




**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 RATAS CON CÁNCER DE MAMA INDUCIDO POR N-
METIL-NITROSOUREA (NMU).**

**María Ruíz Sanjuán
Trabajo de Investigación Tutelado
Jaén, 2005**



Esta Memoria de Investigación Tutelada ha sido realizado 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 *Life Sciences*.

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, subvención para Acciones Coordinadas de la Junta de Andalucía y Plan Propio de la Universidad de Jaén (Proyecto UJA2003-014).

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Cáncer de Mama y Modelos Animales.

Los modelos de inducción del cáncer de mama mediante carcinógenos químicos en roedores es una de las formas más utilizadas para estudiar la patogénesis del cáncer de mama.

Los dos sistemas experimentales de carcinogénesis mamaria más utilizados son la inducción de tumores mamarios por administración intragástrica de 7,12 dimetil-benzo [a] antraceno (DMBA) y de la administración, intravenosa, subcutánea o intraperitoneal de N-metil-nitrosourea (NMU).

Ambos modelos comparten características como son la fiabilidad en la inducción tumoral, la especificidad de órgano, la aparición de tumores de origen ductal, tumores de caracterización histopatológica predominantemente carcinomatosa, tumores de diferente respuesta hormonal y la posibilidad de examinar el proceso de inicio y promoción tumoral. Es en este último punto donde ambos sistemas divergen (Thompson y Adlakha, 1991).

El modelo de inducción de cáncer de mama mediante NMU ha contribuido significativamente a la comprensión de la biología del cáncer de mama y a la búsqueda de posibles métodos para su prevención y tratamiento.

La principal característica de este modelo es, que la proporción de carcinomas mamarios que son ovario dependientes es similar a la observada en el cáncer de mama en humanos, además de ser carcinomas agresivos y localmente invasivos con capacidad de metastizar, existiendo una clara separación operacional entre el inicio y promoción de la enfermedad, basada en la acción de NMU como un agente metilante directo (Gullino *et al.*, 1975; McCormick *et al.*, 1981; Welch, 1985; Russo *et al.*, 1990). La dependencia ovárica de estos tumores queda de manifiesto en los resultados obtenidos por Thompson *et al.* (1998), que conducen a la hipótesis de que la progresión de una lesión pre-maligna a maligna es inhibida en la glándula mamaria por ovariectomía, y que el fenotipo de independencia hormonal puede ser conferido en el momento del inicio a la exposición al carcinógeno. En este sentido, el estatus endocrino de dichos carcinomas parece ser similar al del cáncer de mama en mujeres (Russo *et al.*, 1989c).

El cáncer, en general, es el resultado de una mutación o fallo en la regulación de los genes celulares normales. Este proceso no es inmediato, sino que el desarrollo del cáncer de mama así como el de otros tipos de cáncer, resulta de la acumulación de diversos eventos patogenéticos (Harris *et al.*, 1992; Weinberg, 1992; van de Vijver, 1993). Evento patogenético es un término general que agrupa a muchos tipos de daño en el ADN que conducen a la amplificación génica,

mutaciones puntuales, readaptaciones y deleciones. En este contexto, las características patogenéticas de este modelo experimental han sido definidas mediante técnicas moleculares. Uno de los cambios genéticos somáticos identificables, es la transición de GGA a GAA en el codon 12 del proto-oncogén Ha-ras (ras12) en un elevado porcentaje de los carcinomas (Sukumar *et al.*, 1983; Zarbl *et al.*, 1985; Kumar *et al.*, 1990). Ya en el año 1985, estudios realizados por Zarbl *et al.* ponen de manifiesto que el carcinógeno NMU es el agente directo responsable de la activación del oncogen Ha-ras-1. Concretamente, actúa como un agente metilante directo de la posición O⁶ de la segunda deoxiguanosina (G³⁵) en el codon 12. Explicaciones alternativas a esta mutación específica son la posibilidad de un mecanismo específico de reparación G-A o la de una sustitución frecuente durante el desarrollo del tumor, son bastantes improbables a la vista de los estudios control realizados con el oncogen Ha-ras-1 inducido por DMBA.

Por otro lado, su naturaleza altamente lábil en condiciones fisiológicas lleva a concluir que el inicio del proceso carcinogénico ocurre en las horas posteriores a una única exposición al carcinógeno de los animales sexualmente maduros. Así, la activación maligna del oncogen Ha-ras-1 en carcinomas mamarios inducidos por NMU, es el resultado de mutaciones localizadas específicamente en una región no mayor de cuatro nucleótidos. De este modo, los procesos de iniciación y promoción del tumor de mama pueden ser delimitados de manera más clara (Zarbl *et al.*, 1985).

