, también está disminuida tanto en el destete como en ratas en el pico de la lactancia tratadas con PPG. Hemos observado que, pese a que las enzimas reguladoras de la glucólisis y de la lipogénesis *de novo* a partir de glucosa (PDH y acetil-CoA carboxilasa) tienen una regulación a corto plazo por modificaciones covalentes (fosforilación/ desfosforilación), durante la involución de la glándula mamaria se produce una regulación a largo plazo que conlleva la represión en la expresión de los genes que codifican para ambas enzimas.

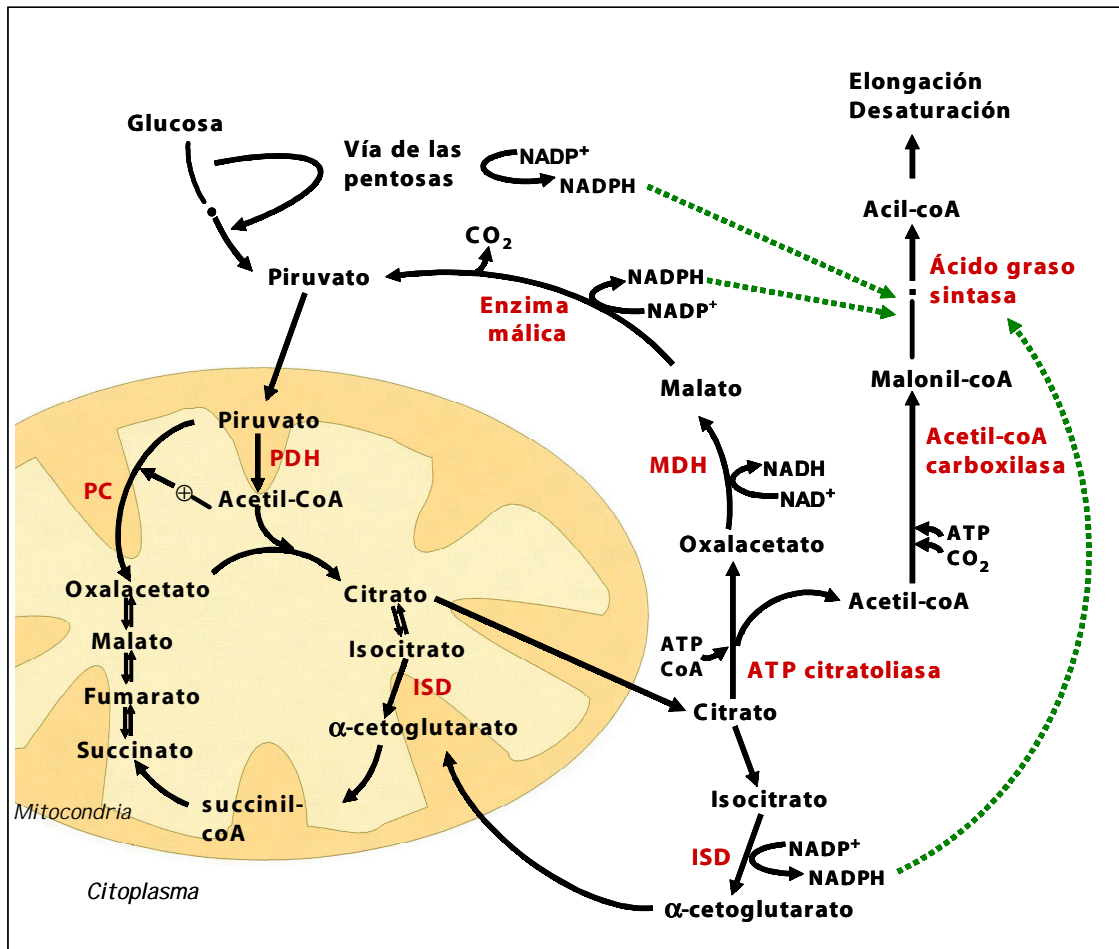


Figura 23. Lipogénesis *de novo* a partir de D-glucosa.

Los ácidos grasos de los triacilglicéridos de la leche pueden originarse a partir de la síntesis *de novo* en la glándula como hemos comentado en el párrafo anterior, siendo el mayor precursor lipogénico la D-glucosa. Los lípidos que no son sintetizados por la glándula tienen diversos orígenes: i) lípidos de la dieta que circulan en forma de quilomicrones, ii) triglicéridos hepáticos secretados en forma de VLDL (este proceso está activado en el pico de la lactancia) y iii) ácidos grasos libres procedentes del tejido adiposo blanco. Los triacilglicéridos circulantes (quilomicrones y VLDL) se dirigen

específicamente hacia la glándula mamaria durante la lactancia ya que el aumento del cociente prolactina/progesterona en sangre hace que la expresión de la lipoproteinlipasa en el tejido adiposo se inhiba, mientras que en la glándula se active. Una vez los ácidos grasos se han hidrolizado por la lipoproteinlipasa entran en la célula donde se transforman en ácidos graso-CoA por medio de la **ácido graso-CoA sintetasa**, cuya expresión está disminuida en el destete y en las ratas lactantes tratadas con PPG.

Una vez sintetizados los ácidos grasos se pueden elongar y desaturar y dos de las enzimas responsables de estos procesos, **ácido graso elongasa** y **esteroil-CoA desaturasa**, también se encuentran disminuidas en ambas situaciones.

Todas estas observaciones ponen de manifiesto la importancia de la lipogénesis durante la lactancia. Los resultados que hemos obtenido resaltan que se produce una inhibición de la lipogénesis durante la involución de la glándula mamaria, ya sea tras un destete o tras el tratamiento de las ratas lactantes con PPG. Estos datos concuerdan con los estudios metabólicos clásicos que determinaron la lipogénesis *in vivo* en la glándula mamaria de rata lactante midiendo la incorporación de agua tritiada en lípidos saponificados (Robinson y cols., 1978). Los resultados obtenidos mostraban que esta vía se encuentra muy activada en la glándula mamaria, si se compara con los datos a nivel hepático. Además, tras un destete de 24 horas o tras el tratamiento con BSO se producía un descenso significativo en la incorporación de agua tritiada y por tanto en la lipogénesis.

3. PAPEL DEL ÓXIDO NÍTRICO EN EL DESTETE Y TRAS EL TRATAMIENTO CON BSO.

El óxido nítrico es un regulador importante en los sistemas nervioso, inmune y cardiovascular. La sobreproducción de NO está relacionada con la inflamación, artritis y otras enfermedades y parece ser que esta molécula también tiene un papel importante en el proceso carcinogénico y la progresión de tumores (Tamir y Tannenbaum, 1996). De hecho, las isoformas de NOS se sobreexpresan en las líneas celulares de cáncer de pecho, y se correlacionan con metastasis (Dueñas-González y cols., 1997); del mismo modo, un estudio reciente hecho en ratas lactantes demuestra que la reducción de los

niveles de NO, bien con agentes quelantes del mismo o con inhibidores de iNOS, produce un menor desarrollo de tumores mamarios en ratas (Inano y Onoda, 2003).

Estudios previos de otros grupos han descrito la existencia de las tres isoformas de NOS en la glándula mamaria de rata que podrían tener una función reguladora en el desarrollo de la glándula (Onoda e Inano, 1998). No obstante, existen discrepancias en cuanto a la distribución y localización de las distintas isoformas en los diferentes tipos celulares que constituyen el tejido mamario. Así pues, Iizuka y cols. (1998) describen la existencia de NOS constitutivas (eNOS y nNOS) en la epidermis, glándulas sebáceas y endotelio de los conductos galactóforos. También en las células musculares que rodean los acini, responsables de la contracción en respuesta a oxitocina, existe actividad NOS, si bien no está esclarecido de que isoforma se trata. En cambio, Onoda e Inano (1998) han detectado, mediante inmunotransferencia e inmunohistoquímica, la presencia de las tres isoformas, no sólo en el endotelio de los vasos sanguíneos que riegan la glándula, sino también en el endotelio glandular del tejido mamario. Estos últimos datos concuerdan con nuestros resultados. En nuestro caso, hemos empleado RT-PCR (**figura 15**) e inmunotransferencia (**figura 16**) para determinar la presencia/ ausencia de las tres isoformas de NOS tanto en tejido completo como en acini aislados de glándula mamaria de rata lactante control. Los resultados obtenidos indican que las tres isoformas están presentes, si bien nNOS en menor cantidad que eNOS e iNOS ya que su detección ha requerido ajustar más las condiciones.

En la glándula mamaria de rata lactante hemos observado que existe un aumento en los niveles de la proteína iNOS en aquellas condiciones en las que se está produciendo la involución de la glándula mamaria (**figura 17**); este aumento en los niveles de proteína es dependiente del tiempo de destete. En cambio los niveles de eNOS están disminuidos en el destete de 24 horas y tras el tratamiento con BSO (**figura 17**) por lo que parece existir una relación inversa en la regulación de ambas isoformas. Esta disminución en la regulación de eNOS por iNOS ya ha sido descrita en estudios previos; no sólo para eNOS en cultivos de células endoteliales de venas coronarias bovinas (Lu y cols., 1996) y células glomerulares de rata (Schwartz y cols., 1997) sino también para nNOS en el músculo esquelético de cobaya. Se puede suponer que las elevadas concentraciones de NO producidas por iNOS podrían autoinhibir las formas

constitutivas de NOS *in vivo* resultando una situación en la que iNOS estaría sobreexpresada mientras que eNOS se vería inhibida, como ocurre en nuestro caso.

