



**Área de Fisiología
Departamento de Ciencias de la Salud
Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud
Universidad de Jaén**

**ESTUDIO DE LAS ACTIVIDADES ESPECÍFICAS DE LA
AMINOPEPTIDASA REGULADA POR INSULINA (IRAP/P-LAP) Y
LAS AMINOPEPTIDASAS FORMADORAS DE ANGIOTENSINA IV EN
EL SUERO DE MUJERES CON CÁNCER DE MAMA.**

**Julia Martínez Ferrol
Trabajo de Investigación Tutelado
Jaén, 2006**

Esta Memoria de Investigación Tutelada ha sido realizada en la Unidad de Patología Mamaria del Complejo Hospitalario de Jaén y en el Área de Fisiología del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad de Jaén, dentro del Grupo de Investigación de la Junta de Andalucía denominado “Fisiología y Patología Experimental y Clínica” (código CVI 296), y bajo la dirección de los Dres. María Jesús Ramírez Expósito y José Manuel Martínez Martos. Los resultados obtenidos han sido enviados para su publicación a la revista *Clinical Chemistry*.

Para la realización de este trabajo se ha contado con la subvención de las Ayudas a los Grupos de Investigación de la Junta de Andalucía. Este estudio cuenta con la aprobación del Comité Local de Ensayos Clínicos y la Comisión de Ética e Investigación Sanitaria del Complejo Hospitalario de Jaén.

Julia Martínez Ferrol: Licenciada en Medicina y Cirugía por la Facultad de Medicina, Universidad de Granada (año 1978), especialidad en Radiodiagnóstico (Jaén 1981); Facultativo Especialista de Área del Complejo Hospitalario de Jaén, en el Servicio de Radiología, con dedicación preferente en la Unidad de Patología Mamaria.

1. INTRODUCCIÓN

El carcinoma de mama es la neoplasia más frecuentemente diagnosticada y causa importante de morbimortalidad en la mujer. En vista de la heterogeneidad que presenta tanto en términos de su perfil biológico como de su progresión clínica, se hace necesario contar con parámetros que colaboren en la elaboración de un pronóstico certero y un tratamiento eficaz. Los factores pronósticos clásicos en el cáncer de mama son el tamaño del tumor, el estado de los ganglios linfáticos, el estado de los receptores hormonales y el grado tumoral (grado nuclear e histológico) (Russo, 1992). La determinación de receptores de hormonas esteroideas sirve fundamentalmente como indicador de la susceptibilidad al tratamiento hormonal.

Estos datos han demostrado su capacidad de pronosticar la supervivencia total y libre de enfermedad en pacientes con ganglios metastásicos y no metastásicos (Harry, 1996; Clark, 1996).

Otros factores pronósticos como oncogenes, factores de crecimiento, enzimas, pueden caracterizar el comportamiento del tumor con respecto al grado de diferenciación, tasa de crecimiento, intervalo libre de enfermedad y capacidad metastásica.

El papel de las proteasas en los fenómenos de invasión y metástasis ha sido ya demostrado (Romain et al.1990). La CatepsinaD (CatD), proteasa que se encuentra en los lisosomas, vesículas intracelulares, fagosomas y endosomas de las células tumorales, es regulada por estrógenos y factores de crecimiento, y se puede sobreexpresar tanto en tumores que tienen receptores para estrógenos como en los que no los tienen (Rocheffort 2000). La sobreexpresión y la secreción de CatD en cáncer de mama están asociadas al riesgo de recidivas y a las metástasis. Esta enzima facilita el crecimiento y la invasión de células tumorales.

Otros grupos enzimáticos proteolíticos, como es el caso de las aminopeptidasas, han recibido menor atención. Su participación en los procesos neoplásicos se estableció hace más de cuarenta años (Burstone,1956), implicados de forma local y sistémica en el crecimiento e invasión tumoral.

2. FISIOLÓGÍA DE LA GLÁNDULA MAMARIA.

2.1. Desarrollo de la glándula mamaria.

El desarrollo y la función de la glándula mamaria son estimulados por distintas hormonas, entre ellas los esteroides sexuales, la prolactina, la oxitocina, el cortisol, la hormona tiroidea y la hormona del crecimiento. Los efectos tróficos y trópicos de las hormonas reproductoras (estrógenos, progesterona y prolactina) son extremadamente importantes en ambos aspectos.

El estrógeno desencadena el desarrollo ductal, teniendo un potencial efecto mitótico (carcinogénico) sobre el epitelio mamario. También aumenta la cantidad de receptores para estrógeno y progesterona en las células epiteliales (Mauvais-Jarvis y cols, 1986). La progesterona determina el desarrollo lobulillar al actuar sobre la diferenciación de las células epiteliales. Asimismo, puede limitar el desarrollo del sistema tubular al disminuir la fijación del estrógeno al epitelio mamario (Mauvais-Jarvis y cols, 1986). La prolactina actúa sobre el desarrollo del tejido adiposo y, junto al cortisol y la hormona del crecimiento, participa en el crecimiento y el desarrollo del epitelio mamario. También aumenta la cantidad de receptores estrogénicos (Muldoon, 1986) y colabora de forma sinérgica con los estrógenos en el desarrollo ductal y con la progesterona en el desarrollo alveololobulillar (Franzt y Wilson, 1985). Estimula la lactogénesis durante la fase avanzada del embarazo y el periodo posparto y la diferenciación de las células productoras de leche. El papel de la hormona del crecimiento, el cortisol y la hormona tiroidea son menos claros.

La secreción de estas hormonas es regulada por hormonas hipotalámicas e hipofisarias. La secreción ovárica de estrógenos y progesterona es regulada a través de la secreción de gonadotropinas por parte de la hipófisis anterior: hormona luteinizante (LH) y hormona foliculoestimulante (FSH). Ambas están reguladas a su vez desde el hipotálamo por la secreción de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). La secreción de LH, FSH y GnRH es regulada por el estrógeno y la progesterona mediante efectos de retroalimentación positiva y negativa (Keller-Wood y Bland, 1991).

La secreción de hormonas mamogénicas varía durante toda la vida de la mujer y estos cambios hormonales son responsables del patrón normal de desarrollo de la glándula mamaria. En el recién nacido de sexo femenino los niveles de estrógeno y progesterona descienden el día después del nacimiento (eran producidos por la placenta). Durante la infancia dichos niveles permanecen muy bajos debido a la alta sensibilidad del eje hipotálamo-hipofisario a los efectos de retroalimentación negativa de los esteroides sexuales. En la pubertad se produce una disminución de la sensibilidad a la retroalimentación negativa por parte del estrógeno y la progesterona y un incremento de la sensibilidad a la retroalimentación positiva por parte del estrógeno. Todo ello provoca un aumento de la secreción de GnRH, y sucesivamente de LH, FSH, y finalmente de estrógeno y progesterona por parte del ovario. El comienzo del ciclo menstrual se produce por un mecanismo de retroalimentación positiva del estrógeno (Styne y Grombach, 1986).

Durante el ciclo menstrual, las concentraciones hormonales sufren variaciones. En la fase folicular temprana, las concentraciones crecientes de LH y

FSH estimulan el crecimiento de los folículos ováricos y la secreción de estrógeno, cuyo aumento de concentración limita nuevos incrementos de LH y FSH a través de un mecanismo de retroalimentación negativa. En la fase folicular tardía la elevada concentración de estrógeno estimula un pico secretorio de LH y FSH en la mitad del ciclo a través de un mecanismo de retroalimentación positiva. El pico hormonal de LH es seguido de la ovulación, y el epitelio y el estroma foliculares dan lugar al cuerpo lúteo. Durante la fase lútea del ciclo menstrual se produce un aumento de las concentraciones plasmáticas de estrógeno y progesterona (Odell y Moyer, 1971).

En el embarazo inicialmente el estrógeno y la progesterona son producidos por el cuerpo lúteo ovárico bajo la influencia de la hormona gonadotrofina coriónica (hCG). Posteriormente a partir de la duodécima semana son producidos por la placenta hasta el final del embarazo con niveles que aumentan de forma progresiva. También aumentan progresivamente los niveles de prolactina, llegando a ser al final del embarazo diez veces superiores a los de una mujer no gestante. La secreción de prolactina puede ser estimulada por una hormona hipotalámica aún no bien conocida, también por la hormona hipotalámica (TRH) liberadora de la tirotrófina (TSH). El principal factor de control de liberación de la prolactina en la mujer no embarazada es el factor inhibidor hipotalámico, la dopamina.

2.2. Desarrollo mamario fetal y neonatal.

En el feto humano existen estructuras mamarias rudimentarias, cuyo desarrollo temprano está determinado por la producción de estrógeno y progesterona por la placenta y por la prolactina fetal (Haagensen, 1986). En el momento del nacimiento, la glándula mamaria consiste en un sistema de conductos ramificados que confluyen en el pezón con la configuración de una ampolla y existe actividad secretoria en los alvéolos ramificantes (Frantz y Wilson, 1985; Haagensen, 1986; Salazar y Robon, 1974). A veces, en las primeras semanas de vida, se produce una secreción mamaria de escasa cuantía denominada "leche de brujas", transparente, similar al calostro, debido a la disminución de esteroides placentarios junto a concentraciones relativamente elevadas de prolactina secretada por la hipófisis del neonato (Frantz y Wilson, 1985; Anderson, 1974). Durante la infancia, la glándula permanece inactiva, siendo su crecimiento isométrico con la proliferación del tejido estromal y la elongación de los conductos en proporción al crecimiento corporal global. No existe desarrollo lobulillar (Drife, 1986; Salazar y Robon 1974).

2.3. Desarrollo puberal.

El desarrollo de la mama normalmente supone el primer cambio morfológico de la pubertad, relacionado con los cambios en los niveles de estradiol, y al parecer también con los niveles del factor de crecimiento de tipo insulínico I (somatomedina), (Anderson, 1974; Drife, 1986; Haagensen, 1986). El estrógeno estimula la proliferación del epitelio ductal, de las células mioepiteliales y de las células estromales circundantes. La progesterona y el estrógeno inducen la formación de los componentes acinares secretorios en la parte más distal de los conductillos. También estimulan la proliferación del tejido conectivo, que reemplaza al tejido adiposo y ejerce una función de soporte. De igual modo, actúan sobre la proliferación de tejido adiposo e inducen un aumento de tamaño proporcional y la pigmentación del pezón y la areola. Normalmente, en el curso de 1 a 2 años tras la menarquia, la mama ya posee la estructura correspondiente a una glándula madura.

2.4. Cambios mamarios durante el ciclo menstrual.

El volumen mamario es mayor durante la segunda mitad del ciclo, con un aumento premenstrual del tamaño, densidad, nodularidad y sensibilidad. El aumento premenstrual del tamaño puede tener relación con un aumento de tamaño de los lobulillos sin que exista proliferación epitelial (Drife, 1986; Haagensen, 1986). Durante la fase proliferativa aumenta el número de mitosis de las células acinares del lobulillo. En la fase folicular, decrece la actividad mitótica. En la fase lútea los tejidos de interior del lobulillo están más edematosos y hay congestión venosa, lo cual justifica, en parte, las molestias premenstruales (Vogel et al.1981). La congestión y el edema progresivos del parénquima remiten cuando se produce la menstruación.

2.5. Cambios en el embarazo.

La glándula mamaria aumenta de tamaño, la piel areolar se oscurece y las glándulas areolares se hacen más prominentes, el pezón aumenta de tamaño y se encuentra erecto, los conductos y los lobulillos proliferan y tiene lugar el desarrollo de los alvéolos. Aparece un incremento del flujo sanguíneo mamario y las células mioepiteliales se hipertrofian (Vorherr, 1978; Cowie y Tinda1971; Salazar y Robon 1974). Durante todo el embarazo tiene lugar una gran proliferación a nivel de las estructuras ductales y alveolares. El aumento de la secreción de la prolactina induce la proliferación y diferenciación de las células troncales para formar células alveolares presecretorias y células mioepiteliales. La acción lactotrófica o mamogénica de la prolactina precisa la presencia de cortisol, insulina, hormona del

crecimiento y factor de crecimiento epidérmico. El lactógeno placentario (hPL) o somatomamotrofina, es una sustancia de acción lactotrófica, estructuralmente relacionada con la prolactina, cuya secreción aumenta durante el embarazo proporcionalmente con el aumento de peso placentario. Todos estos cambios consiguen que al final del embarazo la glándula mamaria esté preparada para la secreción activa (Haagensen, 1986; Salazar y Robon 1974).

2.6. Lactancia.

El mantenimiento de la producción normal de leche requiere la extracción regular de leche y la estimulación del reflejo neural para la secreción de prolactina. La estimulación de los nervios aferentes del pezón provoca la liberación de oxitocina desde la hipófisis posterior y de prolactina desde la hipófisis anterior. El mantenimiento de la producción y secreción de leche en la mujer requiere la presencia de un eje hipotálamo-hipofisario indemne, una dieta y nutrición adecuadas, la liberación regular (succión) de la leche secretada y la ausencia de tensiones psicológicas que puedan interferir en el control normal de la oxitocina o la prolactina (Cowie y Tindal, 1971; Frantz y Wilson 1985; Grosvenor y Mena, 1974).

2.7. Posmenopausia.

Parece que existe acuerdo en que la mama sufre cambios involutivos con el envejecimiento, pero el calendario de esta involución no está claro. Existen cambios atróficos en un largo periodo, y puede variar de una mujer a otra. La involución estaría más relacionada con las alteraciones hormonales de la menopausia, aunque existen estudios (Huston et al., 1985) que sugieren que la involución se inicia antes de la perimenopausia (tercera o cuarta década de la vida). Se produce así una involución progresiva de los componentes ductales y glandulares de las mamas. El parénquima mamario es reemplazado por tejido adiposo y estromal en lugar de estructuras glandulares, disminuyendo el tejido conectivo y, por tanto, perdiendo su estructura lobulillar, densidad y configuración características (Cowie y cols, 1980; Haagensen, 1986; Dirk, 1991; Frantz y Wilson 1985; Grosvenor y Mena, 1974; Yen, 1986). No está claro en qué medida el reemplazo graso se debe a una ganancia de peso generalizada o reflejo real de un cambio histológico (Wolfe, 1976).

3. FISIOPATOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA.

El cáncer de mama es una enfermedad que en la actualidad está adquiriendo una importancia creciente en todo el mundo. Los índices más elevados se detectan en los países industrializados de Europa y Norteamérica, pero el índice de

crecimiento es mucho más lento en los países desarrollados que en los países en vías de desarrollo de Asia y Sudamérica.

En cuanto a la edad y el sexo, el cáncer de mama es raro en los hombres y en las personas jóvenes, siendo la incidencia proporcional de mujer:hombre de 100:1. A nivel mundial se ha observado un aumento creciente de los índices de incidencia específicos por edades hasta la edad de la menopausia.

Por razas, se ha observado que las mujeres blancas registran un mayor índice global de incidencia de cáncer de mama que las mujeres de raza negra (Gray y cols, 1980). Esta diferencia no se manifiesta antes de los 40 años y se hace más marcada solamente después de la menopausia, y puede ser debido a factores de riesgo conocidos (menarquia temprana, menopausia tardía y edad avanzada en el primer embarazo a término). En un estudio reciente se ha observado que las mujeres afroamericanas tienen un incremento de la incidencia de cáncer de mama antes de los 45 años, y baja incidencia después de esa edad, con respecto a las mujeres blancas (Bernstein y cols, 2003). También se ha visto que existen diferencias internacionales entre países desarrollados y en vías de desarrollo. Algunos autores observaron entre la población de inmigrantes, que los índices de incidencia de cáncer de mama estaban relacionados con el país de adopción más que con el país de origen (Buell, 1973).

También se ha constatado que la mortalidad por cáncer de mama es mayor en las clases socioeconómicas más elevadas, y menor en los niveles socioeconómicos más bajos (Logan, 1982).

Existen una serie de factores relacionados con el aumento de riesgo para padecer un cáncer de mama. Entre ellos, son muy importantes los antecedentes familiares: si una mujer tiene una historia familiar de cáncer de mama corre un riesgo aumentado de padecer esa enfermedad a lo largo de su vida, habiéndose publicado incluso una guía práctica para calcular ese riesgo mediante tablas de probabilidad (Ottman y cols, 1983). Si el cáncer de mama se ha presentado en un familiar de primer grado, el riesgo es de 1.7 a 4.0 veces mayor que el de la población general (Offit y Brown, 1994).

Para conocer mejor los factores genéticos implicados, a finales de 1980 se realizaron estudios de segregación que establecieron que la predisposición genética al cáncer de mama explica una proporción de los casos de cáncer de mama familiar: el cáncer de mama hereditario (autosómico dominante). Sin embargo, el cáncer de mama esporádico supone el 90% de los casos, que se originan como un cúmulo casual a causa de la incidencia de la enfermedad entre la población general (Claus y cols, 1991). Dichos estudios revelaron la existencia de varios genes implicados en

la predisposición al cáncer de mama: BRCA 1 y BRCA2. Otros menos importantes son el p53 y el PTEN (Hall y cols, 1990; Easton y cols, 1993; Wooster y cols, 1994). En las pacientes portadoras de BRCA 1 o BRCA2, al tener un riesgo aumentado de padecer cáncer de mama a lo largo de su vida (50-85 % antes de los 70 años), se estudia la necesidad de realizar prevención en ellas, unas veces mediante tratamiento quirúrgico profiláctico, y otras mediante quimioprevención, sobre la que existen numerosos estudios en la actualidad, con agentes como el tamoxifeno (Brekelmans, 2003).

Las pacientes con mayor riesgo son aquellas con antecedentes familiares de cáncer de mama premenopáusico bilateral, estimándose que tiene un 51 % de probabilidades de desarrollar un cáncer de mama antes de los 70 años de edad. Sin embargo el riesgo entre los familiares de mujeres con cáncer de mama unilateral es menor, con un riesgo del 20 % a lo largo de toda su vida. Al parecer, la susceptibilidad al cáncer de mama sería transmitida tanto por línea paterna como materna, y el riesgo sería directamente proporcional al número de familiares afectados (Anderson, 1974), aunque es mayor cuando se hereda a partir de la madre y pasa por dos o tres generaciones, y menor cuando se hereda del padre cuyas hermanas no heredaron esta predisposición (Gauthier-Villars y cols, 1999).

El riesgo de desarrollar un segundo cáncer de mama primario después de un primer tumor primario, es hasta 5 veces superior al de la población general, y guarda relación inversa con la edad en el momento de presentación del primer cáncer (Chaudary y cols, 1984). Los cánceres primarios de ovario o de endometrio también se asocian con un mayor riesgo de cáncer de mama.

Por lo que respecta a la enfermedad fibroquística de la mama, no existe relación entre cambios fibroquísticos sin proliferación y cáncer de mama (Dupont 1993). Sin embargo, el riesgo aumenta cuatro veces en los casos con HDA (hiperplasia ductal atípica). Si además tiene antecedentes de cáncer de mama de primer grado, el riesgo es de 8 a 12 veces más (Bathia, 1996; John, 1993; Dupont y Page, 1985).

La menarquia temprana (antes de los 12 años de edad) y la aparición de ciclos menstruales regulares en el año siguiente, parece relacionarse con un riesgo de cáncer de mama más de tres veces superior (Henderson y cols, 1981), determinado por una mayor exposición a los estrógenos (Brian y cols, 1997).

La menopausia antes de los 45 años de edad determina un riesgo dos veces menor de cáncer de mama, comparado con las mujeres con menopausia después de los 55 años de edad (Trichopolus y cols, 1972).

Se ha descrito un importante efecto protector de un primer embarazo a

término a una edad temprana, llegando a tener la mitad de riesgo de padecer un cáncer de mama que las nulíparas, si esa primera gestación se completa antes de los 20 años (MacMahon y cols, 1970). Las mujeres que completan su primera gestación a una edad tardía tienen un riesgo mayor que las nulíparas (Bruzzi y cols, 1988). Una alta paridad conlleva cierto grado de protección adicional (Lipnick y cols, 1984). Este efecto protector del embarazo se puede explicar porque en las multíparas se ha observado una disminución de las concentraciones de prolactina con respecto a las nulíparas, y un aumento de los valores de la globulina ligadora de hormonas sexuales; ello hace que los títulos de estradiol libre en sangre sean menores que en las nulíparas y que, por tanto, disminuya el riesgo de padecer una neoplasia mamaria (Applewhite y cols, 1973).

El aborto durante el primer trimestre de la gestación antes del primer embarazo a término, tanto espontáneo como inducido, se ha relacionado con un mayor riesgo de cáncer de mama (Hadjimichael y cols, 1986; Pike y cols, 1981). En cambio en otros estudios no se ha demostrado dicha relación (Ye y cols, 2002).

La lactancia parece tener cierto efecto protector (Byers y cols, 1985; McTiernan y Thomas, 1986). Un estudio chino demostró una reducción del 30 % en el riesgo por cada 5 años de lactancia materna (Yuan y cols, 1988).

La actividad sexual en mujeres nulíparas también protege, y se ha demostrado que los niveles de oxitocina aumentan con el orgasmo en mujeres y varones (Murrell, 1995).

Las radiaciones ionizantes, tras seguimiento de mujeres sometidas a tratamiento de tuberculosis y mastitis o tras las explosiones atómicas, se ha visto que suponen un aumento del riesgo sobre el cáncer de mama que es directamente proporcional a las dosis de radiaciones e inversamente proporcional a la edad de la mujer en el momento de la exposición (Howe, 1984). Son especialmente peligrosas entre la pubertad y los 30 años, con un pico entre 15 -18 años. No parece existir riesgo si la exposición es después de los 40 años, por lo que las mamografías realizadas a partir de esta edad no suponen un aumento del riesgo.

El peso corporal también influye, aunque esto se limita al periodo postmenopáusico, asociándose las mujeres obesas a un riesgo de 1.5 a 2 veces mayor, y estando relacionado sobre todo con el consumo de grasa animal (Rose y cols, 1986), por la acción sobre el metabolismo de los estrógenos. Una dieta baja en grasas animales y carbohidratos refinados y rica en ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados y fitoestrógenos, produce una disminución de estradiol y testosterona y un aumento de globulina transportadora de hormonas sexuales (Berrino y cols, 2001).

El alcohol se ha vinculado con un incremento de los niveles sanguíneos de estrógenos. También puede interferir con el uso del organismo de los folatos, que protegen contra el crecimiento tumoral. Hay estudios que demuestran que mujeres que toman dos o más bebidas por día de vino, cerveza o licor tienen un 40 % más de probabilidad de desarrollar cáncer de mama que las mujeres que no beben ningún alcohol (Harvard, 2000).

El tabaco también parece incrementar el riesgo. En experimentos animales y estudios in vitro se ha visto que los componentes del humo del tabaco (hidrocarburos policíclicos, aminas aromáticas y N-nitrosaminas) pueden inducir tumores mamaríos por cambios en el DNA y mutación del gen p53 (Terry y Rohan, 2002).

El ejercicio físico muestra un claro beneficio para las mujeres postmenopáusicas, de forma que aquellas que realizan alguna actividad física, al menos una hora a la semana tienen un 15-20 % menos probabilidad de desarrollar un cáncer de mama que las mujeres sedentarias.

Los anticonceptivos hormonales orales combinados no tienen ningún efecto sobre el riesgo de cáncer de mama cuando se utilizan entre los 25 y los 39 años, aunque se usen durante muchos años (Kalache y cols, 1983). Otros estudios más recientes indican que el uso de anticonceptivos orales durante más de 4 años antes del primer embarazo a término, supone un pequeño incremento del riesgo (6.5 casos extras/10.000 mujeres de edad 20-29 años), que persiste durante 10 años tras el cese de la medicación (Fentiman, 2002).

El tratamiento prolongado con estrógeno en mujeres postmenopáusicas incrementa el riesgo de cáncer de mama (Lippman y cols, 2001). El tratamiento hormonal sustitutivo supone un incremento del riesgo relativo del 2.3 % al año. Este riesgo desaparece 5 años después de dejar el tratamiento. No se ha demostrado que incremente el riesgo de muerte por cáncer de mama (Fentiman, 2002). Los moduladores selectivos del receptor estrogénico son una alternativa al tratamiento hormonal sustitutivo, sin el efecto secundario sobre el cáncer de mama en las mujeres postmenopáusicas (Diamanti-Kandarakis y cols, 2003).

Como factor perinatal del riesgo adulto de cáncer de mama, se ha visto que las mujeres nacidas después de embarazos con pre-eclampsia pueden tener una reducción superior al 50 % en el riesgo de cáncer de mama, comparado con otras mujeres cuyas madres tuvieron embarazos no complicados (Nilsen y Vatten, 2002).

El cáncer de mama no puede explicarse como consecuencia de una sola causa. Su desarrollo supone un proceso con múltiples etapas en las que se produce interacción de múltiples hormonas y factores de crecimiento, activación de

oncogenes y pérdida de supresores tumorales (Nass y Davidson, 1999). Korenman en 1980, planteó una hipótesis en la que la estimulación estrogénica en ausencia de progesterona sería el contexto más favorable para la inducción del cáncer de mama. Los periodos perimenarquia y perimenopausia serían los principales determinantes del riesgo aumentado, al tener en común ciclos anovulatorios irregulares. Henderson en 1984 propuso un modelo hormonal para intentar explicar el desarrollo del cáncer de mama. De él se desprende que la prevención del cáncer de mama depende fundamentalmente de la modificación de la secreción y el metabolismo de los estrógenos y la prolactina. Como factores endocrinos se ha observado que las mujeres postmenopáusicas con cáncer de mama se asocian con niveles de estrógenos más elevados que las mujeres sanas (Key y Pike, 1988). En las mujeres premenopáusicas los resultados fueron mucho menos constantes, existiendo, por tanto, una disminución de la magnitud de la diferencia entre las pacientes y las mujeres sanas con el paso del tiempo. También se ha descrito una menor exposición a la progesterona en las pacientes con cáncer de mama (Key y Pike, 1988), pero un posible efecto protector de la progesterona es dudoso dado que incrementa los efectos de la prolactina (promueve el crecimiento del cáncer de mama en los roedores). En cuanto a la testosterona, se han encontrado niveles más elevados en las mujeres con cáncer de mama. La oxitocina actúa como un regulador del crecimiento a través de su unión a receptores específicos de membrana (Cassoni y cols, 2001; Wesley y cols, 2002). Se ha demostrado su efecto antiproliferativo sobre células epiteliales de mama y endometrio, tanto in vitro como in vivo, al actuar modulando la expresión de los receptores de estrógenos en células neoplásicas humanas (Cassoni y cols, 2002). No hay correlación entre la presencia de receptores de oxitocina en el cáncer de mama y la edad de las pacientes, estadio del tumor, positividad de receptores estrogénicos, expresión de oncogenes y rango de proliferación. Por el contrario, sí existe correlación con los receptores de progesterona (Sapino y cols, 1998). El gen de expresión de la vasopresina es un rasgo selectivo en todos los cánceres de mama, y los productos de esta expresión pueden ser útiles como marcadores para la detección temprana de esta enfermedad y como posibles blancos para la inmunoterapia (North y cols, 1995).

La acción de carcinógenos químicos sobre el epitelio mamario, como los radicales libres de oxígeno, puede inducir la proliferación de fibroblastos, hiperplasia del epitelio, atipia celular y cáncer de mama. Los carcinógenos químicos pueden acumularse en el fluido mamario en la mama no lactante por la producción de radicales libres de oxígeno debido a la hipoxia tisular local. Esta está causada por la distensión glandular acinar ocasionada por el fluido mamario secretado por los

niveles altos de prolactina en ausencia de oxitocina. La estimulación del pezón en una mama no lactante puede incrementar los niveles de oxitocina plasmática y disminuir los niveles de prolactina. La contracción de las células mioepiteliales de la mama, bajo la influencia de la oxitocina, puede disminuir la distensión acinar y la hipoxia y, por tanto, disminuir el daño ocasionado por los radicales libres de oxígeno. La epidemiología de la fibrosis mamaria y el cáncer se apoya en que la falta de estimulación del pezón puede ser una variable significativa (Murrell, 1991).