En este sentido, hay que decir que diferentes laboratorios han demostrado que los oncogenes ras no pueden transformar células embrionarias de roedor normales (primarias), a menos que éstas adquieran la capacidad de proliferar por sí mismas, ya sea espontáneamente, por un tratamiento con un carcinógeno o por transfección de otros oncogenes como el c-myc, postulándose que el inicio de la carcinogénesis por NMU requiere la activación simultánea de dos o más oncogenes cooperantes. Pero esto es igualmente lógico que la proliferación dependiente de hormonas; un proceso fisiológico normal requerido para la inducción del tumor y, en algunos casos la progresión, podría proporcionar las condiciones adecuadas para la expresión fenotípica de los oncogenes Ha-ras-1 activados por NMU (Zarbl *et al.*, 1985).

Numerosos estudios indican que esta mutación es un fenómeno iniciador temprano (Kumar *et al.*, 1990; Zhang *et al.*, 1990; Lu y Archer, 1992) como resultado de la metilación del nucleosido guanina (Hirani-Hojatti *et al.*, 1989; Mironov *et al.*, 1993) aunque, recientemente se ha descrito que dicha mutación es diferente entre las glándulas mamarias abdomino-inguinales y cérvico-torácicas siendo tres veces superior en las glándulas anteriores que las posteriores (Lu *et al.*, 1998).

La ruta, dosis e intervalo en la administración de NMU para inducir la carcinogénesis mamaria fue inicialmente descrita por Gullino *et al.* (1975). Estos autores utilizaron tres inyecciones intravenosas separadas por intervalos de un mes, con una primera dosis de NMU entre los 50 y 55 días de edad del animal. Posteriormente este proceso fue modificado por Moon *et al.* (1977). En este caso, la administración del carcinógeno era en dos dosis intravenosas a los 50 días de edad con una semana de diferencia. El mismo laboratorio demostró que una sola dosis intravenosa de NMU a los 50 días de edad desencadenaba la inducción de carcinomas mamarios (McCormick *et al.*, 1981). Más recientemente, Thompson y Meeker (1983), han descrito que la NMU puede ser inyectado s.c a los 50 días de edad sin perder especificidad ni eficacia en la inducción del tumor a una dosis de 50 mg / kg de peso. Además propone que el número de tumores incrementa en proporción a la dosis del carcinógeno, ya que el periodo de latencia disminuye conforme aumenta la dosis de NMU.

De acuerdo con el método de inducción, los tumores inducidos por NMU pueden presentar diferentes grados de dependencia hormonal. En este sentido, Rivera *et al.* (1994) presentaron un modelo, basado en tres inyecciones intraperitoneales de NMU a los 50, 80 y 100 días de edad, donde todos los tumores inducidos presentaban receptores de estrógenos. En este sentido, los resultados obtenidos por Martín *et al.* (1997) en referencia a este modelo, indican que el proceso de inducción tumoral es fuertemente dependiente de estrógenos, lo que estaría de acuerdo con los resultados propuestos por diferentes investigadores en cuanto al efecto estimulador de los estrógenos sobre la actividad mitótica. Por tanto, la pérdida de estrógenos inhibe la progresión de la lesión tumoral inducida por NMU. En este modelo experimental es esencial el papel de los estrógenos y la PRL durante la promoción de la carcinogénesis. En concreto, la PRL muestra una tendencia a provocar una aparición temprana de los tumores, lo que estaría en concordancia con el papel promotor asignado a la PRL en la inducción del cáncer de mama, ampliamente estudiado en ratón y en otros modelos de inducción de tumores mamarios en rata.

En cuanto a la vía de administración, es decir, intragástrica, intravenosa o intraperitoneal, la vía intraperitoneal es la ruta mas rápida y la que proporciona un método más simple, reproducible, fiable y de menor variabilidad. El único problema que puede presentar esta técnica es que el NMU podría inyectarse en un órgano de la cavidad abdominal dando lugar a la inducción de un tumor en esa zona, aunque este problema puede ser solucionado utilizando agujas cortas y estandarizando el lugar de inyección (Thompson y Adlakha, 1991).

En relación a la naturaleza histopatológica de los tumores, es característico de este modelo un alto grado de malignidad y el desarrollo de carcinomas ductales con una proporción considerable de tipo cribiforme (Rivera *et al.*, 1994).