A diferencia de eNOS, que produce relativamente pequeñas cantidades de NO, iNOS puede generar grandes cantidades de esta molécula; consecuentemente, unos niveles elevados de iNOS que se mantengan durante un cierto tiempo pueden permitir que el NO producido difunda hacia células vecinas, donde actuará directa o indirectamente por acción del peroxinitrito, causando un daño en el tejido mamario y favoreciendo la apoptosis. En nuestro modelo, hemos observado que se produce un aumento en los niveles de nitritos, metabolitos secundarios del NO, por lo que existe una mayor producción de NO en la glándula mamaria durante el destete (**figura 18**). La superproducción de NO induce la muerte celular ya que inhibe la respiración mitocondrial; niveles elevados de NO producen una fuerte inhibición de la citocromo oxidasa (Brown, y Borutaite, 2001) y esto origina un descenso del consumo de oxígeno y una despolarización de la mitocondria (Bal-Price y Brown, 2000). La despolarización de la membrana mitocondrial favorece la apertura del poro de permeabilidad transitoria y, con ello, la salida del citocromo c al citosol, que finalmente conduce a una activación de las caspasas. En nuestros modelos experimentales (destete y ratas lactantes tratadas con BSO) se ha observado un aumento de la producción de nitritos (**figura 18**) que podría correlacionarse con la mayor liberación de citocromo c durante el destete (**figura 8**). En contraste con estos efectos proapoptóticos del NO, esta molécula puede contribuir al mantenimiento de la viabilidad celular. Kim y cols. (1997a) han propuesto un mecanismo por el cual el NO inhibe la apoptosis en hepatocitos. Estos autores han postulado que el NO previene la apoptosis en hepatocitos al inhibir la actividad de la caspasa-3 por un mecanismo dependiente de cGMP y por nitrosilación de esta proteasa. El papel del NO en la viabilidad celular no deja de ser una controversia, ya que puede actuar como pro- o antiapoptótico; esta capacidad parece depender del tipo celular considerado, de la cantidad de NO producido, de la isoforma de NOS que esté inducida y del estado de activación de la célula.

El NO es un agente pleiotrópico que puede causar diferentes modificaciones en las proteínas, oxidación lipídica y rotura del DNA debido a la acción de sus derivados más reactivos. La expresión de proteínas que controlan el ciclo celular, como c-myc y p53 está aumentada en células vasculares del músculo liso tras la incubación con

donantes de NO; mientras que bcl-2, una proteína antiapoptótica, está disminuida (Nishio y Watanabe, 1998; Wang y cols., 2002). Estos resultados, junto con los presentados en esta tesis, sugieren que la producción de NO juega un papel importante en el desarrollo de la apoptosis, modulando la expresión de proto-oncoproteínas como el p53, una proteína que se encuentra elevada a las dos horas de ausencia de succión. El NO produce una disminución en los niveles de la proteína Mdm2, esto produce una disminución de la ubiquitinización del p53 lo que favorece un aumento relativamente temprano de los niveles de esta proteína (Wang y cols., 2002), que es lo que ocurre en nuestro modelo (**figura 11**). Así pues la acumulación de p53 favorece su actividad como factor de transcripción aumentando la expresión de genes diana como son p21 y bax. No obstante hay que resaltar que el p53 es, a su vez, un regulador negativo de la expresión de iNOS (Forrester y cols., 1996); nos encontramos pues ante un bucle de retroalimentación negativa en el que, por un lado, el NO generado por iNOS conduce a la activación de p53, mientras que, por otro lado, este p53 activado inhibe la expresión de iNOS y por tanto frena la producción de NO.

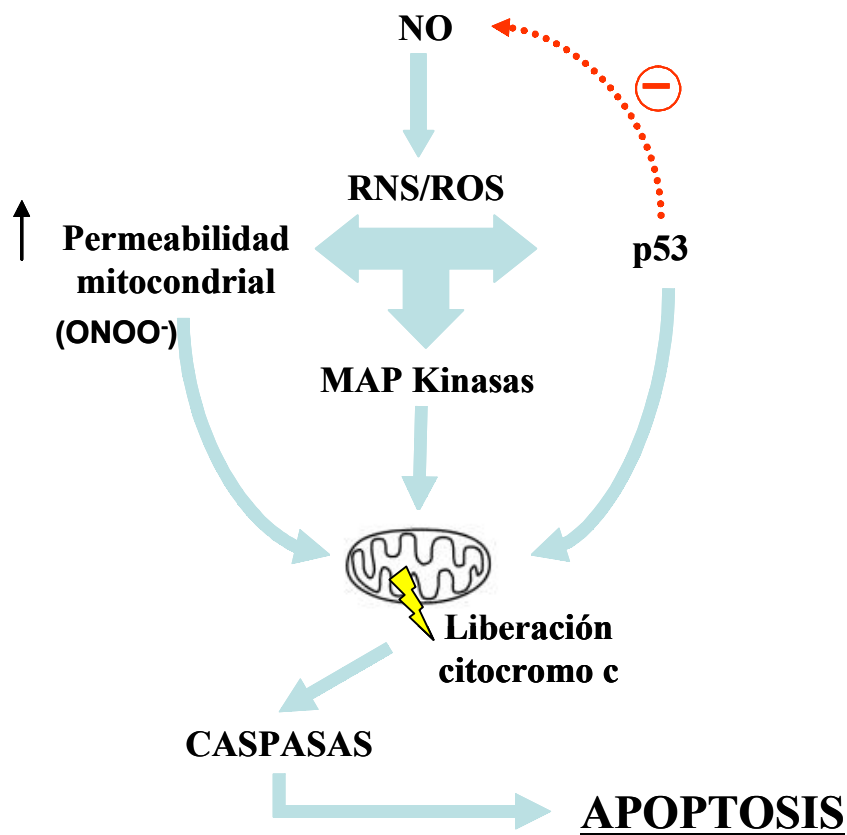


Figura 24. Posibles mecanismos que conducen a la apoptosis inducida por el NO en la glándula mamaria durante el destete.

CONCLUSIONES

1.- La retirada de las crías en el pico de la lactancia produce apoptosis en los acini de la glándula mamaria, esta apoptosis viene determinada por la liberación de citocromo c al citosol y por la fragmentación del DNA. También se produce muerte de las células epiteliales por apoptosis y una disminución significativa de la producción láctea en las ratas lactantes inyectadas con PPG o BSO, que disminuyen el GSH en la glándula mamaria.

2.- Entre los genes de respuesta temprana, la expresión de JNK, c-Jun, p53, p21 y p27 está aumentada tras el destete. Esta misma situación se produce cuando las ratas lactantes control son tratadas con PPG o BSO.

3.- El estudio de los patrones de expresión génica de la glándula mamaria de ratas lactantes control, destetadas durante 8 horas y ratas lactantes tratadas con PPG mediante la técnica “microarray chips” demuestra que la falta GSH en la glándula mamaria reproduce los cambios observados en un proceso fisiológico como es el destete.

4.- El óxido nítrico (NO) es un mediador de la apoptosis. La glándula mamaria durante la lactancia expresa las tres isoformas de la óxido nítrico sintasa (eNOS, iNOS, nNOS). El destete y el tratamiento con BSO producen un aumento de iNOS, que se acompaña de un aumento de la producción de NO y de la nitración de proteínas.

LA DISMINUCIÓN DE GSH EN LA LACTANCIA MIMETIZA LOS CAMBIOS ENCONTRADOS DURANTE EL DESTETE A NIVEL DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.

BIBLIOGRAFIA

Accorsi, P.A., Pacioni, B., Pezzi, C., Forni, M., Flint, D.J. y Seren, E. (2002) Role of prolactin, growth hormona and insulin-like growth factor 1 in mammary gland involution in the dairy cow. *J. Dairy Sci.* **85**: 507-513.

Adams, J.M. y Cory, S. (1998) The bcl-2 protein family: Arbitres of cell survival. *Science* **281**: 1322-1326.

Adams, J.M. y Cory, S. (2002) Apoptosomes: Engines for caspase activation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**: 715-720.

Agarwal, M.L, Taylor, W.R., Chernov, M.V., Chernova, O.B. y Stark, G.R. (1998) The p53 network. *J. Biol. Chem.* **273**: 1-4.

Ahuja, H.G., Testa, M.P. y Cline, M.J. (1990) Variation in the protein coding region of the human p53. *Oncogene* **5**: 1409-1410.

Alderton, W.K., Cooper, C.E. y Knowles, R.G. (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* **357**: 593-615.

Allen, R.T., Hunter III, W.J. y Agrawal, D.K. (1997) Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.* **37**: 215-228.

Amati, B., Littlewood, T.D., Evans, G.I. y Land, H. (1993) The c-myc protein induces cell cycle progression and apoptosis throught dimerization with Max. *EMBO J.* **12**: 5083-5087.