Últimamente se ha investigado más acerca de los mecanismos moleculares que intervienen en la biología del cáncer de mama.

Se han descrito una serie de receptores celulares hormonales, que son esenciales en la regulación de la diferenciación celular y la integridad epitelial. Los más importantes son los receptores de estrógeno y progesterona, cuyo papel en la regulación del crecimiento del cáncer de mama ha sido claramente establecido (Fisher y cols, 1986). La estrategia terapéutica va dirigida a la modulación de estos receptores, tanto como su validación como marcadores de pronóstico en el cáncer de mama.

La vitamina D también juega un papel importante; se ha visto que inhibe *in vitro* la proliferación de células cancerosas derivadas del epitelio (mama, próstata y colon) (Stoica y cols, 1999). Las pacientes con cáncer de mama con tumores con receptores de vitamina D positivos tienen un intervalo libre de enfermedad significativamente más largo que aquellos con tumores con receptores negativos (Colston y co/s, 1989). Los niveles de receptores de vitamina D son mayores en cánceres de mama invasivos que en el tejido mamario normal (Friedrich y cols, 1998).

Los receptores retinoides también juegan un papel relevante. Los carcinomas mamaríos inducidos por carcinógenos son sensibles a los efectos antiproliferativos de los retinoides (Bishoff y cols, 1998; Wu Y cols, 2002). Las líneas celulares con receptores estrogénicos positivos muestran una gran sensibilidad a los retinoides, al contrario de aquellas con receptores negativos (Klinge y cols, 1997).

El receptor de hormona tiroidea también parece estar implicado. Se ha visto que las mujeres con carcinoma de tiroides han sufrido un incremento de la incidencia de cáncer de mama (Vassilopoulou-Sellin y cols, 1999). Esta asociación podría explicarse por el desarrollo de un estado hipotiroideo asociado con una disregulación del receptor tiroideo en el tejido mamarío o por efecto del tratamiento tiroideo sustitutivo.

Otros mecanismos moleculares implicados parecen tener relación con la regulación del ciclo celular, interacciones entre células, modulación de la apoptosis

y la angiogénesis celular (Cristofanilli y Hortobagyi, 2002).

El gen p53 también juega un papel esencial en el proceso del cáncer de mama. La exposición de las células al estrés activa la proteína p53 supresora tumoral, esencial para una respuesta eficiente al daño del DNA y la hipoxia. La pérdida de función del gen p53 influye en el desarrollo del cáncer, relacionándose su disfunción con tumores más agresivos, metástasis más precoces y disminución de la supervivencia (Pharoah y cols, 1999). También con un peor pronóstico y más baja quimiosensibilidad en el cáncer de mama (Elleged y Allred, 1998).

4. AMINOPEPTIDASAS Y CÁNCER DE MAMA.

En la actualidad se conoce relativamente poco sobre el papel de los enzimas proteolíticos reguladores del tipo de las aminopeptidasas en el cáncer de mama, a pesar de que estas enzimas están implicadas en el metabolismo de varias hormonas peptídicas que tienen importantes funciones autocrinas y/o paracrinas. De este modo, los cambios o alteraciones en las actividades aminopeptidasas pueden reflejar el estado funcional a nivel local de sus correspondientes substratos, los cuales puede estar activados o inhibidos de forma selectiva en el tejido afectado por las condiciones especiales promovidas por el proceso tumoral. Estudios previos han demostrado un importante papel de algunos de estos enzimas proteolíticos reguladores en el cáncer de mama, utilizando este modelo animal inducido por NMU. Así, se ha demostrado la existencia de una muy importante relación entre la actividad oxitocinasa y el número y tamaño de los tumores observados (Carrera et al., 2004; Carrera et al., 2005). Existe una actividad proteolítica reguladora muy relacionada con la actividad oxitocinasa, que es la denominada aminopeptidasa regulada por insulina (IRAP), una aminopeptidasa de la superficie celular, que se conoce también como leucina aminopeptidasa placentaria (P-LAP) (Toda et al, 2002; Rogi et al, 1996), y que en este trabajo vamos a denominar como actividad IRAP/P-LAP. Recientemente se ha descrito que la IRAP/P-LAP es, a su vez, el receptor de angiotensina IV del tipo AT4 (Chai et al. 2004), por lo que cobra especial relevancia el posible papel de los enzimas proteolíticos reguladores formadores de angiotensina IV, las denominadas aminopeptidasa N (APN) y aminopeptidasa B (APB), en el cáncer de mama.

A continuación, siguiendo a Barret *et al.* (1998) y Beynon *et al.* (2001), se expone un breve resumen de algunas de las características y propiedades de los enzimas anteriormente citados.

4.1. Aminopeptidasa Regulada por Insulina/Leucina Aminopeptidasa Placentaria (IRAP/P-LAP).

- Clasificación de peptidasas: Clan MF, familia M17, MEROPS ID: M17.001

- Clasificación enzimática del NC-IUBMB: E.C. 3.4.11.1.

Acción. Libera un aminoácido N-terminal, preferentemente Leu pero pueden ser otros aminoácidos, incluyendo Pro aunque en menor medida, de péptidos, aminoacil-S-naftilamidas y aminoacil-D-nitroanilidas.

Sustrato

artificial. Leu-S-naftilamida

Propiedades

moleculares. Metalopeptidasa monomérica de 324 KDa. Se inhibe por amastatina y bestatina. Se activa por iones de metales pesados (Mn^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+}). El sitio activo tiene dos Zn^{2+} . pH óptimo de 9-9.5. (Figura 1).

Distribución. Enzima ampliamente distribuida y localizada en células de animales, plantas y también en bacterias.

Aspectos

biológicos. La función precisa en animales todavía no es bien conocida, aunque parece actuar en la degradación de oligopéptidos, incluyendo péptidos hormonales. La IRAP/P-LAP es de una importancia biológica y médica significativa, ya que su actividad se encuentra alterada en patologías como el cáncer (Umezawa, 1980) y cataratas (Taylor *et al.*, 1982). Además puede participar en estadios tempranos de la infección de HIV y ser, su actividad sérica un marcador de la infección por HIV y de respuesta a quimioterapia (Pulido-Cejudo *et al.*, 1997).

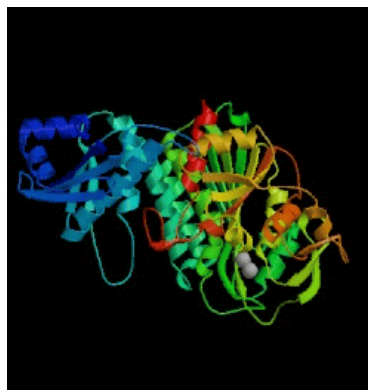


Figura 1. Estructura tridimensional propuesta para la enzima IRAP/P-LAP.

4.2. Aminopeptidasa N (APN).

- Clasificación de peptidasas: Clan MA, familia M1, MEROPS ID: M01.001

- Clasificación enzimática del NC-IUBMB: E.C. 3.4.11.2.

También llamada aminopeptidasa M y CD13.

Acción. Libera un aminoácido N-terminal, preferiblemente Ala, aunque pueden ser muchos aminoácidos como Phe, Tyr, Leu y otros en menor grado, de péptidos, aminoacil- α -naftilamidas, aminoacil-Dnitroanilidas y aminoacil-metilcumarinas. Cuando un residuo terminal va seguido de Pro, los dos pueden ser liberados como un dipéptido.

Sustrato artificial. Ala- α -naftilamida

Propiedades

moleculares. Es una metaloenzima altamente glicosilada por carbohidratos (20%). En su estado nativo existe como homodímero de 140-150 KDa en muchas especies, aunque se ha descrito como monomérica en el conejo (Feracci y Maroux, 1980). La cadena polipéptidica intacta (") es susceptible de proteólisis generando dos fragmentos de 90 (\$) y 45 (C) KDa con un átomo de Zn²⁺ por subunidad. No se activa por iones de metales pesados y se inhibe por agentes quelantes, bestatina, amastatina, probestina y ultimamente 3-amino-2-tetralona. Su pH óptimo está alrededor de 7, y al aumentar la concentración de sustrato puede llegar a 9.

Distribución. Es una proteína de membrana integral de tipo II, localizada en la membrana plasmática como una ectoenzima, muy distribuida entre diferentes especies y tejidos, como en el sistema hematopoyético, en concreto en la línea mielo-monocítica (Lendeckel *et al.*, 1999), en las membranas del borde en cepillo de hígado, riñón, intestino delgado, (con funciones típicas de estos lugares) en las células endoteliales vasculares angiogénicas (Bhagwat *et al.*, 2001) y en cerebro.

Aspectos

biológicos. La presencia de este enzima en el cerebro ha sido muy estudiada debido a su potencial implicación en la hidrólisis e inactivación de

acciones de ciertos neuropéptidos, especialmente de encefalinas, también de la sustancia P y la interleukina 8, citoquinas y péptidos inmunomoduladores (Hoffman *et al.*, 1993; Kanayama *et al.*, 1995; Mathe, 1987), angiotensinas (Chansel *et al.*, 1998; Palmieri *et al.*, 1985, 1989), pudiendo contribuir a la degradación de la matriz extracelular (Fugii *et al.*, 1995; Saiki *et al.*, 1993) y al procesamiento de antígenos (Hansen *et al.*, 1993). Además está presente en células endoteliales y membranas sinápticas de varios tipos de células nerviosas, con funciones relacionadas con cada tipo celular. También actúa en el catabolismo del glutatión, en la reabsorción de aminoácidos y ha sido considerada un receptor de ciertos virus como coronavirus (Delmas *et al.*, 1992) y citomegalovirus (Giugni *et al.*, 1996).

4.3. Aminopeptidasa B.

- *Clasificación de peptidasas:* Clan MA, familia M1, MEROPS ID: M01.014

- *Clasificación enzimática del NC-IUBMB:* E.C. 3.4.11.6.

Acción. Libera residuos básicos (Arg, Lys) N-terminales de L-aminoacil- β -naftilamidas, L-aminoácido-4-metilcumarinas y de varios péptidos como las encefalinas, somatostatina y kalidina 10 (que se convierte en bradikinina).

Sustrato

artificial. Arg- β -naftilamida.

Propiedades

moleculares. Es una zinc-metalopeptidasa de 72,3 KDa con un átomo de Zn²⁺ unido a su única cadena proteica. Su pH óptimo es 7. Se inhibe por agentes quelantes (EDTA, EGTA y 1,10-fenantrolina) y por inhibidores clásicos como la bestatina y amastatina. Se activa por Cl⁻ a concentraciones fisiológicas y bajas concentraciones de tioles.

Distribución. Es un enzima de membrana o soluble ampliamente distribuido en diferentes tejidos de mamíferos y varias líneas celulares, tanto en tipos celulares endocrinos y no endocrinos (Foulon *et al.*, 1999).

Aspectos

biológicos. Su ubicuidad argumenta en favor de su adaptabilidad en varios subcompartimentos celulares y su implicación en un amplio espectro de fenómenos fisiológicos, tales como procesos inflamatorios (Hopsu y Mäkinen, 1966), en el procesamiento proteolítico de neuropéptidos (Gainer *et al.*, 1984) y en el desarrollo de tumores (Saiki *et al.*, 1989).

5. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS.

Trabajos previos han descrito importantes cambios en la actividad oxitocinasa con el cáncer de mama, tanto a nivel del tejido tumoral en humanos, como en el suero de ratas con tumores de mama inducidos por la administración de NMU. La aminopeptidasa regulada por insulina (IRAP), también denominada leucina aminopeptidasa placentaria (P-LAP), está relacionada con la actividad oxitocinasa. El presente trabajo pretende analizar la actividad IRAP/P-LAP en el suero de pacientes con diagnóstico de cáncer de mama y evaluar su papel como marcador tumoral y su relación con el grado de enfermedad, según clasificación TNM de tumores. Además, se ha descrito recientemente que este enzima es también el receptor de angiotensina IV AT4, por lo que se analiza también la actividad de dos enzimas proteolíticos reguladores implicados en el metabolismo de la angiotensina III para formar angiotensina IV, la aminopeptidasa N (APN) y la aminopeptidasa B (APB). La actividad de estos enzimas proteolíticos reguladores es importante porque puede dar luz sobre el papel que tienen hormonas tales como la oxitocina, vasopresina o las hormonas del sistema renina angiotensina (RAS) en la promoción y progresión del cáncer de mama.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. *Pacientes y Muestras.*

El presente estudio se ha realizado en 27 pacientes con cáncer de mama, diagnosticadas, evaluadas y tratadas en la Unidad de Patología mamaria del Complejo Hospitalario de Jaén, entre los meses de noviembre de 2004 a Abril de 2005. De cada paciente se obtuvo información relativa al tipo histológico del tumor y clasificación TNM (tamaño tumoral, ganglios afectados y existencia de metástasis a distancia). Como grupo control, se ha utilizado a 25 mujeres voluntarias de entre el personal del Complejo Hospitalario de Jaén, pertenecientes al mismo rango de edad, y que manifestaron no tener enfermedad conocida. De las mujeres de ambos grupos se obtuvo una muestra de sangre por venipunción en tubos Vacutainer sin anticoagulante. Para la obtención del suero, se centrifugó la muestra a 3000 xg

durante 10 minutos. Estas muestras fueron congeladas y almacenadas a -80°C para su posterior procesamiento.

6.2. Clasificación TNM de los tumores de mama.

El sistema TNM para la descripción de la extensión anatómica de la enfermedad se basa en la valoración de tres componentes (AJCC, Cancer Staging Manual 2002; ASCO, 2003):

- * T: Tamaño del tumor primario (en su mayor dimensión).
- * N: Ausencia o presencia de metástasis en los ganglios linfáticos regionales.
- * M: Ausencia o presencia de metástasis a distancia.

La adición de números a estos tres componentes indica la extensión de la enfermedad maligna, de la forma siguiente: T0/T1/T2/T3/T4 - N0/N1/N2/N3 - M0/M1.