Estudios realizados por Cocca *et al.* (2003) sobre este modelo, pusieron de manifiesto que ratas diabéticas (STZ) tratadas con NMU desarrollaron un patrón de lesiones benignas (84 %) mientras que ratas normales tratadas también con NMU, desarrollaron un modelo maligno (100 %). Una explicación sería que durante la fase de promoción tumoral, de los 80 a los 100 días, existe una disminución de IGF-I total, relacionándose bajos niveles de IGF-I totales con lesiones benignas.

Por otro lado, los primeros trabajos de Huggins *et al.* (1959) (Huggins y Yang, 1962) sobre la inducción de tumores de mama con una sola dosis de DMBA, citaban la facilidad de administración del carcinógeno vía intubación intragástrica y la necesidad de una única administración del carcinógeno, como ventajas más significativas de este modelo de inducción tumoral. Sin embargo, este modelo presenta algunas limitaciones.

A diferencia del modelo de inducción de tumores de mama mediante NMU, cuyo efecto es directo sobre el material genético, el DMBA debe ser metabolizado antes de actuar como un carcinógeno. Concretamente, las células epiteliales mamarias metabolizan el DMBA a metabolitos polares, con la formación de epóxidos que causan el daño en el ADN. Por tanto, este modelo proporciona un método de estudio del cáncer de mama inducido por un carcinógeno que requiere activación metabólica. En este sentido, los tumores inducidos por DMBA son más dependientes de PRL y menos agresivos, que los inducidos por NMU, al igual que menos dependientes de estrógenos.

También, el carcinógeno DMBA, a diferencia de la NMU, forma uniones con residuos de deoxiguanosina y deoxiadenosina que conducen a la reparación por excisión, generando puntos de mutación de indefinida especificidad (Singer y Kusmierek, 1982), aunque algunos autores afirman que los tumores de mama inducidos por DMBA probablemente se originen por una mutación en el codon 61 del oncogen Ha-ras (Yuasa *et al.*, 1983; Taparowsky *et al.*, 1983).

Otra característica descrita por Huggins *et al.* (1959) (Huggins y Yang, 1962) sobre los tumores inducidos por DMBA, es que raramente metastatizan, pero son letales para el hospedador porque alcanzan un gran tamaño e invaden los tejidos adyacentes, con las consecuentes hemorragias y ulceraciones. Por otro lado, la proporción de tumores benignos inducidos por DMBA es mayor que en el caso de la NMU (Thompson y Adlakha, 1991).

La ruta patogénica de las lesiones tanto malignas como benignas inducidas por DMBA, se inicia en los brotes alveolares terminales (TEB), que originan adenocarcinomas que progresan desde proliferaciones intraductales a carcinomas *in situ*, a partir de los cuales se desarrollan múltiples subtipos de carcinomas *in situ* e invasivos. A partir de los brotes alveolares y los lóbulos, estructuras más diferenciadas, se originan lesiones benignas que aparecen más tarde que los carcinomas (Russo y Russo, 1991).

Aunque para ambos modelos de inducción de tumores de mama, ha sido descrito que los tumores se desarrollan con una frecuencia dos veces mayor en la línea de glándulas mamarias cérvico-torácica que en la línea de la región abdomino-inguinal, sin distinción entre derecha e izquierda, aún no ha sido descrita la relación entre los efectos de la dosis del carcinógeno o el tiempo de aparición del tumor y la localización anatómica, a pesar de que la posición superficial de la glándula mamaria permite fácilmente detectar los tumores por palpación y la clasificación histológica de estos tumores puede determinarse con relativa facilidad (Thompson y Adlakha, 1991).

1.2. Susceptibilidad de la Glándula Mamaria a la Carcinogénesis.

El cáncer de mama en modelos experimentales, es el resultado de la interacción de un carcinógeno con el órgano diana, la glándula mamaria. Esta diana, sin embargo, es extremadamente compleja, ya que la mama no responde al carcinógeno como un todo, sino que solo se afectan por los agentes genotóxicos determinadas estructuras dentro de la glándula. El conocimiento de la arquitectura y las características cinéticas celulares de la glándula mamaria en el momento de la exposición al carcinógeno, supone un paso necesario para la comprensión de la patogénesis de esta enfermedad.

