



UNIVERSIDAD DE JAÉN

**FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES Y
DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD**

TESIS DOCTORAL

**AMINOPEPTIDASAS SÉRICAS Y
TISULARES EN EL MODELO ANIMAL DE
CÁNCER DE MAMA INDICADO POR
N-METIL-NITROSOUREA (NMU)**

**PRESENTADA POR:
MARÍA DEL PILAR CARRERA GONZÁLEZ**

**DIRIGIDA POR:
DR. D. JOSÉ MANUEL MARTÍNEZ MARTOS
DRA. DÑA. MARÍA JESÚS RAMÍREZ-EXPÓSITO**

JAÉN, 30 DE MARZO DE 2004

ISBN 978-84-8439-432-7

Nombre y apellidos del autor:

MARÍA DEL PILAR CARRERA GONZÁLEZ

Título de la Tesis Doctoral:

AMINOPEPTIDASAS SÉRICAS Y TISULARES EN UN MODELO ANIMAL DE CANCER DE MAMA INDICADO POR N-METIL-NITROSOUREA (NMU)

I.S.B.N.:

978-84-8439-432-7

Fecha de Lectura:

30 DE MARZO DE 2004

Centro y Departamento en que fue realizada la lectura:

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES Y DE LA SALUD
Departamento de Ciencias de la Salud

Composición del Tribunal/Dirección de la Tesis:

Dirección de la Tesis	Dr. D. José Manuel Martínez Martos Dra. Dña. María Jesús Ramírez-Expósito
Presidente/a del Tribunal	Dr. D. Basilio Dueñas Rodríguez
Vocales	Dra. Dña. María Teresa Valenzuela Claros Dr. D. Felix Vargas Palomares Dr. D. Juan Antonio Marchal Corrales
Secretario/a	Dra. Dña. María Luisa del Moral Leal

Calificación Obtenida:

SOBRESALIENTE CUM LAUDE POR UNANIMIDAD



UNIVERSIDAD DE JAÉN

tesis doctoral

Resumen

En los países desarrollados, el cáncer de mama es el cáncer más común entre las mujeres, y la principal causa de muerte entre éstas. Desde los años 80 se sabe que los mismos factores que son responsables de la proliferación del tejido mamario normal durante la pubertad y de los cambios cíclicos del ciclo menstrual, están implicados en la promoción, progresión y aparición del cáncer de mama. De hecho, los estrógenos y la progesterona son mitogénicos en tejido mamario, de modo que mujeres que nunca han tenido un adecuado funcionamiento de los ovarios en términos hormonales, muestran una ausencia casi total de cáncer de mama, siendo la incidencia similar a la observada en varones.

Los modelos en roedores han sido particularmente útiles para el estudio del cáncer de mama, porque en estas especies, la glándula mamaria es fuente de neoplasmas hormono-dependientes, que son en muchos aspectos similares a los más frecuentes diagnósticos de malignidad detectados en mujeres. Existen numerosos trabajos que documentan que los mismos tipos de lesiones benignas, premalignas y malignas morfológicamente detectables que se desarrollan en la mama humana también aparecen en modelos de roedores durante la carcinogénesis mamaria. Es por ello que la inducción de carcinomas mamarios por inyección de N-Metil-nitrosourea (NMU) en ratas hembras es uno de los métodos más frecuentemente utilizados para la investigación de la carcinogénesis de mama y de los tratamientos de tumores de mama. El estatus endocrino de dichos carcinomas, parece ser similar al del cáncer de mama en mujeres. Generalmente, la NMU induce carcinomas mamarios que se caracterizan por ser agresivos, localmente invasivos y capaces de metastizarse.