Esta clasificación sólo se aplica a los carcinomas, por lo que debe existir confirmación histológica de la enfermedad. Debe registrarse la sublocalización anatómica de origen, pero no se tiene en cuenta respecto a la clasificación.

En el caso de que existan tumores múltiples simultáneos en una mama, se debe utilizar el tumor con la mayor categoría T. Los tumores de mama bilaterales y simultáneos deben clasificarse de forma independiente.

Por lo que respecta a las localizaciones y sublocalizaciones anatómicas, la clasificación es como sigue: 1. Pezón (C50.0); 2. Zona central (C50.1); 3. Cuadrante superointerno (C50.2); 4. Cuadrante inferointerno (C50.3); 5. Cuadrante superoexterno (C50.4); 6. Cuadrante inferoexterno (C50.5); 7. Prolongación axilar (C50.6).

Los ganglios linfáticos regionales son los siguientes:

1. Axilares (homolaterales): ganglios interpectoriales (Rotter) y ganglios de la vena axilar y sus tributarias, que pueden dividirse en los siguientes niveles:
 - i. Nivel I (axilares inferiores): ganglios por fuera del borde externo del músculo pectoral menor.
 - ii. Nivel II (axilares medios): ganglios localizados entre los bordes interno y externo del músculo pectoral menor y ganglios interpectoriales (Rotter).
 - iii. Nivel III (axilares superiores): ganglios por dentro del borde interno del músculo pectoral menor, incluidos los ganglios denominados subclaviculares, infraclaviculares o apicales. Nota: Los ganglios linfáticos intramamarios se clasifican como ganglios axilares.
2. Mamarios internos (homolaterales): ganglios localizados en los espacios intercostales a lo largo del borde del esternón en la fascia endotorácica. Cualquier metástasis en ganglios linfáticos diferentes a estos se clasifican como metástasis

a distancia (M1), incluidos los ganglios supraclaviculares, cervicales o mamarios internos contralaterales.

La clasificación clínica TNM queda, por tanto, del siguiente modo: T, Tumor primario; TX, No se puede evaluar el tumor primario; T0, No existen signos de tumor primario; Tis, Carcinoma in situ: carcinoma intraductal, o carcinoma lobular in situ, o enfermedad de Paget del pezón sin tumor. La enfermedad de Paget asociada a un tumor se clasifica en función del tamaño del tumor; T1, Tumor de diámetro máximo menor o igual a 2 cm; T1 mic, microinvasión menor o igual a 0.1 cm; T1a, diámetro máximo menor o igual a 0.5 cm; T1b, diámetro máximo mayor de 0,5 cm, pero menor o igual a 1 cm; T1c, diámetro máximo mayor de 1 cm, pero menor o igual a 2 cm; T2, tumor de diámetro máximo mayor de 2 cm, pero menor o igual a 5 cm; T3, tumor de diámetro máximo mayor de 5 cm; T4, tumor de cualquier tamaño con extensión directa a la pared del tórax o a la piel. La pared torácica incluye las costillas, los músculos intercostales y el músculo serrato mayor, pero no los músculos pectorales; T4a, extensión a la pared torácica; T4b, edema (incluida la piel de naranja), o ulceración de la piel de la mama, o presencia de nódulos cutáneos satélites confinados a la misma mama; T4c, 4a y 4b conjuntamente; T4d, Carcinoma inflamatorio. El carcinoma inflamatorio de la mama se caracteriza por una induración de la piel con un borde erisipeloides, generalmente sin ninguna masa palpable subyacente. Si la biopsia de piel es negativa y no existe un cáncer primario localizado mensurable, al realizar la clasificación anatomopatológica de un carcinoma inflamatorio clínico (T4d), la categoría T correspondiente es pTx. En las pacientes con tumor maligno en que la mamografía demuestra la existencia de un edema difuso cutáneo y subcutáneo, debe practicarse una biopsia de piel para determinar si se trata de un T4b. Si se demostraran émbolos tumorales en los vasos linfáticos de la dermis, se incluye como T4d (carcinoma inflamatorio), aunque la clínica no sea la clásica. La presencia de pequeñas depresiones de la piel, la retracción del pezón u otros cambios cutáneos, excepto los descritos en las categorías T4b y 4d, pueden aparecer en las categorías T1, T2 y T3 sin que se afecte la clasificación.

Por lo que respecta a los ganglios linfáticos regionales (parámetro N), la clasificación es: NX, no se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales; N0, no se demuestran metástasis ganglionares regionales; N1, metástasis en ganglios axilares homolaterales móviles; N2, metástasis en ganglios axilares homolaterales fijados a otro ganglio o a otra estructura, o clínicamente aparentes ganglios c.mamaria interna homolaterales en ausencia de evidentes ganglios metastasicos axilares (N2a y N2b , respectivamente); N3, metástasis en ganglios infraclaviculares

homolaterales con o sin afectación axilar, o afectación de c. mamaria interna homolateral y afectación axilar, o metástasis en ganglios supraclaviculares homolaterales con o sin afectación axilar o c. mamaria interna (N3a,N3b y N3c, respectivamente).

Finalmente, por lo que respecta a las metástasis a distancia (parámetro M), la clasificación es: MX, no puede valorarse la presencia de metástasis; M0, ausencia de metástasis; M1, existencia de metástasis a distancia. La categoría M1 puede especificarse más siguiendo las siguientes nomenclaturas:

PUL, pulmonares; MAR, médula ósea; OSS, óseas; PLE, pleura; HEP, hepáticas; PER, peritoneales; BRA, cerebrales; SKI, cutáneas; LYM, ganglionares; OTH, otras.

Por lo que respecta a la clasificación por estadíos, se tendría: Estadío 0, Tis N₀ M₀; Estadío I, T₁ N₀ M₀; Estadío IIA, T₀₋₂ N₁ M₀ o T₂₋₃ N₀ M₀; Estadío IIB, T₂ N₁ M₀ o T₃ N₀ M₀; Estadío IIIA, T₃ N₁₋₂ M₀ o T₁ N₂ M₀; Estadío IIIB, cualquier T₄ N₃ M₀; Estadío IIIC, cualquier T N₃ M₀; Estadío IV, cualquier T M₁.

También hay que tener en cuenta los conceptos de multifocalidad y multicentricidad para el cáncer de mama

- * Multifocalidad: Presencia de nódulos de carcinoma separados entre si 5 o más cm. y en un mismo cuadrante mamario.
- * Multicentricidad: Presencia de nódulos de carcinoma separados entre si 5 o más cm. y localizados en distintos cuadrantes de una misma mama.

Por lo que respecta a los grados histológicos se simboliza con la letra "G", y pueden ser: GX, donde el grado de diferenciación no puede ser valorado; G1, con tumor bien diferenciado; G2, con tumor moderadamente diferenciado; G3, con tumor pobremente diferenciado; y G4, con tumor indiferenciado. El grado citohistológico final es resultado de la suma de los puntos del grado histológico + grado nuclear + grado mitótico, valorando cada uno de ellos de 1 a 3 de menor a mayor grado. De este modo, se tiene que: Grado histológico con túbulos bien desarrollados (>7%), 1; Moderada formación de túbulos, 2; Mínima o ausencia de formación de túbulos, 3; Grado nuclear; uniformes en tamaño, 1; Moderada variación tamaño, 2; Pleomorfismo/anaplasia, 3. Grado mitótico bajo (0-10 mitosis) 1; medio (11-22 mitosis) 2; alto (más de 21 mitosis) 3; El resultado final de la clasificación sería Grado I (3-5 puntos); Grado II (6-7 puntos) y Grado III (8-9 puntos).

La estadificación clínica se hará mediante exploración física, asociando técnicas de imagen (mamografía,ecografía) en las que se valorará el tamaño tumoral. La afectación ganglionar, igualmente se hará mediante exploración física de la axila y región supraclavicular, también se puede asociar a los estudios de

imagen, como la ecografía que se realizara en el estudio pre-tratamiento. Las posibles metástasis a distancia se valoraran mediante radiografía de tórax ,ecografía hepática y gammagrafía ósea.

6.3. Análisis de las Actividades Aminopeptidasas.

Las actividades IRAP/P-LAP, APN y APB se analizaron fluorimétricamente, usando leucil- β -naftilamida (LeuNNap), alanil- β -naftilamida (AlaNNap) o arginil- β -naftilamida (ArgNNap) como sustratos, de acuerdo con el siguiente método: diez microlitros de cada muestra de suero se incubaron a 37°C durante 30 minutos con 100:1 de solución de incubación que contenía 100: M de LeuNNap, AlaNNap ó ArgNNap y 0.65 mM de ditioneitol (DTT) en tampón fosfato 50mM a pH 7.4.

Todas las actividades fueron determinadas por triplicado. La cantidad de β -naftilamina obtenida como resultado de la actividad enzimática fue medida fluorimétricamente a una longitud de onda de emisión de 412 nm y de excitación de 345 nm. La actividad enzimática específica se expresó en picomoles de sustrato hidrolizado por minuto y por miligramo de proteína, utilizando una curva estándar de β -naftilamina determinada en las mismas condiciones.

6.4. Determinación de Proteínas.

El método de determinación de proteínas utilizado en nuestros experimentos se basa en el descrito en 1976 por Bradford, basado en la afinidad del colorante Coomassie azul brillante G-250 por las proteínas. La unión del colorante a las proteínas genera un cambio en la longitud de onda de máxima absorción del colorante desde 465 nm a 595 nm. Este incremento de absorción es directamente proporcional a la concentración de proteínas, siempre que haya exceso de colorante. El método es capaz de medir : g de proteínas por lo que se considera ideal para los experimentos realizados.

Para la determinación de proteínas se han empleado 10 : l de muestra a las que se añade 2 ml de una solución acuosa de Coomassie G azul brillante. El blanco de la prueba consiste en 2 ml de esta solución en ausencia de muestra. Los valores de absorbancia leídos con un espectrofotómetro a 595 nm, se transforman en mg de proteínas por ml, empleando una recta de calibrado obtenida tras medir por el mismo procedimiento concentraciones crecientes de una solución de albúmina sérica bovina. Cada muestra se mide por triplicado.

6.5. Recogida y Análisis de Datos.

Los datos personales correspondientes a las mujeres participantes en el presente estudio, así como los resultados obtenidos de los distintos análisis para cada mujer, han sido almacenados en una base de datos Excel, que es de carácter secreto. Para analizar las diferencias entre el grupo de mujeres control y el grupo de mujeres con cáncer de mama, se ha utilizado el test de la *t*-de Student. Los estudios de regresión múltiple se llevaron a cabo utilizando como criterio al valor mínimo para el estadístico *C_p* de Mallows. Para ello se ha utilizado el software Statgraphics Plus versión 5.0. Se consideraron significativos valores de $P < 0.05$.

7. RESULTADOS.

7.1. Parámetros de Clasificación Tumoral.

Los parámetros de clasificación tumoral de las pacientes con cáncer de mama analizadas son los siguientes: T (tamaño del tumor): 2.05 ± 0.15 cm; N (número de ganglios afectados): 0.50 ± 0.093 ; M (metástasis a distancia): no se detectaron. En la figura 2 se muestra un ejemplo de para la valoración del tamaño tumoral por mamografía y la identificación de ganglio afecto de la axila en una paciente con cáncer de mama.

7.2. Actividad específica de IRAP/P-LAP, APN y APB del suero de mujeres controles y mujeres con cáncer de mama.

El análisis de la actividad específica de IRAP/P-LAP, APN y APB del suero de mujeres controles y mujeres con cáncer de mama, muestra los siguientes resultados:

La actividad específica IRAP/P-LAP muestra un incremento significativo ($p < 0.05$) del 18.2 % en mujeres con cáncer de mama con respecto a las mujeres controles (figura 3A).

La actividad específica APN muestra un incremento significativo ($p < 0.01$) del 30.5 % en mujeres con cáncer de mama con respecto a las mujeres controles (figura 3B).

La actividad específica APB muestra un incremento significativo ($p < 0.01$) del 101.3 % en mujeres con cáncer de mama con respecto a las mujeres controles (figura 3C).