Amenomori, Y., Chem, C.I. y Meites, J. (1964) Serum prolactin levels in rats during different reproductive states. *Endocrinology* **74**: 714-723.

Antonsson, B. y Martinou, J.C. (2000) The Bcl-2 protein family. *Exp. Cell Res.* **256**: 50-57.

Arends, M.J. (1999) Apoptosis in the endometrium. *Histopathology* **35**: 174-178.

- Awata, S., Nakayama, K., Sato, A., Kawamura, M., Suzuki, I. y Kodama, H. (1993) Changes in cystathionine gamma-lyase levels in rat liver during lactation. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **31**: 185-191.
- Baker, S.J. y Reddy, E.P. (1998) Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene* **17**: 3261-3270.
- Bal-Price, A. y Brown, G.C. (2000) Nitric-oxide-induced necrosis and apoptosis in PC12 cells mediated by mitochondria. *J. Neurochem.* **75**: 1455-1464.
- Barber, T., Triguero, A., Martínez-López, I., Torres, L., García, C., Miralles, V.J. y Viña, J.R. (1999) Elevated expression of liver γ -cystathionase is required for the maintenance of lactation in rats. *J. Nutr.* **129**: 928-933.
- Baumrucker, C.R., Pocius, P.A. y Riss, T. (1981) Glutathione utilization by lactating bovine mammary secretory tissue *in vitro*. *Biochem. J.* **198**: 243-246.
- Batsakis, J.G. y El-Naggar, A.K. (1995) p53. Fifteen years after discovery. *Adv. Anat. Pathol.* **2**: 71-88.
- Bauman, D.E. y Currie, W.B. (1980) Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *J. Dairy Sci.* **63**: 1514-1529.
- Bell, A.W. (1995) Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *J. Anim. Sci.* **73**: 2804-2819.
- Benjamin, N., O'Driscoll, F., Dougall, H., Duncan, C., Smith, L. y Golden, M. (1994) Stomach NO synthesis. *Nature* **368**: 502.
- Ben-Jonathan N., Mershon J.L., Allen D.L. y Steinmetz R.W. (1996) Extrahypothalamic prolactin: distribution, regulation, functions and clinical aspects. *Endocr. Rev.* **17**: 639-669.

Black, A.E., Wiles, S.J. y Paul, A.A. (1986) The nutrient intakes of pregnant and lactating mothers of good socio-economic status in Cambridge, UK: some implications for recommended daily allowances of minor nutrients. *Br. J. Nutr.* **56**: 59-72.

Bodis, S. y Haregewoin, A. (1993) Evidence for the release and possible neural regulation of nitric oxide in human saliva. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **194**: 347-350.

Boese, M., Mordvintcev, P.I., Vanin, A.F., Busse, R. y Mulsch, A. (1995) S-nitrosation of serum albumin by dinitrosyl-iron complex. *J. Biol. Chem.* **270**: 29244-29249.

Boise, L.H., González-García, M., Postema, C.E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L.A., Mao, X., Núñez, G. y Thompson, C.B. (1993) Bcl-x, a bcl-2 related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell deaths. *Cell* **74**: 609-619.

Bonfoco, E. Krainc, D., Ankarcrona, M., Nicotera, P. y Lipton, S.A. (1995) Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 7162-7166.

Borutaite, V., Morkuniene, R. y Brown, G.C. (2000) Nitric oxide donors, nitrosothiols and mitochondrial respiration inhibitors induce caspase activation by different mechanisms. *FEBS Lett.* **467**: 155-159.

Brigelius, R., Muckel, C., Akerboom, T.P.M. y Sies, H. (1983) Identification and quantitation of glutathione in hepatic protein mixed disulfides and its relationship to disulfide. *Biochem. Pharm.* **32**: 2526-2534.

Brown, G.C. y Borutaite, V. (2001) Nitric oxide, mitochondria and cell death. *IUBMB Life* **52**: 189-195.

Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Linz, M.Z., Juo, P. y Hu, L.S. (1999) Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a forkhead transcription factor. *Cell* **96**: 857-868.

- Burnette, W.H. (1981) Western blotting: electrophoretic transfer of protein from SDS-poliacrilamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* **112**: 195-203.
- Casey, C.E. y Hambidge, K.M. (1983) Nutritional aspects of lactation. En *Lactation: Physiology, nutrition and breast feeding*. (Neville, M.C. and Neifert, M.R. Eds.), Plenum Press, New York, pp: 199-248.
- Cassina, A. y Radi, R. (1996) Different inhibitory actions of NO and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch. Biophys. Biochem.* **328**: 309-316.
- Chang, H.Y. y Yang, X. (2000) Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: 821-846.
- Chapman, R.S., Lourenco, P.C., Tonner, E., Flint, D.J., Selbert, S., Takeda, K., Akira, S., Clarke, A.R. y Watson, C.J. (1999) Suppression of epithelial apoptosis and delayed mammary gland involution in mice with a conditional knockout of Stat3. *Genes Dev.* **13**: 2604-2616.
- Chatwin, A.L., Linzell, J.L. y Setchell, B.P. (1969) Cardiovascular changes during lactation in the rat. *J. Endocr.* **44**: 247-254.
- Cheng, T.S., Doong, M.L., Wang, S.W., Tsai, S.C., Lu, C.C., Shih, H.C., Chen, Y.H., Chang, F.Y., Lee, S.D. y Wang, P.S. (1997a) Gastric emptying and gastrointestinal transit during lactation in rats. *Am. J. Physiol.* **272** (Gastrointest. Liver Physiol. 35): G626-G631.
- Cheng, E.H., Kirsch, D.G., Clem, R.J., Ravi, R., Kastan, M.B., Bedi, A., Ueno, K. y Hardwick, J.M. (1997b) Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science* **278**: 1966-1968.
- Chetty, R., Dada, M.A. y Gatter, K. (1997) Bcl-2: Longevity personified! *Adv. Anat. Pathol.* **4**: 134-138.

Chittenden, T., Harrington, E.A., O'Connors, R., Flemington, C., Lutz, R.J., Evan, G.I. y Guild, B.C. (1995) Induction of apoptosis by the bcl-2 homologue bak. *Nature* **374**: 733-736.

Chomczynski, P. y Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**: 156-159.

Chou, J.J., Li, H., Salvesen, G.S., Yuang, J. y Wagner, G. (1999) Solution structure of BID, an intracellular amplifier of apoptotic signaling. *Cell* **7**: 615- 624.

Chung, H.T., Pae, H.O., Choi, B.M., Billiar, T.M. y Kim, Y.M. (2001) Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **282**: 1075-1079.

Clark, A.J. (1998) The mammary gland as a bioreactor: expression, processing, and production of recombinant proteins. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **3**: 337-350.

Clarkson, R.W.E., Wayland, M.T., Lee, J., Freeman, T. y Watson, C.J. (2004) Gene expression profiling of mammary gland development reveals putative roles for death receptors and immune mediators in post-lactational regression. *Breast Cancer Res.* **6**: R92-R109.

Clementi, E., Brown, G.C., Feelisch, M. y Moncada, S. (1998) Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 7631-7636.

Cohen, J.J. (1993) Overview: mechanisms of apoptosis. *Immunol. Today* **14**: 126-130.

Cohen, G.M. (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* **326**: 1-16.

Colotta, F., Polentarutti, N., Sironi, M. y Mantovani, A. (1992) Expression and involvement of *c-fos* and *c-jun* protooncogenes in programmed cell death induced by growth factor deprivation in lymphoid cell lines. *J. Biol. Chem.* **267**: 18278.

Cotgreave, I.A. y Schuppe-Koistinen, I. (1994) A role for γ -glutamyl transpeptidase in the transport of cystine into human endothelial cells: relationship to intracellular glutathione. *Biochim. Biophys. Acta* **1222**: 375-382.

Cox, L.S. (1997) Multiple pathways control cell growth and transformation: overlapping and independent activities of p53 and p21. *J. Pathol.* **183**: 134-140.

Cripps, A.W. y Williams, V.J. (1975) The effect of pregnancy and lactation on food intake, gastrointestinal anatomy and the absorptive capacity of the small intestine in the albino rat. *Br. J. Nutr.* **33**: 17-32.

Cui, S., Reichner, J.S., Mateo, R.B. y Albina, J.E. (1994) Activated murine macrophages induce apoptosis in tumor cells through nitric oxide-dependent or -independent mechanisms. *Cancer Res.* **54**: 2462-2467.

Davison, K., Mann, K.K., Waxman, S. y Miller, W.H. Jr. (2004) JNK activation is a mediator of arsenic trioxide-induced apoptosis in acute promyelocytic leukemia cells. *Blood* **103**: 3496-3502.

Degterev, A., Boyce, M. y Yuan, J. (2003) A decade of caspases. *Oncogene* **22**: 8543-8567.

De Jong, D., Prins, F., Mason, D.Y., Reed, J.C., Van Ommen, G.B. y Kluin, P.M. (1994) Subcellular localization of the bcl-2 protein in malignant and normal lymphoid cells. *Cancer Res.* **54**: 256-260.