Dentro de este contexto, los enzimas proteolíticos (peptidasas) son particularmente interesantes en la investigación del cáncer porque pueden participar, al menos en parte, en la metástasis. La mayoría de peptidasas son exopeptidasas, que liberan uno o varios aminoácidos del extremo N- o C- terminal, o endopeptidasas, que actúan internamente en

el péptido. Las exopeptidasas que actúan en el extremo N- terminal y que liberan un solo residuo aminoácido se conocen como aminopeptidasas (APs). Estas APs, generalmente son metalopeptidasas dependientes de zinc, es decir, hidrolasas en las que la ruptura del enlace peptídico es mediado por una molécula de agua, que es activada por un catión metálico divalente, normalmente el zinc. Algunas de estas aminopeptidasas son utilizadas en clínica como marcadores de enfermedades y además juegan un importante papel fisiológico en la regulación de varios péptidos biológicamente activos. Cambios en estos péptidos podrían reflejarse en modificaciones de las actividades enzimáticas. La finalidad del presente trabajo es analizar la actividad de un amplio espectro de aminopeptidasas, de sustratos neutros como la alanina aminopeptidasa, (APN, CD13); (E.C: 3.4.11.2), leucina aminopeptidasa (LeuAP); (E.C: 3.4.11.1), tirosina aminopeptidasa (TyrAP); (E.C: 3.4.11.-) y cistina aminopeptidasa (Oxitocinasa); (E.C: 3.4.11.3), básicos como la arginina aminopeptidasa (APB); (E.C: 3.4.11.6) ácidos, como la aspartato y glutamato amino-peptidasa (Amino-peptidasa A, APA); (E.C: 3.4.11.7) y de tipo omega, como la pirrolidon carboxipeptidasa (piroglutamato amino-peptidasa, Pcp); (E.C: 3.4.19.3) en el suero y diversos tejidos de ratas con tumores de mama inducidos por NMU, para evaluar, por un lado, el posible valor de estas actividades como marcadores biológicos de esta enfermedad, y por otro, el papel que pudieran desempeñar las distintas hormonas peptídicas a las que regulan, en la promoción y/o progresión tumoral.

De este modo, se han llevado a cabo los siguientes experimentos:

- Inducción de tumores de mama en ratas mediante la administración de N-metil-nitrosourea.
- Análisis de la evolución del peso corporal, localización y número de tumores, diámetros mayor y menor de los tumores.
- Análisis de otros parámetros de desarrollo tumoral, como son el periodo de latencia, la incidencia tumoral y el número medio de tumores por rata.
- Análisis de la actividad específica de APN, APB, oxitocinasa, Pcp, AspAP, GluAP, LeuAP y TyrAP en suero de ratas controles y ratas con cáncer de mama inducido por la administración de N-metil nitrosourea.
- Análisis de la actividad específica soluble y unida a membrana de APN, APB, oxitocinasa, Pcp, AspAP, GluAP, LeuAP y TyrAP en el hipotálamo, la hipófisis anterior, la hipófisis posterior, la glándula pineal, la mama, el tiroides, la corteza y médula adrenal, el ovario y el útero.

Los resultados obtenidos dan lugar a las siguientes conclusiones:

Primera: El cáncer de mama en ratas inducido por N-metil nitrosourea provoca la modificación de la actividad específica de diversas enzimas proteolíticas reguladoras de hormonas peptídicas con importantes funciones autocrinas/paracrinas. Estas modificaciones se manifiestan no solo a nivel de la mama, sino también en el suero y a nivel de diferentes sistemas endocrinos.

Segunda: En el suero, las modificaciones de las actividades angiotensinasas, oxitocinasa, pirrolidón carboxipeptidasa y encefalinasa, en ratas con cáncer de mama inducido por N-metil nitrosourea, sugieren una disminución de los niveles de angiotensina II, oxitocina y encefalinas, y un aumento de los niveles de Ang IV y GnRH con la enfermedad. Además, el hecho de que el receptor AT4 para la Ang IV muestre actividad oxitocinasa, sugiere la existencia de una conexión entre un sistema renina-angiotensina local a nivel de mama y el sistema oxitocina-receptores de oxitocina-oxitocinasa, que estaría implicado en el desarrollo y progresión del cáncer de mama, de forma, además, dependiente de estrógenos.