La susceptibilidad de la glándula mamaria a la carcinogénesis inducida por DMBA y NMU es fuertemente dependiente de la edad; esta es máxima cuando el carcinógeno es administrado a ratas hembras vírgenes entre los 40 y 60 días de edad, justo después de la apertura vaginal y en los inicios de la maduración sexual (Grubbs *et al.*, 1986; Russo *et al.*, 1977; Rose *et al.*, 1980)

La incidencia de los tumores inducidos por DMBA alcanza el 100 % cuando el carcinógeno es administrado a ratas de 30-55 días de edad, pero el mayor número de tumores por animal es observado cuando el carcinógeno es administrado a edades de 40 a 46 días, coincidiendo con el periodo en el cual la glándula mamaria exhibe una mayor densidad de TEBs (Russo *et al.*, 1979; Russo y Russo, 1980b; Russo *et al.*, 1982). Los cambios tienen lugar en los TEB y en los

conductos terminales, estando limitados a las células tipo oscuro e intermedio, no afectando a las células mioepiteliales.

Como hemos visto, para la inducción de carcinomas mamarios en la rata, el carcinógeno requiere para actuar un compartimento específico de la glándula mamaria, los TEB. Aunque estas estructuras indiferenciadas están presentes en todas las glándulas mamarias, el desarrollo tumoral no ocurre como un proceso al azar en los seis pares de mamas. La incidencia tumoral en animales tratados con carcinógenos entre los 20 y 180 días, es mayor en aquellas glándulas localizadas en la región torácica, mientras que las glándulas localizadas en la región abdomino-inguinal desarrollan un menor número de tumores. Otra consecuencia de la localización topográfica de la glándula son las diferencias en el tipo de tumor, que parece variar con la edad del animal en el momento del tratamiento con el carcinógeno. Son más frecuentes adenocarcinomas ductales y papilares en la región torácica y abdominal de animales jóvenes, mientras que los adenocarcinomas con un modelo tubular se localizan mayoritariamente en glándulas abdominales de animales mayores (Russo y Russo, 1987).

El desarrollo de la glándula mamaria parte de una ramificación del parénquima en conductos terminales que progresivamente se diferencian, siendo este proceso común a los seis pares de glándulas. Sin embargo, esto no ocurre de forma simultánea en todas las mamas. Las estructuras individuales, como TEB o lóbulos, parecen ser similares en todas las glándulas, sin embargo su número relativo y la arquitectura general del órgano varía notablemente de un par de mamas a otras.

Así, las glándulas abdominales sufren una marcada reducción del número de TEB, localizados fundamentalmente en la porción más distal de la glándula. También es significativa la diferencia en el número de TEB en la región torácica frente a la región abdominal. Además, los TEB disminuyen progresivamente con la edad, siendo la reducción proporcional a toda la glándula. Esta reducción es debida a la diferenciación de la estructura en conductos terminales y lóbulos. La alta incidencia de carcinomas ductales observados en la región torácica, se atribuye a la diferencia en el grado de desarrollo de la capa de células indiferenciadas de esta glándula en comparación con las localizadas en otras áreas topográficas (Russo *et al.*, 1989b).

En relación al lugar de origen de los neoplasmas mamarios, existen evidencias que apoyan el hecho de que los tumores se originan en las estructuras lobulares tipo 1, Lob 1, la estructura indiferenciada mayoritaria presente en la mama de mujeres nulíparas (Russo *et al.*, 1990). Diferentes estudios han demostrado la correlación existente entre los TEB de la glándula mamaria de rata y el Lob 1 de la

mama humana en cuanto a su potencial carcinogénico (Russo *et al.*, 1990; Russo y Russo, 1987; Russo *et al.*, 1993; Russo y Russo, 1993; Russo *et al.*, 1994).

Por último mencionar que, diferencias genéticas entre individuos pueden afectar a la susceptibilidad al efecto carcinogénico del compuesto químico (Russo y Russo, 1996a).

1.3. 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.

1.3.1. 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-UIBM*: 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.