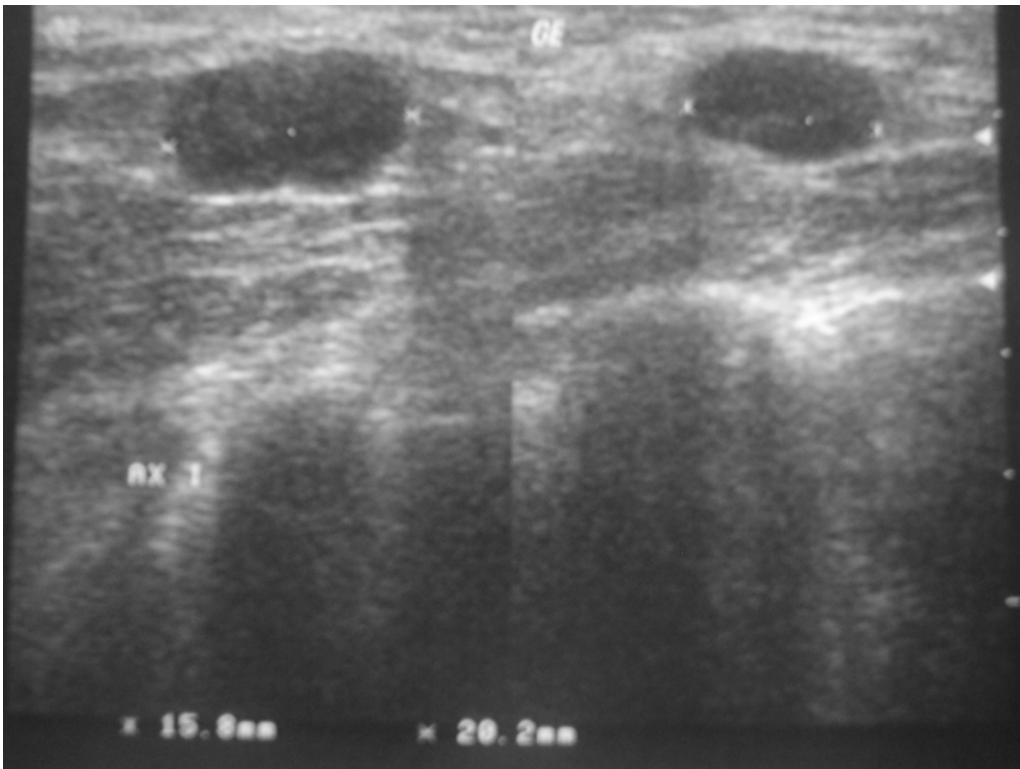
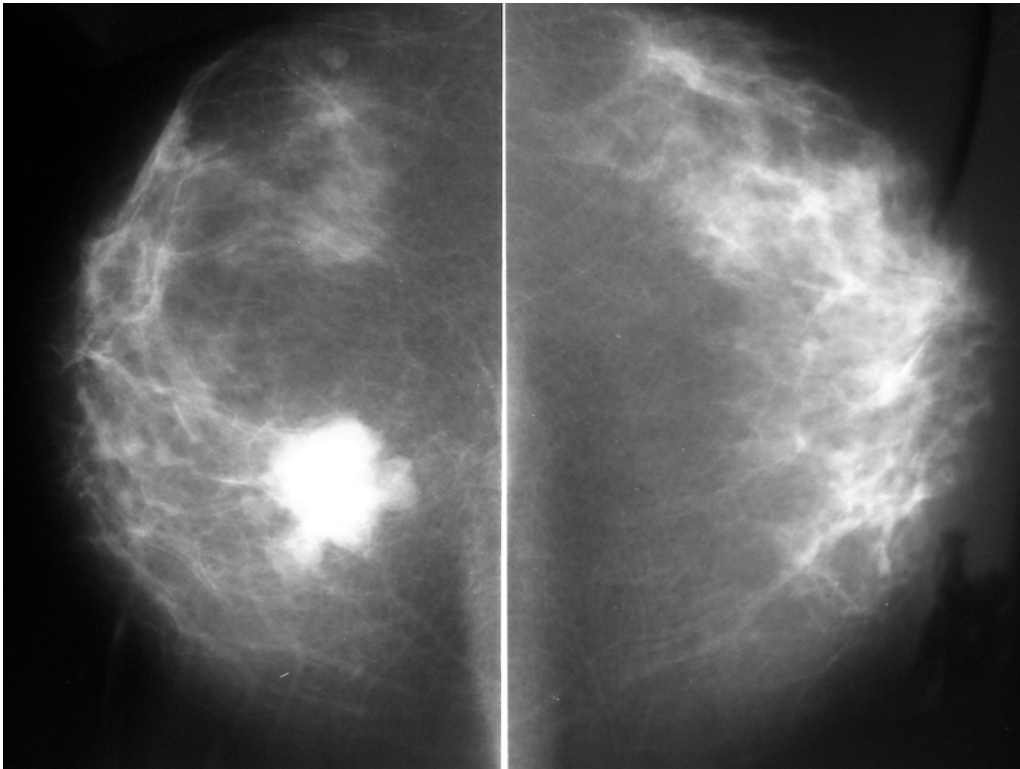


Figura 2. Ejemplo de valoración por mamografía del tamaño tumoral de una paciente con cáncer de mama (arriba) e identificación de ganglio afecto de la axila (abajo).

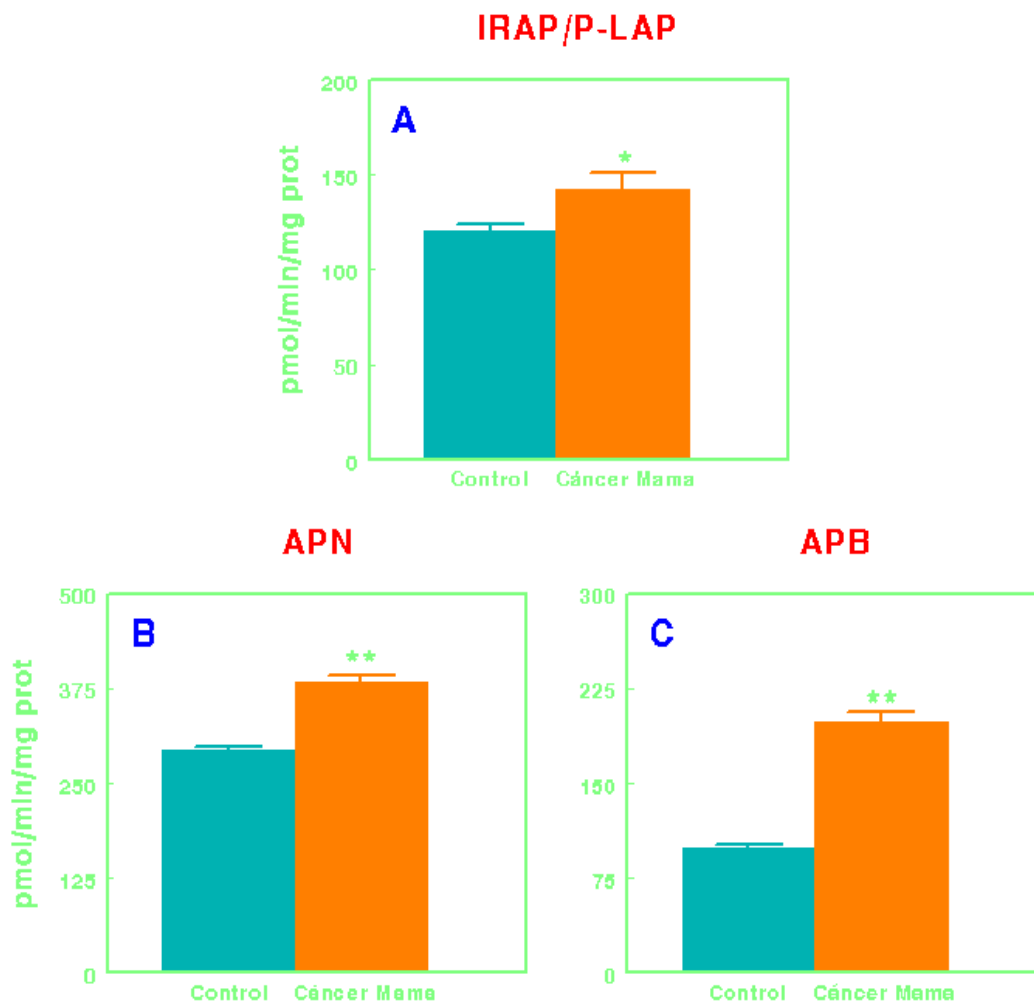


Figura 3. Representación de los valores de actividad específica IRAP/P-LAP (A), APN (B) y APB (C) del suero de mujeres control y mujeres con cáncer de mama. Los resultados se expresan, respectivamente, en picomoles de leucina- β -naftilamida, alanina- β -naftilamida y arginina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm EEM; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; $n = 25-27$).

7.3. Estudios de regresión entre los parámetros de caracterización tumoral y la actividad específica de IRAP/P-LAP, APN y APB del suero de mujeres con cáncer de mama.

Las tablas 1 y 2 muestran los resultados de los análisis de regresión múltiple entre la actividad específica de IRAP/P-LAP, APN y APB, el tamaño tumoral y la afectación ganglionar respectivamente.

El modelo de la tabla 1 describe la relación significativa ($p=0.01$) entre el tamaño del tumor y la actividad específica de IRAP/P-LAP y APN, siendo su ecuación:

$$\text{Tamaño tumoral} = -0.665 + 0.0054 \cdot \text{APN} - 0.0071 \cdot \text{APB} + 0.0042 \cdot \text{IRAP/P-LAP}$$

El valor de R^2 indica que este modelo explica el 31% de la variabilidad del tamaño tumoral de las mujeres con cáncer de mama.

Tabla 1. Modelo de Regresión Múltiple para el Tamaño Tumoral ^a .		
Variable	Coefficiente de Regresión	Error estándar
Constante	2902	130
IRAP/P-LAP	984	38
APN	-594	30

^an = 27; Cp de Mallows = 2.0; Error estándar de la estimación: 0.86; R = 0.555; R² = 0.308; p = 0.01.

El modelo de la tabla 2 describe la relación significativa ($p=0.05$) entre el número de ganglios afectados y la actividad específica IRAP/P-LAP, APN y APB, siendo su ecuación:

$$\text{Tamaño tumoral} = 2.902 - 0.00594 \cdot \text{APN} + 0.0098 \cdot \text{IRAP/P-LAP}$$

El valor de R^2 indica que este modelo explica el 32% de la variabilidad en la afectación ganglionar de las mujeres con cáncer de mama.

Tabla 2. Modelo de Regresión Múltiple para la Afectación Ganglionar ^a .		
Variable	Coefficiente de Regresión	Error estándar
Constante	-665	905
IRAP/P-LAP	42	19
APN	54	37
APB	-71	41

^an = 27; Cp de Mallows = 4.0; Error estándar de la estimación: 0.51; R = 0.563; R² = 0.317; p = 0.05;

5. DISCUSIÓN.

Los niveles de enzimas séricas en enfermedades neoplásicas han sido estudiados por muchos investigadores (Schwartz, 1976; Taper *et al.*, 1986; Hamano *et al.*, 1987) y actualmente se sabe que se puede obtener una información muy útil sobre la progresión y regresión de enfermedades malignas mediante la determinación de diversas actividades enzimáticas en suero (Severini *et al.*, 1991). En el presente trabajo se han analizado las actividades séricas de tres aminopeptidasas en mujeres con cáncer de mama: IRAP/P-LAP, APN y APB. Los resultados muestran que todas ellas se encuentran altamente incrementadas, y que están significativamente relacionadas tanto con el tamaño de los tumores como con el número de gánglios afectados en estas pacientes.

La enzima IRAP/P-LAP es una proteína de membrana de tipo II. Su clonación demostró que IRAP y P-LAP son los correspondientes homólogos en rata y humanos de la misma proteína (Rogi *et al.*, 1996). La actividad específica IRAP/P-LAP es particularmente interesante en el estudio del cáncer de mama debido a su papel regulador de la hormona peptídica oxitocina. La oxitocina ha sido descrita por ser común en células de mama sana pero raramente o nunca ha sido detectada en cáncer de mama (North *et al.*, 1995) y además la oxitocina inhibe la proliferación de líneas celulares de cáncer de mama en humanos (Cassoni *et al.*, 1994) pudiendo tener un papel en la predicción de esta enfermedad (Murrell, 1995). Por último, estudios *in vivo* han demostrado que la oxitocina reduce significativamente el crecimiento del carcinoma mamario de ratón denominado TS/A (Sapino *et al.*, 1998). En humanos, algunos autores describen un incremento muy significativo de la actividad oxitocinasa en tejido tumoral que es particularmente interesante desde el punto de vista de su papel en la hidrólisis de oxitocina (Itoh y Nagamatsu, 1995).

La oxitocina actúa como un factor regulador del crecimiento a través de la activación de receptores específicos (OTR), que se encuentran acoplados a proteínas G y que se encuentran localizados en la superficie celular (Sapino *et al.*, 1998; Cassoni *et al.*, 2001). A diferencia de otros sistemas de receptores hormonales, en los que la respuesta biológica es modulada por los cambios en la concentración de hormona, el sistema oxitocina/OTR es regulado preferentemente por los cambios en la expresión de los OTR, si bien los reguladores de los niveles de dichos receptores en glándula mamaria no son conocidos (Copland *et al.*, 1999). Mediante técnicas inmunocitoquímicas y RT-PCR, se han detectado OTR y ARNm de OTR tanto en el tejido normal como en el patológico (Cassoni *et al.*, 2001). En la mama humana, los OTR se han detectado en las células mioepiteliales que

discurren a lo largo de los lóbulos normales, y en células intraductales en el caso de lesiones hiperplásicas benignas. Los OTR también se han descrito en algunos casos de carcinomas de mama primarios metastásicos (Bussolati et al., 1996), pero no está nada claro si dichos receptores son funcionales, y se sugiere que la interacción entre oxitocina y OTR podría ser muy importante en el origen y evolución de lesiones tales como los carcinomas de mama. También se ha descrito un incremento significativo de la actividad oxitocina sa en el suero de ratas con cáncer de mama inducido por NMU (Carrera et al., 2004). La actividad específica de este enzima correlaciona con el número y tamaño de los tumores y, en menor medida, con el peso corporal de los animales, cuyo cambio más significativo tiene lugar de forma concomitante a la aparición de los tumores. La menor disponibilidad de oxitocina sugerida por estos resultados podría ser también la responsable del incremento en el número de OTR descrito por otros autores en el cáncer de mama. Los resultados obtenidos en el presente trabajo, que reflejan un aumento significativo de la actividad IRAP/P-LAP, también sugieren que los niveles de oxitocina estarían disminuidos en el suero de las mujeres con cáncer de mama. Por lo tanto, el papel de la oxitocina como regulador del crecimiento en patologías neoplásicas, siendo además confirmado el efecto inhibitor sobre el crecimiento de carcinomas mamarios en rata y ratón *in vivo*, y el imprevisto papel de la oxitocina y sus análogos en la regulación de la proliferación celular, así como la difusa expresión de sus receptores en tejido neoplásico de distinto origen, abre nuevas perspectivas sobre el papel biológico del sistema oxitocina-OTR en cáncer (Cassoni et al., 2001).

Para nuestro conocimiento, no está descrita en la literatura la relación entre la IRAP/P-LAP y el cáncer de mama, a pesar de que si están bien descritos niveles alterados de P-LAP en diversas condiciones patológicas (Taylor et al., 1984), y se utiliza la actividad específica P-LAP como marcador clínico de diversas patologías (Buffone et al., 1988). Solamente Gupta y colaboradores (Gupta et al., 1989) han estudiado la actividad P-LAP en el suero de mujeres con cáncer de mama, encontrando también un incremento significativo, que correlaciona, además, con el estadio clínico de la enfermedad y con los subtipos histológicos de carcinoma mamario, lo que les permitía proponer a la actividad P-LAP del suero como un indicador pronóstico sensible del grado de invasión del carcinoma mamario. Nuestro grupo si ha descrito en estudios en rata con cáncer de mama inducido por N-metil-nitrosourea (NMU) un incremento significativo de la actividad IRAP/P-LAP en el suero de los animales con tumores (Carrera et al., 2006).