Tercera: A nivel local de la mama, las modificaciones de las actividades angiotensinasas, pirrolidón carboxipeptidasa y encefalinasa, en ratas con cáncer de mama inducido por N-metil-nitrosourea, sugieren un aumento de los niveles de angiotensina III y encefalinas, y la rápida degradación de los elevados niveles de GnRH circulante, que estarían implicados en los procesos de promoción y/o progresión de la enfermedad.

Cuarta: A nivel del eje hipotálamo-hipófisis, las modificaciones de las actividades angiotensinasas, oxitocinasa, pirrolidón carboxipeptidasa y encefalinasa en ratas con cáncer de mama inducido por N-metil nitrosourea, sugieren la existencia de alteraciones en distinta dirección de los niveles de angiotensinas, oxitocina, GnRH y encefalinas, que pueden ser responsables de alterar los mecanismos de regulación de la secreción hipofisaria de distintas hormonas con importantes funciones en los procesos de promoción y/o progresión del cáncer de mama, encontrándose alterada la función de las glándulas endocrinas a las que regulan, como son el tiroides, las glándulas adrenales o las gónadas.

Quinta: A nivel de la glándula pineal, las modificaciones de las actividades angiotensinasas y oxitocinasa en ratas con cáncer de mama inducido por N-metil nitrosourea,

sugieren un aumento en los niveles de angiotensina II y una disminución de los niveles de oxitocina, que podrían ser responsables de una mayor producción de melatonina, lo que soportaría un mecanismo de defensa para evitar la promoción y/o progresión del cáncer de mama.

Sexta: La patogénesis del cáncer de mama en rata, estudiada utilizando un modelo de inducción de tumores por la administración de N-metil-nitrosourea, implica a un gran número de sistemas hormonales tanto endocrinos como autocrinos y paracrinos, que modifican la fisiología del organismo en distinta dirección, siendo sus efectos más visibles la aparición de los tumores de mama.

Séptima: La inducción de tumores de mama en rata mediante la administración de N-metil nitrosourea es un método adecuado para el estudio del papel de los enzimas proteolíticos reguladores como marcadores biológicos de la enfermedad, y del papel de las hormonas peptídicas a las que regulan, en la promoción y progresión del cáncer de mama.



UNIVERSIDAD DE JAÉN

AMINOPEPTIDASAS SÉRICAS
Y TISULARES EN UN MODELO
ANIMAL DE CÁNCER DE MAMA
INDUCIDO POR N-METIL-
NITROSOUREA (NMU)

MARÍA DEL PILAR CARRERA GONZÁLEZ


tesis doctoral



*Suelo. Nada más.
Suelo. Nada menos.
Y que te baste con eso.
Porque en el suelo los pies hincados,
en los pies torso firme,
y allá, al socaire de la frente,
la idea pura y en la idea pura
el mañana, la llave
-mañana- de lo eterno.
Suelo. Ni más ni menos.
Y que te baste con eso.*

*Presagios, 1924
Pedro Salinas.*

**A mi familia y
a todos mis grandes amigos, de los que presumo.**




A M^a Jesús y a Jose Manuel por la confianza que depositaron en mi y por su ayuda y apoyo a lo largo de todo este proyecto, que han hecho posible que llegue este momento. A mis compañeras, las doctoras M^a Dolores Mayas y M^a Jesús García, por sus continuos, “tranquila, que todo irá bien”. Gracias niñas.

A mis compañeros de otras áreas como David, Manu, Patricia, Alberto, Pakito, Lourdes, Jose, Martín y a todos aquellos que me han ayudado resolviendo mis continuas dudas y me han animado y ayudado en la marcha de mi trabajo. Muchas gracias a ellos también. A los profesores Antonio Carúz, Paco Navarro y Amelia Aránega por estar siempre dispuestos a solucionarme todas mis preguntas.

A M^a Angeles y a Manolo, por su apoyo a lo largo de todo este tiempo.