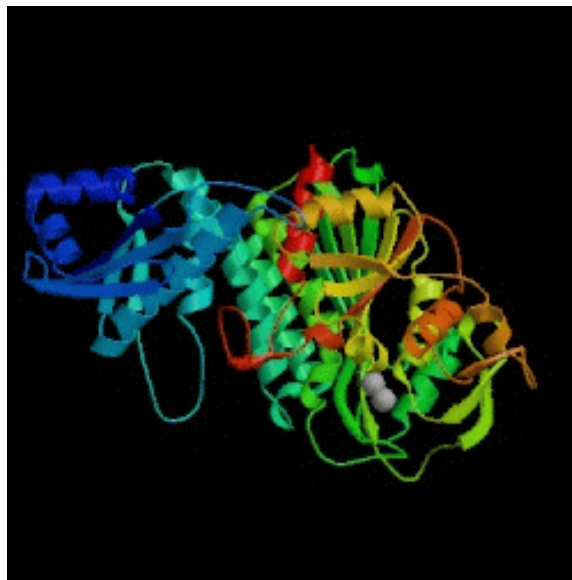


Figura 1. Estructura tridimensional propuesta para la enzima IRAP/P-LAP.

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).

1.3.2. 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- β -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- β -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 polipeptídica intacta (") es susceptible de proteólisis generando dos fragmentos de 90 (\$) y 45 (C) KDa con un átomo de Zn^{2+} 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).

1.3.3. Aminopeptidasa B

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

- *Clasificación enzimática del NC-UIBMB:* 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).

2. 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 ratas con tumores mamarios inducidos por NMU y determinar el papel que pudiera desempeñar en la carcinogénesis inducida por NMU a nivel de la glándula mamaria. 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.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Animales y Tratamiento

Veintiséis ratas vírgenes de la variedad Wistar (159.4 ± 4.6 g) se utilizaron para este trabajo. Los animales fueron proporcionados por el Estabulario de los Servicios Técnicos de Investigación de la Universidad de Jaén y estuvieron bajo un ambiente controlado, con una temperatura constante de 25°C y un ciclo de luz / oscuridad de 12 horas respectivamente. Todos los animales dispusieron de comida

y agua *ad libitum*. Los procedimientos experimentales que se llevaron a cabo con los animales estuvieron de acuerdo con la normativa de la Comunidad Europea 86/609 / EEC.

Las ratas se dividieron aleatoriamente en dos grupos. A un grupo (16 animales) se le inyectaron intraperitonealmente tres dosis de 50mg/ Kg peso de NMU disuelto en agua destilada (10 mg/ml) a los 50, 80 y 110 días del nacimiento, como describe Rivera *et al.* (1994). Al grupo control solo se le inyectó el disolvente, agua destilada. Las ratas fueron examinadas por palpación dos días a la semana después de la segunda inyección de NMU para detectar la presencia de tumores.

El crecimiento del tumor fue analizado mediante los parámetros Periodo de Latencia o número de días transcurridos entre la primera inyección de NMU y la aparición del primer tumor, Incidencia Tumoral o porcentaje de ratas que desarrollaron al menos un tumor, y Número Medio de Tumores por Rata o número de tumores por rata en animales que desarrollan al menos un tumor.

3.2. Obtención y Preparación de las Muestras

A los 122 días de la primera inyección de NMU, los animales fueron sacrificados bajo anestesia de equitensin (2 ml/Kg de peso). Se obtuvieron muestras de sangre a partir del ventrículo izquierdo y se centrifugaron durante diez minutos a 3000 g para obtener el suero. Estas muestras fueron congeladas y almacenadas a -80°C para su análisis posterior.

3.3. 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 duplicado. 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.

3.4. 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 Coomasie 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 Coomasie G azul brillante. El blanco de la prueba consiste en 2 ml de esta solución en ausencia de muestra. Los valores de absorbancia leídas 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 duplicado.

3.5. Análisis Estadístico

Para analizar las diferencias entre el grupo de animales control y el grupo de animales con tumores de mama inducidos por NMU se utilizó el test de la *t*-de Student. Para ello se ha utilizado el software Statgraphics 5.0. Con este objetivo, los datos correspondientes a los parámetros estudiados fueron organizados en archivos adecuados al tratamiento estadístico en una base de datos Lotus e importados desde Statgraphics para su procesamiento. Valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

4. RESULTADOS.

4.1. Parámetros de Crecimiento Tumoral

Los parámetros de crecimiento tumoral obtenidos para el modelo de cáncer de mama en rata inducido por NMU son los siguientes: periodo de latencia de 97.4 ± 6.9 días (Media \pm EEM), incidencia tumoral del 44 % y número medio de tumores por rata de 1.86 ± 0.4 (Media \pm EEM). El porcentaje de mortalidad fué del 14%. En la figura 2 se muestra una fotografía ejemplo de los tumores inducidos por NMU. La figura 3 muestra la localización, diametro mayor y diametro menor de los tumores de mama inducidos por NMU en cada animal.