De Nadai, C., Sestili, P., Cantón, O., Lievremont, J.P., Sciorati, C., Barsacchi, R., Moncada, S., Meldolesi, J. y Clementi, E. (2000) Nitric oxide inhibits tumor necrosis factor- α -induced apoptosis by reducing the generation of ceramide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 5480-5485.

Di Nardo, A., Benassi, L., Magnoni, C., Cossarizza, A., Seidenari, S. y Giannetti, A. (2000) Ceramide 2 (N-acetyl sphingosine) is associated with reduction in Bcl-2 protein levels by Western blotting and with apoptosis in cultured human keratinocytes. *Br. J. Dermatol.* **143**: 491-497.

Doumanis J., Quinn L., Richardson H. y Kumar S. (2001) STRICA, a novel *Drosophila melanogaster* caspase with an unusual serine/threonine-rich prodomain, interacts with DIAP1 and DIAP2. *Cell Death Differ.* **8**, 387-394.

Dueñas-González, A., Isales, C.M., del Mar Abad-Hernández, M., González-Sarmiento, R., Sanguenza, O., Rodríguez-Commes, J. (1997) Expression of inducible nitric oxide synthase in breast cancer correlates with metastatic disease. *Mod. Pathol.* **10**: 645-649.

Duke, R.C., Ojcius, D.M. y Young, J.D.E. (1996) Cell suicide in health and disease. *Scientific American* **82**: 80-87.

Duttaroy, A., Qian, J.F., Smith, J.S. y Wang, E. (1997) Up-regulated p21^{CIP1} expression is part of the regulation quantitatively controlling serum deprivation-induced apoptosis. *J. Cell Biochem.* **64**: 434-446.

Earnshaw, W.C. (1999) Apoptosis. A cellular poison cupboard. *Nature* **397**: 441-446.

El-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W. y Vogelstein, B. (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **75**: 817-825.

Enari, M., Sakahira, H. y Yokoyama, H. (1998) A caspase activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* **391**: 43-50.

Esteve, J.M., Mompó, J., García de la Asunción, J., Sastre, J., Asensi, M., Boix, J., Viña, J.R., Viña, J. y Pallardó, F.V. (1999) Oxidative damage to mitochondrial DNA and glutathione oxidation in apoptosis: studies *in vivo* and *in vitro*. *FASEB J.* **13**: 1055-1064.

- Evan, G. y Littlewood, T. (1998) A matter of life and cell death. *Science* **281**: 1317-1321.
- Fahey, R.C. y Sundquist, A.R. (1991) Evolution of glutathione metabolism. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **64**: 1-53.
- Fehsel, K., Kroncke, K.D., Meyer, K.L., Huber, H., Wahn, V. y Kolb-Bachofen, V. (1995) Nitric oxide induces apoptosis in mouse thymocytes. *J. Immunol.* **155**: 2858-2865.
- Fell, F., Smith, K.A. y Campbell, R.M. (1963) Hypertrophic and hyperplasic changes in the alimentary canal of the lactating rat. *J. Path. Bact.* **85**: 179-184.
- Ferrando-May E., Cordes V., Biller-Ckovric I., Mirkovic J., Gorlich D. y Nicotera P. (2001) Caspases mediate nucleoporin cleavage, but not early redistribution of nuclear transport factors and modulation of nuclear permeability in apoptosis. *Cell Death Differ.* **8**, 495-505.
- Fleming, W. (1885) Uber die bildung von richtungsfiguren in saugethiereirn beim untergang graaf'scher folliken. *Arch. Anat. Entwgschw* 221-224.
- Fleming, A.S. (1976) Control of food in the lactating rat: Role of suckling hormones. *Physiol. Behav.* **17**: 969-978.
- Fleming, A.S. (1978) Food intake and body weight regulation during the reproductive cycle of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Behav. Biol.* **24**: 291-306.
- Forrester, K., Ambs, S., Lupold, S.E., Kapust, R.B., Spillare, E.A., Weinberg, W.C., Felley-Bosco, E., Wang, X.W., Geller, D.A., Tzeng, E., Billiar, T.R. y Harris, C.C. (1996) Nitric oxide-induced p53 accumulation and regulation of inducible nitric oxide synthase expression by wild-type p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 2442-2447.
- Gaitonde, M.K. (1967) A spectrophotometric method for the direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acids. *Biochem. J.* **104**: 627-633.

Genaro, A.M., Hortelano, S., Alvarez, A., Martinez, C. y Bosca, L. (1995) Splenic B lymphocyte programmed cell death is prevented by nitric oxide release through mechanisms involving sustained Bcl-2 levels. *J. Clin. Invest.* **95**: 1884-1890.

Gerardo-Gettens, T., Moore, B.J., Stern, J.S. y Horwitz, B.A. (1989a) Prolactin stimulates food intake in the absence of the ovarian progesterone. *Am. J. Physiol.* **256**: R701-R706.

Gerardo-Gettens, T., Moore, B.J., Stern, J.S. y Horwitz, B.A. (1989b) Prolactin stimulates food intake in a dose-dependent manner. *Am. J. Physiol.* **256**: R276-R280.

Ghatan, S., Larner, S., Kinoshita, Y., Hetman, M., Patel, L., Xia, Z., Youle, R.J. y Morrison, R.S. (2000) p38 MAP kinase mediates Bax translocation in nitric oxide-induced apoptosis in neurons. *J. Cell Biol.* **150**: 335-347.

Ghibelli, L., Fanelli, C., Rotilio, G., Lafavia, E., Coppola, S., Colussi, C., Civitareale, P. y Ciriolo, M.R. (1998) Rescue of cells from apoptosis by inhibition of active GSH extrusion. *FASEB J.* **12**: 479-486.

Glucksmann, A. (1951) Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **26**: 59-89.

Godber, B.L., Doel, J.J., Sapkota, G.P., Blake, D.R., Stevens, C.R., Eisenthal, R. y Harrison, R. (2000) Reduction of nitrite to nitric oxide catalyzed by xanthine oxidoreductase. *J. Biol. Chem.* **275**: 7757-7763.

Gómez-Lechón, M.J, O'Connor, E., Castell, J.V., Jover, R. (2002) Sensitive markers used to identify compounds that trigger apoptosis in cultured hepatocytes. *Toxicological Sciences* **65**: 299-308.

Graper, L. (1914) Eine neue Anschauung uber physiologische Zellausschaltung. *Archive Zellforsch* **12**: 373-394.

- Green, D.R. (1997) A myc-induced apoptosis pathway surfaces. *Science* **278**: 1246-1247.
- Green, D.R. (1998a) Apoptotic pathways: the roads to win. *Cell* **94**: 695-698.
- Green, D.R. (1998b) Death receiver. *Nature* **396**: 629-630.
- Green, D.R. (2000) Apoptotic pathways: paper wraps stone blunt scissors. *Cell* **102**: 1-4.
- Greenacre, S.A. y Ischiropoulos, H. (2001) Tyrosine nitration: localisation, quantification, consequences for protein function and signal transduction. *Free Radic. Res.* **34**: 541-581.
- Hall, A.G. (1999) The role of glutathione in the regulation of apoptosis. *Eur. J. Clin. Invest.* **29**: 238-245.
- Hansen, R. y Oren, M. (1997) p53: from inductive signal to cellular effect. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **7**: 46-51.
- Hanson, L.A., Korotkova, M. y Telemo, E. (2003) Breast-feeding, infant formulas and the immune system. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* **90**: 59-63.
- Haupt, Y., Maya, R., Kazanietz, A. y Oren, M. (1997) MDM2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* **387**: 296-299.
- Hawkins, C. (1994) The role of Bcl-2 in the programmed cell death. *Immunol. Rev.* **142**: 127-139.
- Heinonen, K. (1973) Studies on cystathionase activity in rat liver and brain during development. Effects of hormones and amino acids in vivo. *Biochem. J.* **136**: 1011-1015.
- Hendrix, M.J. (2000) De-mystifying the mechanism of maspin. *Nature Med.* **6**: 374-376.
- Hengartner, M.O. (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**: 770-776.

Hockenbery, D., Nuñez, G. y Milliman, C. (1990) Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* **348**: 334-386.

Hockenbery, D. (1995) Defining apoptosis. *Am. J. Pathol.* **146**: 16-19.

Holcik, M., Gibson, H. y Korneluk, R.G. (2001) XIAP: apoptotic brake and promising therapeutic target. *Apoptosis* **6**: 253-261.

Hollstein, M., Sidransky, D. y Vogelstein, B. (1991) p53 mutations in human cancer. *Science* **253**: 49-53.

Honda, T., Coppola, S., Ghibelli, L., Cho, S.H., Kagawa, S., Spurgers, K.B., Brisbay, S.M., Roth, J.A., Meyn, R.E., Fang, B. y McDonnell, T.J. (2004) GSH depletion enhances adenoviral bax-induced apoptosis in lung cancer cells. *Cancer Gene Therapy* **11**: 249-255.

Houdebine, L.M., Rival, S., Pantano, T., Jolivet, G., Thepot, D. y Attal, J. (2002) Transgenesis for the study and the control of lactation. *Reprod. Nutr. Dev.* **42**: 117-125.