Por lo que respecta a la APN y APB, también muestran un incremento

significativo en el suero de mujeres con cáncer de mama. Esto nos indica que en el cáncer de mama estaría favorecido el metabolismo rápido de la Ang III a Ang IV, cuyos niveles estarían aumentados, frente a los del precursor AngII, que estarían disminuidos. Las funciones de la AngIV están mediadas por el receptor de angiotensina de tipo 4, AT4. Como hemos comentado, recientemente se ha descrito (Chai et al., 2004) que este receptor es la propia IRAP/P-LAP, y que de hecho, los ligandos del receptor AT4 inhiben de forma dosis-dependiente la actividad catalítica de la IRAP/P-LAP (Albiston et al., 2001). Aunque nuestros resultados no explicarían un efecto inhibitor de la AngIV sobre la actividad IRAP/P-LAP, si que podemos concluir que tanto la actividad IRAP/P-LAP como las actividades formadoras de AngIV están implicadas de alguna manera en el cáncer de mama, aunque no se conozca el mecanismo exacto. En este sentido, aunque no está descrito en la literatura la relación entre la AngIV y el cáncer de mama, si que nos gustaría apuntar que se ha descrito en tumores hipofisarios de rata inducidos por estrógenos que la AngIV, y en menor medida la AngIII y la AngII, estimulan la actividad de ciertas tirosina quinasas y con ello, la proliferación celular (Ochedalska et al., 2002).

Finalmente, por lo que respecta a la APN, indicar que en los estudios en animales con cáncer de mama inducido por NMU, no hemos observado diferencias entre los valores encontrados en el suero de ratas con cáncer de mama y ratas controles (Carrera et al., 2006). No obstante, en otro trabajo realizado en nuestro laboratorio (Martínez et al., 1999) en mujeres con cáncer de mama, encontramos un importante incremento de la actividad APN a nivel del tejido neoplásico. Autores como Severini *et al.*, (1991) ya habían propuesto la actividad APN sérica como posible marcador del cáncer de mama, puesto que su actividad estaría aumentada significativamente en estos pacientes. Sin embargo, trabajos anteriores desarrollados en nuestro laboratorio mostraban unos resultados contrarios, debido a que en este caso la actividad APN sérica disminuía significativamente en pacientes con cáncer de mama (Martínez *et al.*, 1999). Los distintos resultados obtenidos en humanos y modelos animales, simplemente reflejan el desconocimiento existente tanto del origen de la forma sérica de dicha enzima, así como de sus sustratos fisiológicos en relación con el cáncer de mama. En cualquier caso, hay que tener en cuenta que está bien descrito que las funciones de la APN varían profundamente dependiendo del microambiente del enzima (Small et al., 1996) y podría ser responsable de tales diferencias. De hecho, se ha sugerido en numerosas ocasiones que la APN juega un importante papel en la progresión de la vasculogénesis tumoral, y se ha identificado como un regulador crítico de los procesos de angiogénesis (Bhagwat et al., 2001).

A modo de conclusión, podríamos decir que el aumento de los niveles de Ang IV promovido por la elevada actividad APN y APB y su posible conexión con el sistema OT-OTR-oxitocinasa a través de los receptores AT4, nos podrían hacer suponer la existencia de un RAS local en la glándula mamaria, que estaría modificado por el desarrollo de carcinomas mamarios y favorecido por una disminución de los niveles de Oxitocina promovida por la alta actividad de la IRAP/P-LAP, lo que justificaría, al menos en parte, el desarrollo y progresión de esta enfermedad. Por tanto, estas actividades enzimáticas podrían utilizarse de forma conjunta como marcadores séricos útiles, por ejemplo, en la predicción de la sensibilidad de un tumor a una determinada terapia, el descubrimiento de algún proceso neoplásico oculto o su potencial remisión, etc, fenómenos en fin que permitieran monitorizar mejor el proceso cancerígeno, y por tanto, la selección de una terapia más adecuada.

8. BIBLIOGRAFÍA

AJCC, Cancer Staging Manual, 6th edition. Springer-Verlag, Berlin, 2003.

Albiston AL, McDowall SG, Matsacos D, Sim P, Clune E, Mustafa T, Lee J, Mendelsohn FA, Simpson RJ, Connolly LM, Chai SY. Evidence that the angiotensin IV (AT(4)) receptor is the enzyme insulin-regulated aminopeptidase. *J Biol Chem* 276: 48623-48626 (2001).

Anderson RR. Endocrinological control in development of the mammary gland. In Larson BL, Smith VR (eds): *Lactation, A Comprehensive Treatise*, Vol 1. New York, Academy press, pp 97-140 (1974).

Anderson DE. Genetic study of breast cancer: identification of a high risk group *Cancer* 34:1090-1097 (1974).

Applewhite R, Smith L, Divicenu F. Carcinoma of the breast with pregnancy and lactation. *Ann Surg* 39: 101-104 (1973).

ASCO 2003 Annual Meeting. New Issues in the staging of Breast Cancer. Educational Session.

Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner JF. *Handbook of proteolytic enzymes* Londres Academic Press (1998).

Bauer K. Degradation and biological inactivation of thyrotropin-releasing hormone (TRH): Regulation of the membrane-bound TRH-degrading enzyme from rat anterior pituitary by estrogens and thyroid hormones. *Biochimie* 70:69-74 (1988).

Bernstein L, Teal CR, Joslyn S, Wilson J. Ethnicity-related variation in breast cancer risk factors. *Cancer* 97 (1 suppl): 222-229 (2001).

Berrino F, Bellati C, Secreto G, Camerini E, Pala V, Panico S, Allegro G. Reducing bioavailable sex hormones through a comprehensive change in diet: the diet and androgens (DIANA) randomized trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10 (1): 25-33 (2001).

Beynon R, Bond JS. *Proteolytic Enzymes*. New York, Oxford University Press (2001).

Bhagwat SV, Lahdenranta J, Giordano R, Arap W, Pasqualini R, Shapiro LH. CD13/APN is activated by angiogenic signals and is essential for capillary tube formation. *Blood* 97: 652-659 (2001).

Bishoff ED, Gottardis MM, Moon TE, Heyman RA. The retinoid X-receptor-selective ligand LGD1069 (Targretin) cause complete regression of mammary carcinoma. *Cancer Research* 53: 479-484 (1998).

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254 (1976).

Brekelmans CTM. Risks factors and risk reduction of breast and ovarian cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol* 15: 63-68 (2003).

Brian E, Berrnteinl, Ross R. *Etiology of cancer: Hormonal factors Principles and practice of oncology*. Philadelphia: Lippincot-raven 221(1997).

Bruzzi P, Negri E, La Vecchia et al. Short term increase in risk of breast cancer after full term pregnancy. *Br Med Bull* 297: 1096 2004 (1988).

Buell P. Changing incidence of breast cancer in Japanese-American women. *J Natl Cancer Inst* 51: 1479-1483 (1973).

Buffone GJ, Spence JE, Fernbach SD, Curry MR, O'Brien WE, Beaudet AL. Prenatal diagnosis of cystic fibrosis: microvillar enzymes and DNA analysis compared. *Clin Chem* 34: 933-937 (1988).

Burstone MS. Histochemical demonstration of proteolytic activity in human neoplasm. *J Nat Cancer Inst* 16: 1149-1161 (1956).

Bussolati G, Cassoni P, Ghisolfi G, Negro F, Sapino A. Immunolocalization and gene expression of oxytocin receptors in carcinomas and non-neoplastic tissues of the breast. *Am J Pathol* 148: 1895-1903 (1996).

Byers T, Grahan S, et al. Lactation and breast cancer. *Am J Epidemiol* 121: 1149-1161 (1956).

Carrera MP, Ramirez-Exposito MJ, Valenzuela MT, Dueñas R, Garcia MJ, Mayas MD, Martinez-Martos JM. Insulin-regulated aminopeptidase/placental leucil aminopeptidase (IRAP/P-LAP) and Angiotensin IV-forming activities are modified in serum of rats with breast cancer induced by N-methyl nitrosourea. *Anticancer Research* 26 (2A): 1011-1014 (2006).

Carrera MP, Ramirez-Exposito MJ, Valenzuela MT, Garcia MJ, Mayas MD, Martinez-Martos JM. Serum oxytocinase activity is related to tumor growth parameters in N-methyl nitrosourea induced rat breast cancer. *Life Sci*. 75: 1369-1377 (2004).

Carrera MP, Ramirez-Exposito MJ, Valenzuela MT, Dueñas B, Garcia MJ, Mayas MD, Martinez-Martos JM. Serum enkephalin-degrading aminopeptidase activity in N-methyl nitrosourea-induced rat breast cancer. *Anticancer Res* 25: 193-196 (2005).

Cassoni P, Sapino A, Negro F, Bussolati G. Oxytocin inhibits proliferation of human breast cancer cell lines. *Virchows Arch* 425: 467-472 (1994).

Cassoni P, Marrocco T, Deaglio S, Sapino A, Bussolati G. Biological relevance of oxytocin and oxytocin receptors in cancer cells and primary tumors. *Ann Oncol* 12: S37-39 (2001).

Chai SY, Fernando R, Peck G, Ye SY, Mendelsohn FA, Jenkins TA, Albiston AL. The angiotensin IV/AT4 receptor. *Cell Mol Life Sci* 61: 2728-2737 (2004).

Chansel D, Czekalski S, Vandermeersch S, Ruffet E, Fournie-Zaluski MC, Ardaillou R. Characterization of angiotensin IV-degrading enzymes and receptors on rat mesangial cells. *Am J Physiol* 275: F535-542 (1998).

Claus EB, Risch NJ, Thompson WD. Genetic analysis of breast cancer in the cancer and steroid hormone study. *Am J Hum Genet* 48: 232 (1991).

Cocca C, Gutierrez A, Nuñez M, Croci M, Martin G, Gricco G, Rivera E, Bergoc R. Suppression of mammary gland tumorigenesis in diabetic rats. *Cancer Detect Prev* 27: 37-46 (2003).

Colston KW, Berger U, Coombes RC. Possible role for vitamin D in controlling breast cancer cell proliferation. *Lancet* 28: 188-191 (1998).

Copland JA, Jeng YJ, Strakova Z, Ives KL, Hellmich MR, Soloff MS. Demonstration of functional oxytocin receptors in human breast Hs578T cells and their up-regulation through a protein kinase C-dependent pathway. *Endocrinology* 140: 2258-2267 (1999).

Cowie AT, Tindal JS. The physiology of lactation. *Mongor Physiol Soc* 22: 1-282 (1971).

Cristofanilli M, Hortobagay GN. Molecular targets in breast cancer: current status and future directions. *Endocr Rel Cancer* 9:249-266 (2002).

Delmas B, Gelfi J, L'Haridon R, Vogel LK, Sjoström H, Noren O, Laude H. Aminopeptidase N is a major receptor for the entero-pathogenic coronavirus TGEV. *Nature* 357: 417-420 (1992).

Diamanti-Kandarakis E, Sykiotis GP, Papavassiliou AG. Selective modulation of postmenopausal women: cutting the Gordian knot of hormone replacement therapy with breast carcinoma. *Cancer* 97: 12-20 (2003).

Drife JO. Breast development in pregnancy. *Ann NY Acad Sci* 464: 58-65 (1986).

Dupont WD, Page DI. Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease. *New England J Med* 312: 146-151 (1985).

Elledge RM, Alred DC. Prognosis and predictive value of p53 and p21 in breast cancer. *Breast cancer Res Treat* 52: 79-98 (1998).

Fentiman IS. Oral contraceptives, hormone replacement therapy and breast cancer. *Int J Clin Pract* 56: 755-759 (2002).

Feracci H, Maroux S. Rabbit intestinal aminopeptidase N. Purification and molecular properties. *Biochim Biophys Acta* 599: 448-463 (1980).

Fisher B, Fisher ER, Redmond C, Brown A. Tumor nuclear grade, estrogen receptor, and progesterone receptor: Their value alone or in combination as indicators of outcome following adjuvant therapy for breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 7: 147-160 (1986).

Foulon T, Cadel S, Cohen P. Aminopeptidase B (EC 3.4.11.6). *Int J Biochem Cell Biol* 31: 747-750 (1999).

Frantz AG, Wilson JD. Endocrine disorders of the breast. In Wilson D, Foster DW (eds): *Williams Textbook of Endocrinology*. 7th ed. Philadelphia, WB Saunders, pp 402-421 (1985).

Friedrich M, Rafi L, Tilgen W, Schmidt W, Reichrath J. Expression of 1,25-dihydroxy vitamin D₃ receptor in breast carcinoma. *J Histochem Cytochem* 46: 1335-1337 (1998).

Fujii H, Nakajima M, Saiki I, Yoneda J, Azuma I, Tsuruo T. Human melanoma invasion and metastasis enhancement by high expression of aminopeptidase N/CD13. *Clin Exp Metastasis* 13: 337-344 (1995).

Gainer H, Russell JT, Loh YP. An aminopeptidase activity in bovine pituitary secretory vesicles that cleaves the N-terminal arginine from beta-lipotropin₆₀₋₆₅. *FEBS Lett* 175: 135-139 (1984).

Gauthier-Villars M, Gad S, Caux V et al. Pruebas genéticas sobre la predisposición al cáncer de mama. In *Surgical Clinics of North America: Breast Cancer Management Vol 5* pp. 1141-1157 (1999).

Giugni TD, Soderberg C, Ham DJ, Bautista RM, Hedlund KO, Moller E, Zaia JA. Neutralization of human cytomegalovirus by human CD13-specific antibodies. *J Infect Dis* 173: 1062-1071 (1996).

Gray GE, Henderson BE, Pike MC. Changing ratio of breast cancer incidence rate with age of black females compared with white females in the United States. *J Natl Cancer Inst* 64: 461-463 (1980).