Y por supuesto, a Ricardo, por introducirme en el mundo de la biología molecular y por su enorme paciencia y momentos de conversación.



El trabajo que aquí se presenta ha sido realizado en el Área de Fisiología del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad de Jaén.

Parte de los resultados obtenidos han sido presentados al *7th World Congress for Biomedical Sciences (2002)*, al *CNIO Cancer Conference (2003)* y publicados en *Endocrinología y Nutrición* (en prensa), *Hormone and Metabolic Research* 35: 502-505 (2003), *Anticancer Research* (en prensa) y *Life Sciences* (en prensa).

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 (CVI 296), subvención para Acciones Coordinadas de la Junta de Andalucía y Plan Propio de la Universidad de Jaén (Proyecto UJA2003-014).

I. ÍNDICE

I. Índice	7
II. Introducción	14
1. Enzimas proteolíticos.....	15
1.1. Introducción	16
1.2. Clasificación.....	17
1.2.1. Endopeptidasas	20
1.2.2. Exopeptidasas	20
1.3. Resumen histórico.....	21
1.4. Aminopeptidasas	24
1.4.1. Alanina aminopectidasa.....	24
1.4.1.1. Alanina aminopectidasa soluble	24
1.4.1.2. Alanina aminopectidasa microsomal.....	25
1.4.2. Arginina aminopectidasa	27
1.4.3. Cisteina aminopectidasa.....	28
1.4.4. Aspartato aminopectidasa.....	29
1.4.5. Glutamato aminopectidasa	30
1.4.6. Pirrolidón carboxipeptidasa.....	31
1.4.6.1. Pirrolidón carboxipeptidasa I	32
1.4.6.2. Pirrolidón carboxipeptidasa II.....	33
1.4.7. Leucina aminopectidasa	34
1.4.8. Tirosina aminopectidasa.....	35
2. La glándula mamaria.....	37
2.1. Introducción	38
2.2. Estructura de la glándula mamaria.....	38
2.3. Desarrollo y morfogénesis de la glándula mamaria.....	41
2.4. Neuroendocrinología de la glándula mamaria	44

2.4.1. Eje hipotálamo-hipófisis.....	44
2.4.1.1. Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH).....	44
2.4.1.1.1. Hormonas esteroideas ováricas.....	46
2.4.1.1.2. Acción conjunta de estrógenos y progesterona.....	47
2.4.1.2. Hormona liberadora de tirotrópina (TRH).....	49
2.4.1.2.1. Hormonas tiroideas.....	49
2.4.1.3. Prolactina.....	50
2.4.1.4. Hormona del crecimiento.....	51
2.4.1.5. Oxitocina.....	52
2.4.2. Otras hormonas implicadas.....	53
2.4.2.1. Opioides.....	53
2.4.2.2. Sistema renina-angiotensina.....	54
2.4.2.3. Melatonina.....	54
3. El cáncer de mama.....	56
3.1. Generalidades.....	57
3.1.1. El proceso de carcinogénesis.....	57
3.1.2. Tipos de cáncer.....	58
3.1.3. Etapas del cáncer.....	59
3.1.4. Capacidad invasiva y metástasis.....	60
3.1.5. Origen del cáncer.....	61
3.1.6. Agentes causantes de mutaciones.....	62
3.2. El cáncer de mama.....	64
3.2.1. Lesiones neoplásicas mamarias.....	65
3.2.2. Neuroendocrinología del cáncer de mama.....	69
3.2.2.1. Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH).....	70
3.2.2.2. Hormona luteinizante (LH) y hormona foliculo estimulante (FSH).....	70
3.2.2.2.1. Estrógenos y progesterona.....	70