Figura 2. Fotografía que muestra la localización de los tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU).

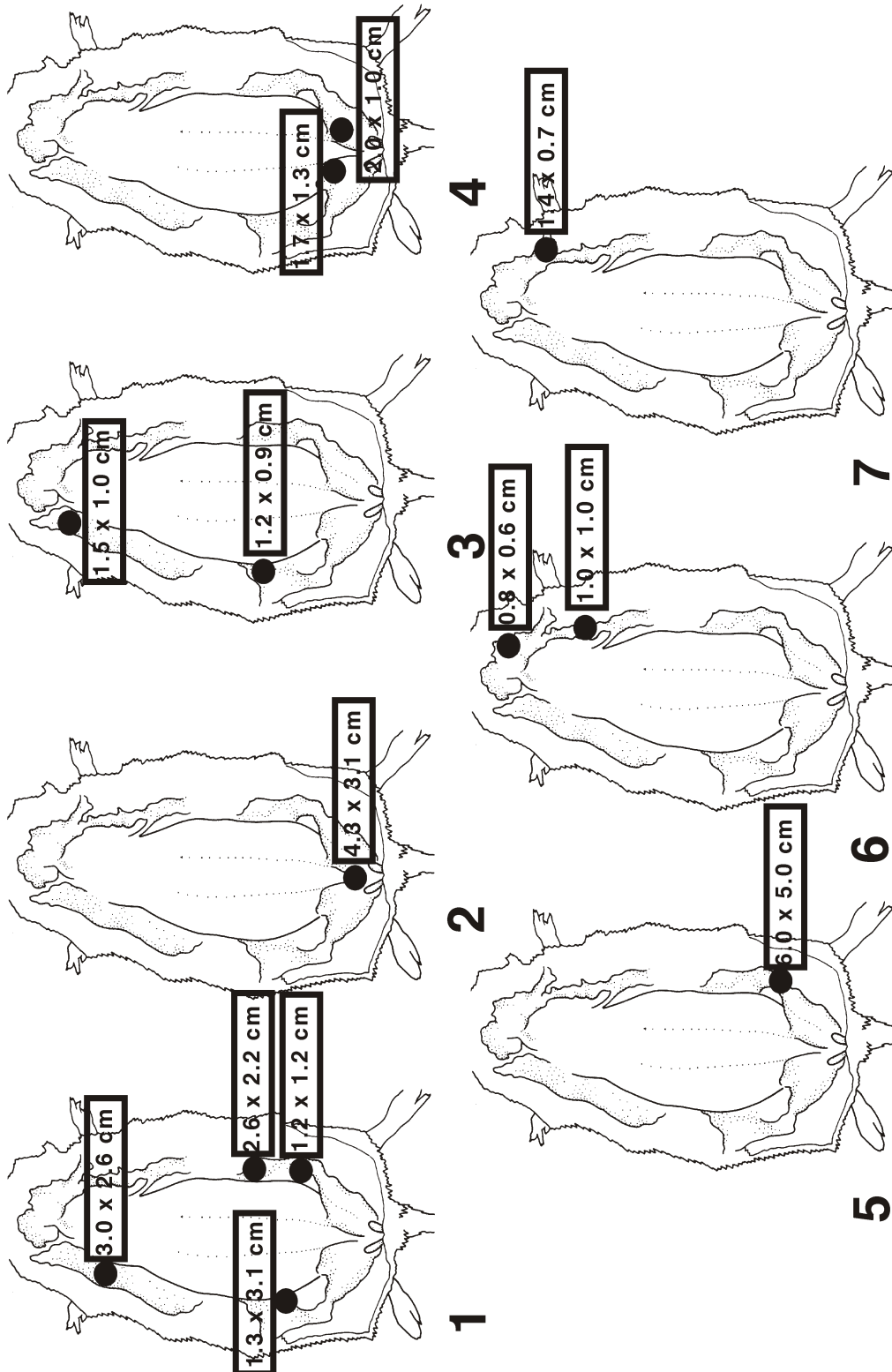


Figura 3. Localización, diámetro mayor y diámetro menor de los tumores de mama inducidos por la administración de N-metil nitrosourea (NMU) en cada animal.

4.2. Actividad específica de IRAP/P-LAP, APN y APB del suero de animales controles y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea.