Grosvenor CE, Mena F. Neural and hormonal control of milk secretion and milk ejection. In Larson (eds): *Lactation A comprehensive Treatise*, Vol 1, New York, Academic Press, pp 272-276 (1974).

Grubbs CJ, Juliana MM, Hill DL, Whitaker LM. Suppression by pregnancy of chemically induced preneoplastic cells of the rat mammary gland. *Anticancer Res* 6:1395-1400 (1986).

Gullino PM, Pettigrew HM, Grantham FH. N-nitrosomethylurea as mammary gland carcinogen in rats. *J Natl Cancer Inst* 54: 401-414 (1975).

Gupta SK, Aziz M, Khan AA. Serum leucine aminopeptidase estimation: a sensitive prognostic indicator of invasiveness in breast carcinoma. *Indian J Pathol Microbiol* 32: 301-305 (1989).

Haagensen CD. The normal physiology of the breast. In Haagensen CD (ed) : *Diseases of the breast*. Philadelphia, WB Saunders, pp 47-45 (1986).

Hadjimichael CD, Boyle CA, Meigs JW. Abortion before first live birth and risk for breast cancer. *Br J Cancer* 53: 281-284 (1986).

Hamano H, Hayakawa T, Kondo T. Serum immunoreactive elastase in diagnosis of pancreatic diseases. A sensitive marker for pancreatic cancer. *Dig Dis Sci* 32: 50-56 (1987).

Hansen AS, Noren O, Sjostrom H, Werdelin O. A mouse aminopeptidase N is a marker for antigen-presenting cells and appears to be co-expressed with major histocompatibility complex class II molecules. *Eur J Immunol* 23: 2358-2364 (1993).

Harris CC, Hirohashi S, Ito N, Pitot HC, Sugimura T, Terada M, Yokota J. Multistage carcinogenesis: the Twenty-Second International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund. *Cancer Res* 52: 4837-40 (1992).

Harris CC, Hirohashi S, Ito N, Pitot HC, Sugimura T, Terada M, Yokota J. Multistage carcinogenesis: the Twenty-Second International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund. *Cancer Res* 52: 4837-4840 (1992).

Harvard College. Breast Cancer Update, Part 1. In Harvard Health Online. Harvard Women's Health Watch (2000).

Hirani-Hojatti S, Milligan JR, Kovnat A, Brown K, Archer MC. Activation of the c-Ha-ras-1 proto-oncogene by methylation in vitro with alpha-acetoxy-N-nitrosodimethylamine. *Mol Carcinog* 2:101-106 (1989).

Hoffmann T, Faust J, Neubert K, Ansorge S. Dipeptidyl peptidase IV (CD 26) and aminopeptidase N (CD 13) catalyzed hydrolysis of cytokines and peptides with N-terminal cytokine sequences. *FEBS Lett* 336: 61-64 (1993).

Hopsu V, Makinen EO. Two methods for the demonstration of noradrenaline-containing adrenal medullary cells. *J Histochem Cytochem* 14: 434-435 (1966).

Howe GR, Epidemiology of radiogenic breast cancer. *Prog Cancer Res Ther* 26: 119-129 (1984).

Huggins C, Briziarelli G, Sutton H Jr. Rapid induction of mammary carcinoma in the rat and the influence of hormones on the tumors. *J Exp Med* 109: 25-42 (1959).

Huggins C, Yang NC. Induction and extinction of mammary cancer. A striking effect of hydrocarbons permits analysis of mechanisms of causes and cure of breast cancer. *Science* 137: 257-262 (1962).

Huston SW, Cowen PN, Bird CC. Morphometric studies of age-related changes in normal human breast and their significance for evolution of mammary cancer. *J Clin Pathol* 38: 281-289 (1985).

Itoh C, Nagamatsu A. An aminopeptidase activity from porcine kidney that hydrolyzes oxytocin and vasopressin: purification and partial characterization. *Biochim Biophys Acta* 1243: 203-208 (1995).

Kalache A, Mcpherson K, Barltrop K. Oral contraceptives and breast cancer. *Br J Hosp Med* 30: 278-283 (1983).

Kanayama N, Kajiwara Y, Goto J, el Maradny E, Maehara K, Andou K, Terao T. Inactivation of interleukin-8 by aminopeptidase N (CD13). *J Leukoc Biol* 57: 129-134 (1995).

Keller-Wood M, Bland K, Fisiologia de la glandula mamaria en estado normal, durante la lactancia y en estado patologico. En Bland K, Copeland EM (eds). *Manejo multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas*. Philadelphia, WB Saunders (1991).

Key TJ, Pike MC, The role of oestrogens and progestagens in the epidemiology and prevention of breast cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol* 24: 29-43 (1988).

Klinge CM, Bodener DL, Dasai D, Niles RN, Traish AM. Binding of type II nuclear receptors and estrogen receptor to full and half-site estrogen response elements in vitro. *Nucleic Acids Res* 25: 1903-1912 (1997).

Kumar R, Sukumar S, Barbacid M. Activation of ras oncogenes preceding the onset of neoplasia. *Science* 248: 1101-1104 (1990).

Kumar V, Green S, Stack G, Berry M, Jin JR, Chambon P. Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell* 51: 941-951 (1987).

Lendeckel U, Arndt M, Frank K, Wex T, Ansorge S. Role of alanyl aminopeptidase in growth and function of human T cells (review). *Int J Mol Med* 4: 17-27 (1999).

Lipnick I, Speizer FE, Bain C et al. Case control study of risk indicators among women with premenopausal and early postmenopausal breast cancer. *Cancer* 53: 1020-1024 (1984).

Lippman ME, Krueger KA, Eckert S et al. Indicators of lifetime estrogen exposure: effect on breast cancer incidence and interaction with raloxifene therapy in multiple outcomes of raloxifene evaluation study participants. *J Clin Oncol* 19: 3111-3116 (2001).

Logan WPD. Cancer mortality by occupation and social class 1851-1971. Iarc Scientific Publication No 36/OPCS Series SMPS No 44, London, HMSO (1982).

Lu J, Jiang C, Mitrenga T, Cutter G, Thompson HJ. Pathogenic characterization of 1-methyl-1-nitrosourea-induced mammary carcinomas in the rat. *Carcinogenesis* 19: 223-227 (1998).

Lu SJ, Archer MC. Ha-ras oncogene activation in mammary glands of N-methyl-N-nitrosourea-treated rats genetically resistant to mammary adenocarcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 1001-1005 (1992).

MacMahon B, Cole P, Lin TM et al. Age at first birth and breast cancer risk. *Bull World Health Organ* 43:209-212 (1970).

Martin G, Davio C, Rivera E, Melito G, Cricco G, Andrade N, Caro R, Bergoc R. Hormone dependence of mammary tumors induced in rats by intraperitoneal NMU injection. *Cancer Invest* 15: 8-17 (1997).

Martinez JM, Prieto I, Ramirez MJ, Cueva C, Alba F, Ramirez M. Aminopeptidase activities in breast cancer tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 80: 2918-2925 (1999).

Mathe G. Do thugtsin and bestatin constitute a biopharmacological immunoregulatory system? *Cancer Detect Prev* 1: 445-455 (1987).

Mauvais-Jarvis P, Kuttann F, Gompel A. Estradiol/progesterone interaction in normal and pathologic breast cells. *Ann NY Acad Sci* 464:152-167 (1986).

McCormick DL, Adamowski CB, Fiks A, Moon RC. Lifetime dose-response relationships for mammary tumor induction by a single administration of N-methyl-N-nitrosourea. *Cancer Res* 41:1690-1694 (1981).

Mironov NM, Bleicher F, Martel-Planche G, Montesano R. Nonrandom distribution of O6-methylguanine in H-ras gene sequence from DNA modified with N-methyl-N-nitrosourea. *Mutat Res* 288: 197-205 (1993).

Moon RC, Grubbs CJ, Sporn MB, Goodman DG. Retinyl acetate inhibits mammary carcinogenesis induced by N-methyl-N-nitrosurea. *Nature* 267: 620-621 (1977).

Muldoon TG. Steroid Hormone receptor regulation by various hormonal factors during mammary development and growth in the normal mouse. *Ann NY Acad Sci* 464: 27-36 (1986).

Murrell TG. Epidemiological and biochemical support for a theory on the cause and prevention of breast cancer. *Med Hypotheses* 36: 389-396 (1991).

Murrell TG. The potential for oxytocin (OT) to prevent breast cancer: a hypothesis. *Breast Cancer Res Treat* 35: 225-229 (1995).

Nass SJ, Davidson NE. The biology of breast cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 13:311-332 (1999).

Nilsen TI, Vatten LJ. Fetal growth, preeclampsia and adult breast cancer risk. *Tidsskr Nor Laegeforen* 122 (26): 2525-2529 (2002).

North WG, Pai S, Friedmann A, Yu X, Fay M, Memoli V. Vasopressin gene related products are markers of human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 34: 229-235 (1995).

Ochedalska AL, Rebas E, Kunert-Radek J, Fournie-Zaluski MC, Pawlikowski M. Angiotensins II and IV stimulate the activity of tyrosine kinases in estrogen-induced rat pituitary tumors. *Biochem Biophys Res Commun* 297: 931-933 (2002).

Offit K, Brown K. Quantitative familial cancer risk: A resource for clinical oncologist. *J Clin Oncol* 12: 1724 (1994).

Ottman R, Pike MC, King MC, Hendersen BE. Practical guide for estimating risk for familial breast cancer. *Lancet* 22: 556-558 (1983).

Palmieri FE, Petrelli JJ, Ward PE. Vascular, plasma membrane aminopeptidase M. Metabolism of vasoactive peptides. *Biochem Pharmacol* 34: 2309-2317 (1985).

Palmieri FE, Bausback HH, Ward PE. Metabolism of vasoactive peptides by vascular endothelium and smooth muscle aminopeptidase M. *Biochem Pharmacol* 38: 173-180 (1989).

Pharoah PDP, Day NE, Caldas C. Somatic mutations in the p53 gene and prognosis in breast cancer: a meta-analysis. *Brit J Cancer* 80: 1968-1973 (1999).

Pike MC, Henderson BE, Casagrande JT, et al. Oral contraceptive use and early abortion as risk factors for breast cancer in young women. *Br J Cancer* 43:72-76 (1981).

Pulido-Cejudo G, Conway B, Proulx P, Brown R, Izaguirre CA. Bestatin-mediated inhibition of leucine aminopeptidase may hinder HIV infection. *Antiviral Res* 36: 167-177 (1997).

Rivera ES, Andrade N, Martin G, Melito G, Cricco G, Mohamad N, Davio C, Caro R, RM Bergoc. Induction of mammary tumors in rat by intraperitoneal injection of NMU: histopathology and estral cycle influence. *Cancer Lett* 86: 223-228 (1994).

Rochefort H. Biological and clinical significance of cathepsin D in breast cancer. *Acta Oncologica* 31:125-130 (1992).

Rogi T, Tsujimoto M, Nakazato H, Mizutani S, Tomoda Y. Human placental leucine aminopeptidase/oxytocinase. A new member of type II membrane-spanning zinc metallopeptidase family. *J Biol Chem* 271: 56-61 (1996).

Romain S, Muracciole X, Varette I, Bressac C, Brandone H, Martin PM. La cathepsine-D; un facteur pronostique independent dans le cancer du sein. *Bull Cancer* 77:439-447 (1990).

Rose DP, Pruitt B, Stauber P, Ertutk E, Bryan GT. Influence of dosage schedule on the biological characteristics of N-nitromethylurea-induced rat mammary tumors. *Cancer Res* 40: 235-239 (1980).

Rose DP, Boyar AP, Winder EL. International comparisons of mortality rates for cancer of the breast, ovary, prostate, colon and per capita food consumption. *Cancer* 58: 2363-2371 (1986).

Russo J, Romero AL, Russo IH. Architectural pattern of the normal and cancerous breast under the influence of parity. *Cancer Epidemio Biomarkers Prev* 3: 219-224 (1994).

Russo J, Wilgus G, Russo IH. Susceptibility of the mammary gland to carcinogenesis: Differentiation of the mammary gland as determinant of tumor incidence and type of lesion. *Am J Pathol* 96: 721-36 (1979).

Russo IH, Russo J. Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies. *Environ Health Perspect* 104: 938-967 (1996a).

Russo J, Russo IH. Development pattern of human breast and susceptibility to carcinogenesis. *Eur J CancerPrev* 2: 85-100 (1993).

Russo J, Russo IH. Influence of differentiation and cell kinetics on the susceptibility of the rat mammary gland to carcinogenesis. *Cancer Res* 40: 2677-2687 (1980b).

Russo J, Russo IH. Boundaries in mammary carcinogenesis. In: *Boundaries between promotion and progression during carcinogenesis* (Sudilovsky O, ed) New York, Plenum Press, 43-59 (1991).

Russo J, Saby J., Isenberg W, Russo IH. Pathogenesis of mammary carcinoma induced in rats by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *J Natl Cancer Inst* 59: 435-445 (1977).

Russo J, Russo IH. Biological and molecular bases of mammary carcinogenesis. *Lab Invest* 57: 112-137 (1987).

Russo IH, Tewari M, Russo J. Morphology and development of rat mammary gland. In: *Integument and mammary gland of laboratory animals* (Jones TC, Mohr U, Hunt RD, eds). Berlin, Springer Verlag 233-252 (1989b).

Russo J, Russo IH, vanZwieten MJ, Rogers AE, Gusterson B. Classification of neoplastic and nonneoplastic lesions of the rat mammary gland. In: *Integument and mammary gland of laboratory animals*. (Jones TC, Mohr U, Hunt, RD, eds). Berlin, Springer Verlag, 275-340 (1989c).

Russo J, Tay LK, Russo IH. Differentiation of the mammary gland and susceptibility to carcinogenesis. *Breast Cancer Res Treat* 2: 5-73 (1982).

Russo J, Calaf G, Russo IH. A critical approach to the malignant transformation of human breast epithelial cells with chemical carcinogens. *Crit Rev Oncog* 4: 403-407 (1993).

Russo J, Russo JH et al. The pathology of breast cancer, staging and prognosis indicators JAMWA 1992.