3.2.2.3. Eje hipotálamo-hipófisis-tiroides.....	73
3.2.2.4. Eje hipotálamo-hipófisis-glándula adrenal	77
3.2.2.5. Eje hipotálamo-hipófisis-glándula mamaria.....	78
3.2.2.5.1. Prolactina	78
3.2.2.5.2. Oxitocina.....	80
3.2.2.5.3. Vasopresina	82
3.2.3. Otras hormonas implicadas	83
3.2.3.1. Opioides.....	83
3.2.3.2. Melatonina	84
3.3. Angiogénesis	89
3.3.1. Angiogénesis y sistema renina-angiotensina	89
III. Hipótesis y Planteamiento.....	91
IV. Material y Métodos	95
1. Animales	96
1.1. Grupos experimentales.....	96
2. Sacrificio de los animales y obtención de muestras.....	97
3. Análisis histológico de las muestras mamarias.....	98
4. Obtención de la fracción soluble y de membrana.....	98
5. Determinación de la actividad de aminopeptidasas.....	100
5.1. Recta de calibrado de β -naftilamina.....	100
6. Determinación de proteínas	102
6.1. Recta de calibrado de albúmina	103
7. Análisis estadístico.....	103
8. Soluciones	103
8.1. Solución de N-metil-nitrosourea	103

8.2. Hematoxilina	104
8.3. Eosina	104
8.4. Equitensin.....	104
8.5. Tris-ClH, 50 mM.....	105
8.6. Tris-ClH, 10 mM.....	105
8.7. Tris-ClH, 10 mM, Triton X-100 1%.....	105
8.8. Tampón fosfato 50 mM, pH 7.4	105
8.9. Tampón acetato 0.1 M, pH 4.2	105
8.10. Soluciones de incubación.....	106
8.10.1. Solución de alanina- β -naftilamida.....	106
8.10.2. Solución de arginina- β -naftilamida	106
8.10.3. Solución de cisteina- β -naftilamida	106
8.10.4. Solución de piroglutamato- β -naftilamida.....	106
8.10.5. Solución de aspartato- β -naftilamida.....	107
8.10.6. Solución de glutamato- β -naftilamida	107
8.10.7. Solución de leucina- β -naftilamida.....	107
8.10.8 Solución de tirosina- β -naftilamida	107
8.11. Solución de β -naftilamina	107
8.12. Solución de albúmina	107
8.13. Solución de Bradford	107
V. Resultados.....	108
1. Evolución del peso corporal y parámetros de crecimiento tumoral.....	109
1.1. Evolución del peso corporal.....	110
1.2. Localización y tamaño de los tumores de mama inducidos por N-metil-nitrosourea. Parámetros de crecimiento tumoral	113
2. Actividad específica de aminopeptidasas séricas en ratas con tumores	

de mamainducidos por N-metil-nitrosourea	115
2.1. Actividad específica de aminopeptidasas del suero en animales controles y contumores de mama inducidos por N-metil-nitrosourea	116
3. Actividad específica de aminopeptidasas tisulares en ratas con tumores de mamainducidos por N-metil-nitrosourea	122
3.1. Actividad específica de aminopeptidasas solubles y unidas a membrana en elhipotálamo de animales controles y con tumores de mama inducidos por N-metil-nitrosourea	123
3.2. Actividad específica de aminopeptidasas solubles y unidas a membrana en lahipófisis anterior de animales controles y con tumores de mama inducidos por N-metil-nitrosourea.....	129
3.3. Actividad específica de aminopeptidasas solubles y unidas a membrana en lahipófisis posterior de animales controles y con tumores de mama inducidos por N-metil-nitrosourea.....	135
3.4. Actividad específica de aminopeptidasas solubles y unidas a membrana en laglándula pineal de animales controles y con tumores de mama inducidos por N-metil-nitrosourea.....	141
3.5. Actividad específica de aminopeptidasas solubles y unidas a membrana en laglándula mamaria de animales controles y con tumores de mama inducidos por N-metil-nitrosourea.....	147
3.6. Actividad específica de aminopeptidasas solubles y unidas a membrana en eltiroides de animales controles y con tumores de mama inducidos por N-metil-nitrosourea	153
3.7. Actividad específica de aminopeptidasas solubles y unidas a membrana en laglándula adrenal (corteza y médula) de animales controles y con tumores de mamainducidos por N-metil-nitrosourea	159
3.8. Actividad específica de aminopeptidasas solubles y unidas a membrana en elovario de animales controles y con tumores de mama	