Hovey, R.C., Trott, J.F. y Vonderhaar, B.K. (2002) Establishing a framework for the functional mammary gland: from endocrinology to morphology. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **7**: 17-38.

Huang, H., Joazeiro, C.A, Bonfoco, E., Kamada, S., Levenson, J.D y Hunter T. (2000) The inhibitor of apoptosis, cIAP2, functions as a ubiquitin-protein ligase and promotes in vitro monoubiquitination of caspases 3 and 7. *J. Biol. Chem.* **275**:26661-26664.

Ignarro, L.J., Buga, G.M., Word, K.S., Byrns, R.E. y Chaudhuri, G. (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 9265-9269.

Iizuka, T., Sasaki, M., Oishi, K., Uemura, S. y Koike, M. (1998) The presence of nitric oxide synthase in the mammary gland of lactating rats. *Pediatr. Res.* **44**: 197-200.

Inano, H. y Onoda, M. (2003) Role of nitric oxide in radiation-induced initiation of mammary tumorigenesis in rats. *Nitric Oxide* **8**: 144-148.

Jaggi, R., Marti, A., Guo, K., Feng, Z. y Friis, R.R. (1996) Regulation of a physiological apoptosis: mouse mammary gland involution. *J. Dairy Sci.* **79**: 1074-1084

Jayaraman, L. y Prives, C. (1995) Activation of sequence specific DNA binding by short single strands of DNA require of p53 c-terminus. *Cell* **81**: 1021-1029.

Jerry D.J., Pinkas J., Kuperwasser C., Dickinson E.S. y Naber S.P. (1999) Regulation of p53 and its targets during involution of the mammary gland. *J. Mammary gland Biol. Neoplasia* **4**: 177-181.

Jerry, D.J., Dickinson, E.S., Roberts, A.L. y Said, T.K. (2002) Regulation of apoptosis during mammary involution by the p53 tumor supressor gene. *J. Dairy Sci.* **85**: 1103-1110.

Jochum, W., Passequé, E. y Wagner, E.F. (2001) AP-1 in mouse development and tumorigenesis. *Oncogene* **20**: 2401-2412.

Jones, D.P. (2002) Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance. *Methods Enzymol.* **348**: 93-112.

Jun, C.D., Choi, B.M., Ryu, H., Um, J.Y., Kwak, H.J., Lee, B.S., Park, S.G., Kim, H.M. y Chung, H.T. (1994) Synergistic cooperation between phorbol ester and IFN-gamma for induction of nitric oxide synthesis in murine peritoneal macrophages. *J. Immunol.* **153**: 3684-3690.

Kamijo, T., Weber, J.D., Zambetti, G., Zindy, F., Roussel, M.F. y Sherr, C.J. (1998) Functional and physical interactions of the ARF tumor supressor with p53 and Mdm2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 8292-8297.

Kanzler, S. y Galle, P.R. (2000) Apoptosis and the liver. *Cancer Biol.* **10**: 173-184.

Katz, J., Wals, P.A. y Van der Velde, R.L. (1974) Lipogenesis by acini from mammary gland of lactating rats. *J. Biol. Chem.* **249**: 7348-7357.

Kelleher, S.L. y Lonnerdal, B. (2001) Immunological activities associated with milk. *Adv. Nutr. Res.* **10**: 39-65.

Kelly, P.A., Bachelot, A., Kedzia, C., Hennighausen, L., Ormandy, C.J., Kopchick, J.J. y Binart, N. (2002) The role of prolactin and growth hormone in mammary gland development. *Mol. Cell Endocrinol.* **197**: 127-131.

Kern, S.E., Kinzler, K.W. y Bruskin, A. (1991) Identification of p53 as a sequence specific DNA binding protein. *Science* **252**: 1708-1711.

Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H. y Curie, A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**: 13-20.

Kerr, J.F.R. y Searle, J. (1973) Deletion of cells by apoptosis during castration-induced involution of the rat prostate. *Virchows Arch.* **13**: 87-102.

Kerr, J.F.R., Winterford, C.M. y Harmon, B.V. (1994) Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* **73**: 2013-2026.

Kim, Y.M., Bergonia, H. y Lancaster, J.R. (1995) Nitrogen oxide-induced autoprotection in isolated rat hepatocytes. *FEBS Lett.* **374**: 228-232.

Kim, Y.M., de Vera, M.E., Watkins, S.C. y Billiar, T.R. (1997a) Nitric oxide protects cultured rat hepatocytes from tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis by inducing heat shock protein 70 expression. *J. Biol. Chem.* **272**: 1402-1411.

Kim, Y.M., Talanian, R.V. y Billiar, T.R. (1997b) Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms. *J. Biol. Chem.* **272**: 31138-31148.

- Kim, Y.M., Chung, H.T., Simmons, R.L. y Billiar, T.R. (2000) Cellular non-heme iron content is a determinant of nitric oxide-mediated apoptosis, necrosis, and caspase inhibition. *J. Biol. Chem.* **275**: 10954-10961.
- Klein, S.D. y Brune, B. (2002) Heat-shock protein 70 attenuates nitric oxide induced apoptosis in RAW macrphages by preventing cytochrome c release. *Biochem. J.* **362**: 635-641.
- Korhonen, H., Marnila, P. y Gill, H.S. (2000) Milk immunoglobulins and complement factors. *Br. J. Nutr.* **84SB**: IM: S75-S80.
- Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J. y Chu, K. (1997) Caspase 3 generated fragment of gelsolin: effector of morphological changes in apoptosis. *Science* **278**: 294-298.
- Krajewski, S., Krajewska, M., Shabaik, A., Miyashita, T., Wang, H-G. y Reed, J.C. (1994) Immunohistochemical determination of *in vivo* distribution of bax, a dominant inhibitor of bcl-2. *Am. J. Pathol.* **145**: 1323-1333.
- Krajewski, S., Bodrug, S., Krajewska, M., Shabaik, A., Gascoyne, R., Berean, K. y Reed, J.C. (1995) Immunohistochemical analysis of Mcl-1 and Bcl-2 protein production suggest a unique role for Mcl-1 in control of programmed cell death *in vivo*. *Am. J. Pathol.* **146**: 1309-1319.
- Krammer, P.H. (2000) CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* **407**: 789-795.
- Krebs, H.A. (1932) Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiol. Chem.* **210**: 33-66.
- Kroemer, G., Zamzami, N. y Susin, S.A. (1997) Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol. Today* **18**: 44-51.

- Kubbutat, M.G.H., Jones, S.N. y Vousden, K.H. (1997) Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* **387**: 299-303.
- Kumar, R., Vadlamudi, R.K. y Adam, L. (2000) Apoptosis in mammary gland and cancer. *Endocr. Relat. Cancer* **7**: 257-269.
- Lacasse, P., Farr, V.C., Davis, S.R. y Prosser, C.G. (1996) Local secretion of nitric oxide and the control of mammary blood flow. *J. Dairy Sci.* **79**: 1369-1374.
- Laemli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**: 680-685.
- Lane, D.P. (1992) Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* **358**: 15-16.
- LeBrun, D.P., Warnke, R.A. y Cleary, M.L. (1993) Expression of bcl-2 in fetal tissue suggests a role in morphogenesis. *Am. J. Pathol.* **142**: 743-753.
- Ledda, G.M., Columbano, A. y Coni, P. (1989) Cell deletion by apoptosis during regression of renal hyperplasia. *Am. J. Pathol.* **135**: 657-662.
- Li, M., Liu, X., Robinson, G., Bar-Peled, U., Wagner, K., Scott-Young, W., Hennighausen, L. y Furth, P.A. (1997a) Mammary-derived signals activate programmed cell death during the first stage of mammary gland involution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**: 3425-3430.
- Li, J., Billiar, T.R., Talanian, R.V. y Kim, Y.M. (1997b) Nitric oxide reversibly inhibits seven members of the caspase family via S-nitrosylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **240**, 419-424.
- Li, J., Yang, S. y Billiar, T.R. (2000) Cyclic nucleotides suppress tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis by inhibiting caspase activation and cytochrome c release in primary hepatocytes via a mechanism independent of Akt activation. *J. Biol. Chem.* **275**: 13026-13034.

Lin, K.T., Xue, J.Y., Nomen, M., Spur, B. y Wong, P.Y. (1995) Peroxynitrite-induced apoptosis in HL-60 cells. *J. Biol. Chem.* **270**: 16487-16490.

Lin, Y., Ma, W. y Benchmol, S. (2000) PIDD a new death domain containing protein is induced by p53 and promotes apoptosis. *Nature Genet.* **26**: 122-127.

Loeffler, M. y Kroemer, G. (2000) The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp. Cell Res.* **256**: 19-26.

Lorenzo, H.K. y Susin, S.A. (2004) Mitochondrial effectors in caspase-independent cell death. *FEBS Letters* **557**: 14-20.

Los, M., Stroh, C., Janicke, R.U., Engels, I.H. y Schulze-Osthoff, K. (2001) Caspases: more than just killers? *Trends Immunol.* **22**, 31-34.

Lozano, G. y Elledge, S.J. (2000) p53 sends nucleotides to repair DNA. *Nature* **404**: 24-25.