El análisis de la actividad específica de IRAP/P-LAP, APN y APB del suero de animales controles y con tumores de mama inducidos por la administración de NMU, muestra los siguientes resultados:

La actividad específica IRAP/P-LAP muestra un incremento significativo ($p < 0.01$) del 54.41 % en los animales con tumores de mama inducidos por NMU respecto a los controles (figura 4A).

La actividad específica APN no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU (figura 4B).

La actividad específica APB muestra un incremento significativo ($p < 0.01$) del 32 % en los animales con tumores de mama inducidos por NMU, respecto a los controles (figura 4C).

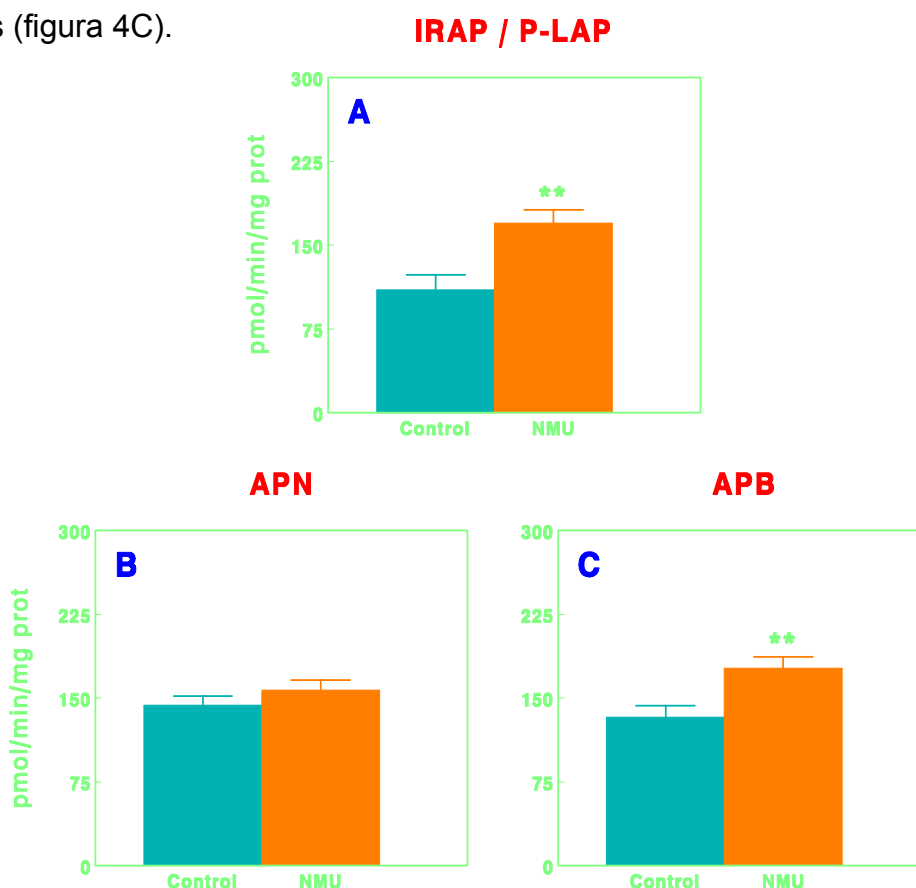


Figura 4. Representación de los valores de actividad específica IRAP/P-LAP (A), APN (B) y APB (C) del suero de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan, respectivamente, en picomoles de leucina- β -naftilamida, alanina- β -naftilamida y arginina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm EEM; ** $p < 0.01$; $n = 7-10$)

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 ratas con tumor de mama inducido mediante el carcinógeno NMU: IRAP/P-LAP, APN y APB. De ellas, las actividades específicas de IRAP/P-LAP y APB se encuentran altamente incrementadas, mientras que la actividad específica de APN no se vió modificada.

La enzima IRAP/P-LAP es una proteína de membrana de tipo II. Su clonación en 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 (OT). La OT 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 OT 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 OT 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 OT (Itoh y Nagamatsu, 1995).

La OT 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 OT/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 el 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 OT 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 oxitocinasa 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 OT 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 OT estarían disminuidos en el suero de las ratas con tumores de mama. Por lo tanto, el papel de la OT como regulador del crecimiento en patologías neoplásicas, siendo además confirmado el efecto inhibitorio sobre el crecimiento de carcinomas mamarios en rata y ratón *in vivo*, y el imprevisto papel de la OT 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 OT-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.