Russo J, Gusterson BA, Rogers AE, Russo IH, Wellings SR, van Zwieten MJ. Comparative study of human and rat mammary tumorigenesis. *Lab Invest* 62: 244-278 (1990).

Saiki I, Murata J, Watanabe K, Fujii H, Abe F, Azuma I. Inhibition of tumor cell invasion by ubenimex (bestatin) in vitro. *Jpn J Cancer Res* 80: 873-878 (1989).

Saiki I, Fujii H, Yoneda J, Abe F, Nakajima M, Tsuruo T, Azuma I. Role of aminopeptidase N (CD13) in tumor-cell invasion and extracellular matrix degradation. *Int J Cancer* 54: 137-143 (1993).

Salazar H, Robon H. Morphologic changes of the mammary gland during development, pregnancy and lactation. In Josimovich JB (ed): *Lactogenic Hormones, Fetal Nutrition and Lactation*. New York, John Wiley & Sons, pp 221-278 (1974).

Sapino A, Cassoni P, Stella A, Bussolati G. Oxytocin receptor within the breast: biological function and distribution. *Anticancer Res* 18: 2181-2186 (1998).

Schwartz MK. Laboratory aids to diagnosis-enzymes. *Cancer* 37: 542-548 (1976).

Severini G, Gentilini L, Tirelli C. Diagnostic evaluation of alanine aminopeptidase as serum marker for detecting cancer. *Cancer Biochem Biophys* 12: 199-204 (1991).

- Singer B, Kusmierek JT. Chemical mutagenesis. *Annu Rev Biochem* 51: 655-93 (1982).
- Small M, Kaiser M, Tse W, Heimfeld S, Blumberg S. Activity of neutral endopeptidase and aminopeptidase N in mouse thymic stromal cells which bind double-positive thymocytes. *Eur J Immunol* 26: 961-964 (1996).
- Stoica A, Saceda M, Fakhro A, Solomon HB, Fenster BD, Martin MB. Regulation of estrogen receptor gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D in MCF-7 cells. *J Cell Biochem* 75: 955-962 (1999).
- Styne DM, Grombach MM. Puberty in the male and female. In Jaffe R, Yen SC (eds): *Reproductive Endocrinology*. Philadelphia, Wb Saunders, pp 313-384 (1986).
- Sukumar S, Notario V, Martin-Zanca D, Barbacid M. Induction of mammary carcinomas in rats by nitroso-methylurea involves malignant activation of H-ras-1 locus by single point mutations. *Nature* 306: 658-661 (1983).
- Taparowsky E, Shimizu K, Goldfarb M, Wigler M. Structure and activation of the human N-ras gene. *Cell* 34: 581-586 (1983).
- Taper H, Lans M, Economidou-Karaoglou A, de Gerlache J, Roberfroid M. Variations in serum alkaline DNase activity: a possible clinical test for therapeutic prognosis of human tumors. *Anticancer Res* 6: 949-956 (1986).
- Taylor A, Volz KW, Lipscomb WN, Takemoto LJ. Leucine aminopeptidase from bovine lens and hog kidney. Comparison using immunological techniques, electron microscopy, and X-ray diffraction. *J Biol Chem* 259: 14757-14761 (1984).
- Taylor A, Daims M, Lee J, Surgenor T. Identification and quantification of leucine aminopeptidase in aged normal and cataractous human lenses and ability of bovine lens LAP to cleave bovine crystallins. *Curr Eye Res* 2: 47-56 (1982).
- Thompson HJ, McGinley JN, Wolfe P, Singh M, Steele VE, Kelloff GJ. Temporal sequence of mammary intraductal proliferations, ductal carcinomas in situ and adenocarcinomas induced by 1-methyl-1-nitrosourea in rats. *Carcinogenesis* 19: 2181-2185 (1998).
- Thompson HJ, Adlakha H. Dose-responsive induction of mammary gland carcinomas by the intraperitoneal injection of 1-methyl-1-nitrosourea. *Cancer Res* 51: 3411-3415 (1991).
- Thompson HJ, Meeker LD. 1983 Induction of mammary gland carcinomas by the subcutaneous injection of 1-methyl-1-nitrosourea. *Cancer Res* 43: 1628-1629 (1983).

Toda S, Ando H, Nagasaka T, Tsukahara S, Nomura M, Kotani Y, Nomura S, Kikkawa F, Tsujimoto M, Mizutani S. Existence of placental leucine aminopeptidase/oxytocinase/insulin-regulated membrane aminopeptidase in human endometrial epithelial cells. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 1384-1389 (2002).

Trichopoulos D, Macmahon B, Cole P, et al., The menopause and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 48: 605-613 (1972).

Umezawa H. Screening of small molecular microbial products modulating immune responses and bestatin. *Recent Results Cancer Res* 75: 115-125 (1980).

van der Vijver MJ. Molecular genetic changes in human breast cancer. *Adv Cancer Res* 61: 25-56 (1993).

Vassilopoulou-Sellin R, Palmer L, Taylor S, Cooksley CS. Incidence of breast carcinoma in woman with thyroid carcinoma. *Cancer* 85: 696-705 (1999).

Vogel PM, Georgiade NG, Fette BF, et al. The correlation of histologic changes in the human breast with the menstrual cycle. *Am J Pathol* 104: 23 (1981).

Vorherr H. Human lactation and breast feeding. In Larson BL, Smith Vr(eds): *Lactation, A comprehensive Treatise, Vol IV* New York, Academic Press, pp182-280 (1978).

Weinberg RA. The integration of molecular genetics into cancer management. *Cancer* 70: 1653-1658 (1992).

Welsch CW. Host factors affecting the growth of carcinogen-induced rat mammary carcinomas: a review and tribute to Charles Brenton Huggings. *Cancer Res* 45: 3415-3443 (1985).

Wesley VJ, Hawtin SR, Howard HC, Wheatley M. Agonist-specific, high-affinity binding epitopes are contributed by an arginine in the N-terminus of human oxytocin receptor. *Biochemistry* 41: 5086-5092 (2002).

Wolfe JN. Breast parenchymal patterns and their changes with age. *Radiology* 121: 545-552 (1976).

Wu K, Kim HT, Rodriguez JL, Hilsenbeck SG, Mohsin SK, et al. Suppression of mammary tumorigenesis in transgenic mice by the RXR-selective retinoid, LGD1096. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11: 467-474 (2002).

Yen SSC. Prolactin in human reproduction In: Yen SSC. *Reproductive Endocrinology*. Philadelphia, WB Saunders, pp 237-263 (1986).

Yuan JM, Yu MC, Ross RK, Gao YT, Henderson BE. Risk factors for breast in Chinese women in Shanghai. *Cancer Res* 48: 1949-1963 (1988).

Yuasa Y, Srivastava SK, Dunn CY, Rhim JS, Reddy EP, Aaronson SA. Acquisition of transforming properties by alternative point mutations within c-bas / has human proto-oncogene. *Nature* 303: 775-779 (1983).

Zarbl H, Sukumar S, Arthur AV, Martin-Zanca D, Barbacid M. Direct mutagenesis of Ha-ras-1 oncogenes by N-nitroso-N-methylurea during initiation of mammary carcinogenesis in rats. *Nature* 315: 382-385 (1985).

Zhang R, Haag JD, Gould MN. Reduction in the frequency of activated ras oncogenes in rat mammary carcinomas with increasing N-methyl-N-nitrosourea doses or increasing prolactin levels. *Cancer Res* 50: 4286-4290 (1990).

.oOo.

RESUMEN DE CURSOS DE DOCTORADO

Durante el curso académico 2003-04, he realizado siete Cursos de Doctorado (21 créditos), dentro del Programa "Biología Molecular y Celular". La relación de cursos es la siguiente:

1. Inmunocitoquímica en Experimentación y Diagnóstico.

En este curso se han impartido clases teóricas y prácticas, junto con la realización de un trabajo de revisión de un supuesto experimental/diagnóstico.

La inmunocitoquímica consiste en la identificación in situ de un constituyente celular o tisular mediante la interacción específica antígeno/anticuerpo; para visualizar este complejo, el anticuerpo debe estar conjugado a un marcador visible. La aplicabilidad y utilidad de los métodos inmunocitoquímicos está ampliamente difundida y aceptada en multitud de disciplinas biológicas y biomédicas, de modo que se presenta como un abordaje experimental de elección en estudios de correlación estructura/función.

2. Procesos degenerativos del Sistema Nervioso.

Durante este curso hemos estudiado las lesiones que afectan al sistema nervioso central (SNC) y periférico (SNP). Las lesiones en el SNP afectan fundamentalmente a los axones y se consideran 5 niveles de lesión:

- a) grado 1: bloqueo local de la conducción nerviosa en un punto concreto del axón. Enlentece la transmisión.
- b) grado 2,3,4,5: existe solución de continuidad en el axón, por tanto puede existir pérdida de conducción nerviosa en la porción distal, y la neurona puede perder el control del órgano diana. Estudiamos los cambios anatómicos en la lesión, la degeneración distal y proximal (cromatolisis), los cambios fisiológicos en el nervio dañado, y la reparación de las lesiones en el SNP (espontánea o quirúrgica).

Las lesiones en el SNC se dividen en:

- * Anisomórficas. Son generalmente lesiones abiertas causadas por un trauma de tipo mecánico, y en ellas existe una destrucción de la barrera hematoencefálica y de la glía limitans.
- * Isomórficas. Están causadas por neurotoxinas, no provocan cambios en la morfología del SNC y no se destruye la barrera hematoencefálica. Son lesiones cerradas.

Se explicó la muerte neuronal secundaria inducida por deficiencias energéticas y asociada a aminoácidos excitadores, así como de los mecanismos de regeneración y reparación de las lesiones del SNC. Finalmente, se vieron las alteraciones que se producen en el sistema nervioso en la enfermedad de Parkinson y su tratamiento.

3 Ciclo Celular, Apoptosis y Cáncer.

En este curso se definió el ciclo celular como un conjunto de etapas desarrolladas entre la célula madre y la hija. Tiene dos fases: Mitosis, con una duración entre 30' y 60', e Interfase con una duración mucho mayor, de incluso meses, según la especie. Hay actividad metabólica celular.

El ciclo de una célula es análogo al de un ser vivo, pues "nace" mediante la división de una célula progenitora, crece, y se reproduce. Todo este proceso es lo que constituye un ciclo celular completo.

También se ha definido el cáncer como el crecimiento global de una población: procesos de crecimiento celular, inexistencia de pérdidas celulares y combinación de los factores anteriores. Se han explicado los siguientes parámetros cinéticos celulares:

- 1) Tiempo de duplicación (TD)
- 2) Tiempo de ciclo (TC)
- 3) Fracción de crecimiento (F) o porción de células que contribuyen al crecimiento tumoral.
- 4) Tiempo de duplicación potencial (Tpot.): TC con respecto a factores de crecimiento.
- 5) Factores de pérdida celular: índice de pérdida

Finalmente, se explica que fueron Kerr y Searle en 1972 quienes definen el término apoptosis, como muerte ordenada ó muerte celular programada. Las características morfológicas de la apoptosis son, fundamentalmente, la ruptura del DNA en fragmentos de 180-200 pb. Cuando la ruptura es al azar, se habla de necrosis.

4. Bases Moleculares y Celulares del Envejecimiento.

En este curso se han impartido varias clases teóricas sobre las bases moleculares y celulares del envejecimiento, y he realizado una memoria de proyecto de investigación cuyo título es Comportamiento del malondialdehído y el óxido nítrico séricos en pacientes con infarto de miocardio. La hipótesis fue demostrar la validez del MDA y el NO como marcadores bioquímicos para evaluar el daño del músculo cardíaco, en la fase aguda y postisquémica del IAM, así como para determinar su pronóstico.

5. Antioxidantes y Óxido Nítrico en los Procesos de Defensa Celular.

En el organismo hay diversos lugares de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), por ejemplo en la cadena de transporte electrónico, en la ruta del ácido araquidónico, en las reacciones donde participa el citocromo P450, en el metabolismo de purinas (xantina oxidasa), entre otros. Los organismos han desarrollado mecanismos antioxidantes como son la catalasa y la superóxido dismutasas (SOD), que suelen estar cerca de los lugares de producción de ROS. Como consecuencia del aumento de ROS (y de especies reactivas de nitrógeno (RNS) y de una disminución de antioxidantes endógenos se produce un estrés oxidativo y por tanto daño celular. El daño producido por ROS/RNS está implicado en algunas enfermedades como son Alzheimer, Parkinson, ELA o Síndrome Down.

En el curso también se abordó la implicación del óxido nítrico en muchos procesos como son la regulación de la expresión de genes, señalización celular, apoptosis, biología cutánea, enfermedades autoinmunes, diabetes, shock séptico, terapia farmacológica (Sildenafil, terapia anticáncer...).

6. Metabolismo y Nutrición.

Durante este curso se ha desarrollado un trabajo teórico-práctico titulado: Lípidos y Aterosclerosis. En él se ha desarrollado la teoría sobre las grasas determinando sus funciones, fuentes alimenticias y recomendaciones sobre su consumo, y un trabajo sobre la fisiopatología de la enfermedad aterosclerótica. Por último, he hecho una revisión de algunos artículos publicados recientemente sobre ácidos grasos y aterosclerosis.

7. Fisiología de la Nutrición y el Ejercicio Físico.

En este curso hemos estudiado todos los elementos básicos sobre la nutrición, se comentaron varias publicaciones recientes sobre la alimentación y se ha desarrollado un trabajo escrito sobre la fisiología del ejercicio físico y nutrición. Así, el ejercicio/deporte no debe ser considerado solamente como una cuestión de competición. Hay que subrayar los beneficios de una actividad física regular como camino activo de autoayuda y curación y también conocer sus peligros.

El ejercicio posee el potencial de romper/alterar muchas variables homeostáticas. En esta situación, los sistemas de control del cuerpo deben responder rápidamente para prevenir alteraciones drásticas en el ambiente interno. Así, se analizaron los efectos del ejercicio físico y el entrenamiento (agudo ó crónico).