Lu, J.L., Schmiede, L.M. 3rd, Kuo, L. y Liao, J.C. (1996) Downregulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase expression by lipopolysaccharide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **225**: 1-5.

Lui, V.C., Tam, P.K., Leung, M.Y., Lau, J.Y., Chan, J.K., Chan, V.S., Dallman, M. y Cheah, K.S. (2003) Mammary gland-specific secretion of biologically active immunosuppressive agent cytotoxic-T-lymphocyte antigen 4 human immunoglobulin fusion protein (CTLA4Ig) in milk by transgenesis. *J. Immunol. Methods* **277**: 171-183.

Lund, L.R., Romer, J., Thomasset, N., Solberg, H., Pyke, C., Bissel, M.J., Dano, K. y Werb, Z. (1996) Two distinct phases of apoptosis in mammary gland involution: proteinase-independent and dependent pathways. *Development* **122**: 181-193.

Majno, G. y Joris, I. (1995) Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol.* **146**: 3-15.

Marchenko, N.D., Zaika, A. y Mols, U.M. (2000) Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. *J. Biol. Chem.* **275**: 16202-16212.

Marguet, D., Luciani, M.F., Moynault, A., Williamson, P. y Chimini, G. (1999) Engulfment of apoptotic cells involves the redistribution of membrane phosphatidylserine on phagocyte and prey. *Nature Cell Biol.* **1**: 454-456.

Marletta, M.A. (1994) Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell* **78**: 927-930.

Mårtensson, J.M. y Meister, A. (1991) Glutathione deficiency decreases tissue ascorbate levels in newborn rats: Ascorbate spares glutathione and protects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 4656-4660.

Mårtensson, J.M., Han, J., Griffith, O.W. y Meister, A. (1993) Glutathione ester delays the onset of scurvy in ascorbate-deficient guinea pigs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 317-321.

Marti, A., Jehn, B., Costello, E., Keon, N., Ke, G., Martin, F. y Jaggi, R. (1994) Protein kinase-A and AP-1 (c-Fos/JunD) are induced during apoptosis of mouse mammary epithelial cells. *Oncogene* **9**: 1213.

Marti, A., Feng, Z., Jehn, B., Djonov, V., Chicaiza, G., Altermatt, H. J. y Jaggi, R. (1995) Expression and activity of cell cycle regulators during proliferation and programmed cell death in the mammary gland. *Cell Death Diff.* **2**: 277.

Marti, A., Lazar, H., Ritter, P. y Jaggi, R. (1999) Transcription factors activities and gene expression during mouse mammary gland involution. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **4** (2): 145-152.

Martinou, J.C. (1999) Key to the mitochondrial gate. *Nature* **397**: 479-480.

Mascolo, N., Gagarella, T.S., Izzo, A.A., Carlo, G.D., Capasso, F. (1994) Nitric oxide involvement in sodium choleate-induced fluid secretion and diarrhoea in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **264**: 21-26.

Master, S.R., Hartman, J.L., D'Cruz, C.M., Moody, S.E., Keiper, E.A., Ha, S.I., Cox, J.D., Belka, G.K. y Chodosh, L.A. (2000) Functional microarray analysis of mammary organogenesis reveals a developmental role in adaptive thermogenesis. *Mol. Endocrinol.* **16**: 1185-1203.

Mayo, H.W., Wang, C.Y., Cogswell, P.C., Rogers-Graham, K.S., Lowe, S.W. y Der, C.J. (1997) Requirement of NF- κ B activation suppress p53-independent apoptosis induced by oncogenic Ras. *Science* **278**: 1812-1825.

McCarthy, N.J., Smith, C. y Williams, G.T. (1992) Apoptosis in the development of the immune system: growth factors, clonal selection and bcl-2. *Cancer and metastasis reviews* **11**: 157-178.

McDaniel, M.L., Corbett, J.A., Kwon, G. y Hill, J.R. (1997) A role for nitric oxide and other inflammatory mediators in cytokine-induced pancreatic beta-cell dysfunction and destruction. *Adv. Exp. Med. Biol.* **426**: 313-319.

McDonnell, J.M., Fushman, D., Milliman, C.L., Korsmeyer, S.J. y Cownburn, D. (1999) Solution structures of the proapoptotic molecule Bid: a structural basis for apoptosis agonist and antagonist. *Cell* **96**: 625-634.

Meister, A. (1973) On the enzymology of amino acid transport. *Science* **180**: 33-39.

Meister, A. y Anderson, M.E. (1983) Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* **52**: 711-760.

Meister, A. (1994) Glutathione, ascorbate and cellular protection. *Cancer Res. (Suppl.)* **54**: 1969-1975.

Meister, A. (1995) Mitochondrial changes associated with glutathione deficiency. *Biochim. Biophys. Acta* **1271**: 35-42.

Mephram, T.B. (1983) Physiological aspects of lactation. *Biochemistry of lactation*. Ed. Elsevier, Amsterdam, New York, pp: 3-28.

Messmer, U.K. y Brune, B. (1996) Nitric oxide-induced apoptosis: p53-dependent and p53-independent signalling pathways. *Biochem. J.* **319**: 299-305.

Messmer, U.K., Reimer, D.M., Reed, J.C. y Brune, B. (1996) Nitric oxide induced poly(ADP-ribose) polymerase cleavage in RAW 264.7 macrophage apoptosis is blocked by Bcl-2. *FEBS Lett.* **384**: 162-166.

Metcha-Grigoriou, F., Gerald, D. y Yaniv, M. (2001) The mammalian Jun proteins: redundancy and specificity. *Oncogene* **20**: 2401-2412.

Midgley, C.A. y Lane, D.P. (1997) p53 protein stability in tumor cells is not determined by mutation but is dependent on MDM2 binding. *Oncogene* **15**: 1179-1189.

Millar, T.M., Kanczler, J.M., Bodamyali, T., Blake, D.R. y Stevens, C.R. (2002) Xanthine oxidase is a peroxynitrite synthase: newly identified roles for a very old enzyme. *Redox Report* **7**: 1-6.

Moll, U., Ostermeyer, A.G., Haladay, R., Winkfield, B., Frazier, M. y Zambetti, G. (1996) Cytoplasmic sequestration of wild-type p53 protein impairs the G1 checkpoint after DNA damage. *Mol. Cell Biol.* **16**: 1126-1137.

Momand, J., Wu, H.H. y Dasgupta, G. (2000) MDM2-master regulator of the p53 tumor supresor protein. *Gene* **242**: 15-29.

Moncada, S., Palmer, R.M.J. y Higgs, E.A. (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43**: 109-142.

Moncada, S. y Erusalimsky, J.D. (2002) Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? *Nature* **3**: 214-220.

Moore, B.J., Gerardo-Gettens, T., Stern, J.S. y Horwitz, B.A. (1986) Hyperprolactinemia stimulates food intake in the female rat. *Brain Res. Bull.* **17**: 563-569.

Morrissey, J.J., McCracken, R., Kaneto, H., Vehaskari, M., Montani, D. y Klahr, S. (1994) Location of an inducible nitric oxide synthase mRNA in the normal kidney. *Kidney Int.* **45**: 998-1005.

Mosser, D.D., Caron, A.W., Bourget, L., Meriin, A.B., Sherman, M.Y., Morimoto, R.I. y Massie, B. (2000) The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Mol. Cell Biol.* **20**: 7146-7159.

Muraoka, R., Lenferink, A.E.G., Simpson, J., Brantley, D.M., Roebuck, L.R., Yakes, F.M. y Arteaga, C.L. (2001) Cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{kip1} is required for mouse mammary gland morphogenesis and function. *J. Cell Biol.* **153**: 917-931.

Murphy, M.P. (1999) Nitric oxide and cell death. *Biochim. Biophys. Acta* **1411**: 401-414.

Nagata, S. (1997) Apoptosis by death factor. *Cell* **88**: 355-365.

Nathan, C. (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* **6**: 3051-3064.

National Research Council Guide.(1996) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (7th ed.). Washington D. C. Natl. Acad. Press.

Neville, M.C., McFadden, T.B. y Forsyth, I. (2002) Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **7**: 49-66.

Newman, J. (1996) Así protege la leche de la madre al recién nacido. *Investigación y ciencia* Febrero: 50-54.

Nishio, E. y Watanabe, Y. (1998) No induced apoptosis accompanying the change of oncoprotein expression and the activation of CPP32 protease. *Life Sci.* **62**: 239-245.

Oates, P.S., Morgan, R.G. y Light, A.M. (1986) Cell death during pancreatic involution after raw soya flour feeding in rat. *Am. J. Physiol.* **250**: 9-14.

O'Connor, D.S., Grossman D., Plescia J., Li F., Zhang H., Villa A., Tognin S., Marchisio P.C. y Altieri D.C. (2000) Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 13103-13107.

Oda, K., Avakawa, H., Tanaka, T., Matsuda, K., Tanikana, C., Mori, T., Nishimori, H., Tamai, K., Tokino, T., Nakamura, Y. y Taya, Y. (2000) p53AIP1, a potencial mediator of p53 dependent apoptosis and its regulation by ser46 phosphorylated p53. *Cell* ? 849-862.