Por lo que respecta a la APB, que también muestra un incremento significativo en el suero de ratas con cáncer de mama, nos indica que en el cáncer de mama inducido por NMU 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 este modelo animales de 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, en el presente trabajo no observamos diferencias entre los valores encontrados en el suero de ratas con cáncer de mama inducido por NMU y ratas controles. 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) han propuesto la actividad APN sérica como posible marcador del cáncer de mama ya que su actividad estaría aumentada significativamente en estos pacientes. Sin embargo, trabajos anteriores desarrollados en nuestro laboratorio muestran unos resultados contrarios a los propuestos por Severini *et al.* (1991) debido a que en este caso la actividad APN sérica disminuye significativamente en pacientes con cáncer de mama (Martínez *et al.*, 1999). Estos resultados, junto con los obtenidos en el presente trabajo en el que la actividad de APN sérica no esta modificada, reflejan el desconocimiento 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 (figura 5), podríamos decir que el aumento de los niveles de Ang IV promovido por la elevada actividad de 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 OT 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, ambas 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.

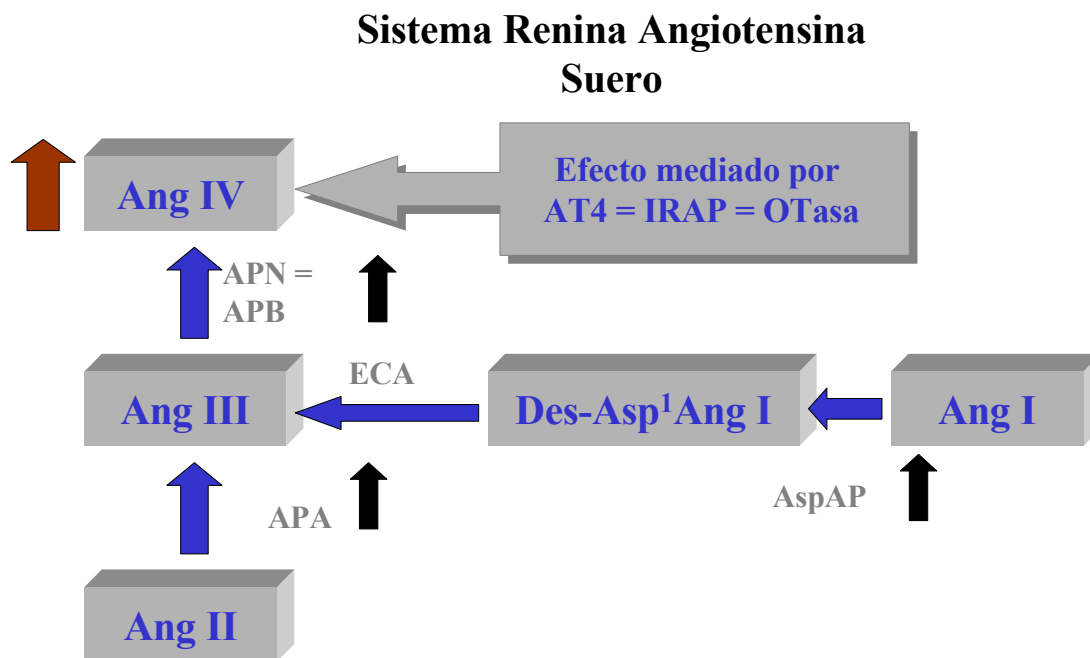


Figura 5. Relación entre distintos enzimas proteolíticos reguladores, las hormonas peptídicas que son su substrato y el cáncer de mama. .

6. BIBLIOGRAFÍA

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).

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

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).

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).

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).

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).

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, 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).

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

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

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).
- 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).
- 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).
- Delmas B, Gelfi J, L'Haridon R, Vogel LK, Sjostrom H, Noren O, Laude H. Aminopeptidase N is a major receptor for the entero-pathogenic coronavirus TGEV. *Nature* 357: 417-420 (1992).
- Feracci H, Maroux S. Rabbit intestinal aminopeptidase N. Purification and molecular properties. *Biochim Biophys Acta* 599: 448-463 (1980).
- Foulon T, Cadel S, Cohen P. Aminopeptidase B (EC 3.4.11.6). *Int J Biochem Cell Biol* 31: 747-750 (1999).
- 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).
- 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).
- 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).
- 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).

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).

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).

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).

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).

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).

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).

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

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-nitrosourea. *Nature* 267: 620-621 (1977).

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

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).

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

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

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).

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).

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).

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

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

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).

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

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 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).

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).

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).

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).

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, 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).

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).

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).

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).

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).

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).

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).

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.