Ohki, R., Nemoto, J., Murama, H. y Oda, E. (2000) Reprimo, a new candidate mediator of the p53 mediated cell cycle arrest at the G2 phase. *J. Biol. Chem.* **275**: 22627-22630.

Oltvai, Z.N. y Korsmeyer, S.J. (1994) Checkpoints of dueling dimers foil death wishes. *Cell* **79**:189-192.

Onoda, M. e Inano, H. (1998) Localization of nitric oxide synthases and nitric oxide production in the rat mammary gland. *J. Histochem. Cytochem.* **46**: 1269-1278.

Ota, K. y Yokoyama, A. (1967) Body weight and food consumption of lactating rats nursing various sizes of litters. *J. Endocrinol.* **38**: 263-268.

Parrish, J., Li, L., Klotz, K., Ledwich, D., Wang, X. y Xue, D. (2001) Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in *C. elegans*. *Nature* **412**: 90-94.

Platt, N., Da Silva, R.P. y Gordon, S. (1998) Recognising death: the phagocytosis of apoptotic cells. *Trends Cell Biol.* **8**: 365-372.

- Pias, E.K. y Aw, T.A. (2002) Apoptosis in mitotic competent undifferentiated cells is induced by cellular redox imbalance independent of reactive oxygen species production. *FASEB J.* **16**: 781-790.
- Poderoso, J.J., Carreras, M.C., Lisdero, C., Riobo, N., Schopfer, F. y Boveris, A. (1996) Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles. *Arch. Biochem. Biophys.* **328**: 85-92.
- Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J.L., Kinzler, K.W. y Vogelstein, B. (1997) A model for p53-induced apoptosis. *Nature (London)* **389**: 300-305.
- Potten, C.S. (1992) The significance of spontaneous and induced apoptosis in the gastrointestinal tract of mice. *Cancer Met. Rev.* **11**: 179-195.
- Prentice, A.M. y Prentice, A. (1988) Energy costs of lactation. *Ann. Rev. Nutr.* **8**: 63-79.
- Prives, C. y Hall, P. (1999) The p53 pathway. *J. Pathol.* **187**: 112-126.
- Quarrie, L.H., Addey, C.V.P. y Wilde, C.J. (1996) Programmed cell death during mammary involution induced by weaning, litter removal and milk stasis. *J. Cell. Physiol.* **168**: 559-569.
- Rao, L., Perez, D. y White, E. (1996) Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J. Cell Biol.* **135**: 1441-1445.
- Reed, D.J. (1995) Cystathionine. *Methods Enzymol.* **252**: 92-102.
- Reed, J.C. (1997) Double identity for protein of the Bcl-2 family. *Nature* **387**: 773-776.
- Renz, A., Berdel, W.A., Kreuter, M., Belka, C., Schulze-Osthoff, K. y Los, M. (2001) Rapid extracellular release of cytochrome c is specific for apoptosis and marks cell death in vivo. *Blood* **98**: 1542-1548.

- Richter, B.W. y Duckett, C.S. (2000) The IAP proteins: caspase inhibitors and beyond. *Sci. STKE* 2000 (44): PE1.
- Robinson, A.M. y Williamson, D.H. (1977) Comparison of glucose metabolism in the lactating mammary gland of the rat in vivo and in vitro: effects of starvation, prolactin or insulin deficiency. *Biochem. J.* **164**: 153-159.
- Robinson, A.M., Girard, J.R. y Williamson, D.H. (1978) Evidence for a role of insulin in the regulation of lipogenesis in lactating rat mammary gland. Measurements of lipogenesis in vivo and plasma hormone concentrations in response to starvation and refeeding. *Biochem. J.* **176**:343-346.
- Rodriguez, J. y Lazebnik, Y. (1999) Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev.* **13**: 3179-3184.
- Rudel, T. y Bokoch, G.M. (1997) Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK 2. *Science* **276**: 1571-1574.
- Sakahira, H., Enari, M. y Nagata, S. (1998) Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* **391**: 96-99.
- Saleh, A., Srinivasula, S.M., Balkir, L., Robbins, P.D. y Alnemri, E.S. (2000) Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat. Cell Biol.* **2**: 476-483.
- Salgo, M.G., Squadrito, G.L. y Prior, W.A. (1995) Peroxynitrite causes apoptosis in rat thymocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **215**: 1111-1118.
- Salvesen, G.S. y Dixit, V.M. (1999) Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 10964-10967.
- Sampson, D.A. y Jansen, G.R. (1984) Measurement of milk yield in the lactating rat from pup weight gain. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **3**: 613-617.

- Sánchez- Góngora, E., Pastorino, J.G., Álvarez, L., Pajares, M.A., García, C., Viña, J.R., Mato, J.M. y Farber, J.L. (1996) Increased sensitivity to oxidative injury in Chinese hamster ovary cells stably transfected with rat liver S-adenosylmethionine synthetase. *Biochem. J.* **319**: 767-773.
- Savill, J. y Fadok, V. (2000) Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* **407**: 784-788.
- Schmid, D.S., Tite, J.P. y Ruddle, N.H. (1986) DNA fragmentation: Manifestation of target cell destruction mediated by cytotoxic T-cell lines, lymphotoxin-secreting helper T-cell clones and cell-free lymphotoxin-containing supernatant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 1881-1885.
- Schmidt, H.H.H.W. (1992) NO, CO and OH. Endogenous soluble guanylyl cyclase-activating factors. *FEBS Lett.* **307**: 102-107.
- Schmidt, H.H., Lohmann, S.M. y Walter, U. (1993) The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. *Biochem. Biophys. Acta* **1178**: 153-175.
- Schmidt, H.H.H.W. y Walter, U. (1994) NO at work. *Cell* **74**: 919-925.
- Schubert, K.M., Scheid, M.P. y Duronio, V. (2000) Ceramide inhibits protein kinase B/Akt by promoting dephosphorylation of serine 473. *J. Biol. Chem.* **275**: 13330-13335.
- Schwartz, D., Mendonca, M., Schwartz, I., Xia, Y., Satriano, J., Wilson, C.B. y Blantz, R.C. (1997) Inhibition of constitutive nitric oxide synthase (NOS) by nitric oxide generated by inducible NOS after lipopolysaccharide administration provokes renal dysfunction in rats. *J. Clin. Invest.* **100**: 439-448.
- Shaulian, E. y Karin, M. (2001) AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* **20**: 2390-2400.

Shimizu, S., Narita, M. y Tsujimoto, Y. (1999) Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* **399**: 483-487.

Sionov, R.V. y Haupt, Y. (1999) The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene* **18**: 6145-6157.

Smeyne, R. J., Vendrell, M., Hyward, M., Baker, S. J., Miao, G. G., Schilling, K., Robertson, L. M., Curran, T. y Morgan, J. I. (1993) Continuous *c-fos* expression precedes programmed cell death *in vivo*. *Nature (Lond.)* **363**: 166.

So, H.S., Park, R.K., Kim, M.S., Lee, S.R., Jung, B.H., Chung, S.Y., Jun, C.D. y Chung, H.T. (1998) Nitric oxide inhibits c-Jun N-terminal kinase 2 (JNK2) via S-nitrosylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **247**: 809-813.

Stefanon, B., Colitti, M., Gabai, G., Knight, C.H. y Wilde, C.J. (2002) Mammary apoptosis and lactation persistency in dairy animals. *J. Dairy Res.* **69**: 37-52.

Stein, T., Morris, J.S., Davies, C.R., Weber-Hall, S.J., Duffy, M-A., Heath, V.J., Bell, A.K., Ferrier, R., Sandilands, G.P. y Gusterson, B.A. (2004) Involution of the mouse mammary gland is associated with an immune cascade and an acute-phase response, involving LBP, CD14 and STAT3. *Breast Cancer Res.* **6**: R75-R91

Strange, R., Li, F. y Saurer, S. (1992) Apoptotic cell death and tissue remodeling during mouse mammary gland involution. *Development* **115**: 49-58.

Strasser, A., O'Connor, L. y Dixit, V.M. (2000) Apoptosis signaling. *Annu. Rev. Biochem.* **69**: 217-245.

Streuli, C.H., Schmidhauser, C., Bailey, N., Yurchenko, P., Skubitz, A.P.N., Rockelley, C. y Bissell, M.J. (1995a) Laminin mediates tissue-specific gene expression in mammary epithelia. *J. Cell Biol.* **129**: 591-603.

Streuli, C.H., Edwards, G.M., Delcommenne, M., Whitelaw, B.A., Burdon, T.G., Schindler, C. y Watson, C. (1995b) Stat5 as a target for regulation by ECM. *J. Biol. Chem.* **270**: 21639-21644.

Sun, W.M., Huang, Z.Z. y Lu, S.C. (1996) Regulation of glutamylcysteine synthetase by protein phosphorylation. *Biochem. J.* **320**: 321-328.

Sun, X.M, MacFarlane, M., Zhuang, J., Wolf, B.B., Green, D.R. y Cohen, G.M. (1999) Distinct caspase cascades are initiated in receptor-mediated and chemical-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **274**: 5053-5060.

Susin, S.A., Zamzami, N. y Kroemer, G. (1998) Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. *Biochim. Biophys. Acta* **1366**: 151-165.

Swamy, S.M. y Huat, B.T. (2003) Intracellular glutathione depletion and reactive oxygen species generation are important in alpha-hederin-induced apoptosis of P388 cells. *Mol. Cell Biochem.* **245**: 127-139.

Takeda, Y., Tashima, M., Takahashi, A., Uchiyama, T. y Okazaki, T. (1999) Ceramide generation in nitric oxide-induced apoptosis. Activation of magnesium-dependent neutral sphingomyelinase via caspase-3. *J. Biol. Chem.* **274**: 10654-10660.

Tamir, S. y Tannenbaum, S.R. (1996) The role of nitric oxide (NO) in the carcinogenic process. *Biochim. Biophys. Acta* **1288**: F31-36.

Tan, T., Wallis, J. y Levine, A.J. (1986) Identification of the p53 protein domain involved in the formation of the SV40 large antigen protein complex. *J. Virol.* **659**: 574-583.

Tanaka, H. (2000) A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell cycle checkpoint for DNA damage. *Nature* **404**: 42-45.

- Tate, S.S. y Meister, A. (1974) Interaction of γ -glutamyl transpeptidase with amino acids, dipeptides and derivatives and analogs of glutathione. *J. Biol. Chem.* **249**: 7593-7602.
- Thomas, J.P., Dorflinger, L.J. y Behrmar, H.R. (1978) Mechanism of the rapid antigonadotropin action of prostaglandins in cultured luteal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**: 1344-1348.
- Thomsen, L.L., Miles, D.W., Happerfield, L., Bobrow, L.G., Knwles, R.G. y Moncada, S. (1995) Nitric oxide synthase activity in human breast cancer. *Br. J. Cancer* **72**: 41-44.
- Thomson , A.M. y Hytten, F.E. (1973) Nutrition during pregnancy. *World Rev. Nutr. Diet.* **16**: 22-45.
- Thornberry, N.A. y Lazebnik, Y. (1998) Caspases: enemies within. *Science* **281**: 1312-1316.
- Torok, N.J., Higuchi, H., Bronk, S. y Gores, G.J. (2002) Nitric oxide inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release by nitrosylating caspase 9. *Cancer Res.* **62**: 1648-1653.
- Utz, P.J. y Anderson, P. (2000) Life and death decisions: regulation of apoptosis by proteolysis of signaling molecules. *Cell Death Differ.* **7**: 589-602.
- Van de Perre, P. (2003) Transfer of antibody via mother's milk. *Vaccine* **21**(24): 3374-3376.
- Vankelecom, H., Matthys, P. y Deneff, C. (1997) Involvement of nitric oxide in the interferon- γ -induced inhibition of growth hormone and prolactin secretion in anterior pituitary cell cultures. *Mol. Cell Endocrinol.* **129**: 157-167.
- Vaquero, M. (2000) Apoptosis: ser o no ser, ésa es la cuestión. *Med. Clin.* **114**: 144-156.

Vaux, D.L. (1993) Towards an understanding of the molecular mechanisms of physiological cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 786.

Verheij, M., Bose, R., Lin, X.H., Yao, B., Jarvis, W.D., Grant, S., Birrer, M.J., Szabo, E., Zon, L.I., Kyriakis, J.M., Haimovitz-Friedman, A., Fuks, Z. y Kolesnick, R. N. (1996) Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature* **380**: 75-79.

Vicent, S., Marty, L. y Fort, P. (1993) S26 protein RNA: an invariant control for gene regulation experiments in eucariotic cells and tissues. *Nucleic Acids Research*. **21**: 1498-1993.

Viña, J.; Puertes, I.R., Sáez, G. y Viña, J.R. (1981) Effect of premature weaning on amino acid uptake by the mammary gland of lactating rats. *Biochem. J.* **200**: 705-708.

Viña, J.R. y Williamson, D.H. (1981) Utilization of L-alanine and L-glutamine by lactating mammary gland of the rat. A role for L-alanine as a lipogenic precursor. *Biochem. J.* **196**: 757-762.

Viña, J.R. y Puertes, I.R. (1988) Metabolismo de la glándula mamaria durante la lactancia. En: "Bioquímica Perinatal (Aspectos básicos y patológicos)" (E.Herrera) Ed. Ceura. Madrid. Fundación Ramón Areces. pp:441-456.

Viña, J.R., García, C. y Barber, T. (2001) Regulation of aminoacid metabolism during lactation. *Recent Res. Devel. Nutrition* **4**: 101-111.

Vogelstein, B. y Kinzler, K.W. (1992) p53 function and dysfunction. *Cell* **70**: 523-526.

Vogelstein, B., Lane, D. y Levine, A.J. (2000) Surfing the p53 network. *Nature* **408**: 307-310.

Vousden, K.H. (2000) p53: death star. *Cell* **103**: 691-694.

- Wahl, G.M., Linke, S. D., Pawlson, T.G. y Huang, L.C. (1997) Maintaining genetic stability through TP53 mediated checkpoint control. *Cancer Surv.* **29**: 189-219.
- Walker, N.I., Bennet, R.E. y Kerr, J.F. (1989) Cell death by apoptosis during involution of the lactating breast in mice and rats. *Am. J. Anat.* **185**: 19-32.
- Wang, X.W. (1999) GADD45 induction of a G2/ M cell cycle checkpoint. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 3706-3711.
- Wang, X., Michael, D., de Murcia, G. y Oren, M. (2002) p53 activation by nitric oxide involves down-regulation of Mdm2. *J. Biol. Chem.* **277**: 15697-15702.
- Whitehead, R.G. (1983) Nutritional aspects of human lactation. *The Lancet* **1**:167-169.
- Wilde, C.J., Addey, C.V.P., Li, P. y Fernig, D.G. (1997) Programmed cell death in bovine mammary tissue during lactation and involution. *Exp. Physiol.* **82**: 943-953.
- Will, Y., Fischer, K.A., Horton, R.A., Kaetzel, R.S., Brown, M.K., Hedstrom, O., Lieberman, M.W. y Reed, D.J. (2000) γ -Glutamyltranspeptidase-deficient knockout mice as a model to study the relationship between glutathione status, mitochondrial function, and cellular function. *Hepatology* **32**: 740-749.
- Williamson, D.H. (1980) Integration of metabolism in tissues of the lactating rat. *FEBS Letters* **117**: K86-K92.
- Williamson, D.H., Munday, M.R. y Jones, R.G. (1984) Biochemical basis of dietary influences on the synthesis of the macronutrients of rat milk. *Federation Proc.* **43**: 2243-2247.
- Williamson, D.H., Lund, P. y Evans, R.D. (1995) Substrate and oxygen uptake by the lactating mammary gland. *Proc. Soc. Nutr.* **54**: 165-175.
- Wink, D.A., Vodovotz, Y., Laval, J., Laval, F., Dewhirst, M. y Mitchell, J.B. (1998) The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. *Carcinogenesis* **19**: 711-721.

- Wiseman, B.S. y Werb, Z. (2002) Stromal effects on mammary gland development and breast cancer. *Science* **296**: 1046-1049.
- Wollemberger, A., Ristau, O. y Sohoffa, G. (1960) Eine eine einfache technik der extrem schnellen abkuhlung großerer. *Pflujers Arch.* **270**: 399-412.
- Wyllie, A.H. (1980) Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* **284**: 555-556.
- Wyllie, A.H., Kerr, J.F.R. y Currie, A.R. (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *International Reviews in Cytology* **68**: 251-306.
- Wyllie, A.H., Rose, K.A. y Morris, R.G. (1987) Rodent fibroblast tumour expressing human c-myc and ras gene: growth, metastasis and endogenous oncogene overexpression. *Br. J. Cancer* **56**: 251-259.
- Wyllie, A.H. (1992) Apoptosis and teh regulation of cell number in normal and neoplastic tissue: an overview. *Cancer and metastasis reviews* **11**: 95-103.
- Yin, C., Knudson, C.M., Korsmeyer, S.J. y Van Dyke, T. (1997) Bax supresses tumorigenesis and stimulates apoptosis *in vivo*. *Nature* **385**: 637-640.
- Yonish-Rouach, E., Resnitzky, D., Lotem, J., Sachs, L., Kimchi, A. y Oren, M. (1991) Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature (Lond.)* **352**: 345.
- Zanzami N., Brenner C., Marzo I., Susin S.A. y Kroemer G. (1998) Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins. *Oncogene* **16**: 2265-2282.
- Zhan, Q., Fan, S., Bae, I., Gullouf, C., Liebermann, D.A., O'Connor, P.M. y Fornace, A.J. Jr. (1994) Induction of Bax by genotoxic stress in human cells correlates with normal p53 status and apoptosis. *Oncogene* **9**: 3743-3751.

Ziegler, A., Jonanson, A.S. y Leffell, D.J. (1994) Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature* **372**: 773-776.

Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A. y Wang, X. (1997) Apaf-1, a human protein homologous to *C. Elegans* CED-4, participates in cytochrome-c-dependent activation of Caspase-3. *Cell* **90**: 405-413.

Zweier, J.L., Samouilov, A. y Kuppusamy, P. (1999) Non-enzymatic nitric oxide synthesis in biological systems. *Biochim. Biophys. Acta* **1411**: 250-262.