inducidos por N-metil-nitrosourea	170
3.9. Actividad específica de aminopeptidasas solubles y unidas a membrana en elútero de animales controles y con tumores de mama inducidos por N-metil-nitrosourea	176
VI. Discusión.	182
1. Sobre los modelos animales de cáncer de mama	183
1.1. Sobre la susceptibilidad de la glándula mamaria a la carcinogénesis	188
2. Sobre la determinación de actividades aminopeptidasas	190
3. Sobre la actividad de aminopeptidasas séricas en ratas con cáncer de mamainducido mediante N-metil nitrosourea	191
3.1. Sobre las actividades angiotensinasas	192
3.2. Sobre la actividad oxitocinasa	194
3.3. Sobre la actividad pirrolidón carboxipeptidasa	195
3.4. Sobre la actividad encefalinasa	196
4. Sobre la actividad de aminopeptidasas tisulares en ratas con cáncer de mamainducido mediante N-metil-nitrosourea	197
4.1. Glándula mamaria	197
4.1.1. Sobre las actividades angiotensinasas	198
4.1.2. Sobre la actividad pirrolidón carboxipeptidasa	200
4.1.3. Sobre la actividad encefalinasa	202
4.2. Hipotálamo	204
4.2.1. Sobre las actividades angiotensinasas	204
4.2.2. Sobre la actividad oxitocinasa	209
4.2.3. Sobre la actividad pirrolidón carboxipeptidasa	211
4.2.4. Sobre la actividad encefalinasa	213
4.3. Hipófisis	213

4.3.1. Sobre las actividades angiotensinasas	214
4.3.2. Sobre la actividad encefalinasa	215
4.4. Glándula pineal	215
4.4.1. Sobre las actividades angiotensinasas	216
4.4.2. Sobre la actividad oxitocinasa	221
4.5. Tiroides.....	221
4.5.1. Sobre las actividades angiotensinasas	222
4.5.2. Sobre las actividades oxitocinasa y encefalinasa	224
4.6. Glándula adrenal	225
4.6.1. Corteza adrenal.....	225
4.6.1.1. Sobre las actividades angiotensinasas	226
4.6.2. Médula adrenal	229
4.6.2.1. Sobre la actividad oxitocinasa	229
4.6.2.2. Sobre la actividad encefalinasa	231
4.7. Ovario.....	232
4.7.1. Sobre las actividades angiotensinasas	232
4.7.2. Sobre la actividad oxitocinasa	233
4.7.3. Sobre la actividad pirrolidón carboxipeptidasa	233
4.7.4. Sobre la actividad encefalinasa	234
4.8. Útero.....	234
4.8.1. Sobre las actividades angiotensinasas	234
VII. Conclusiones	236
VIII. Bibliografía	239

II. INTRODUCCIÓN

1. ENZIMAS PROTEOLÍTICOS

1.1. INTRODUCCIÓN.

Los enzimas proteolíticos son aquéllos que catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos. Existen varios términos que, aunque tuvieron mínimas diferencias de significado (Barrett y McDonald, 1986), hoy se usan indistintamente junto al de enzimas proteolíticos, y son proteasas, proteinasas y peptidasas (Barrett *et al.*, 1998).

Desde un punto de vista químico, un enlace peptídico (*Figura I.1.*) es un enlace amido establecido entre el grupo α -carboxílico de un aminoácido y el grupo α -amino del siguiente aminoácido de una cadena polipeptídica (con pérdida de una molécula de agua). Los enzimas que catalizan la ruptura hidrolítica de este enlace se denominan hidrolasas, según la Lista de la Comisión de Enzimas, E.C. (Webb, 1993).

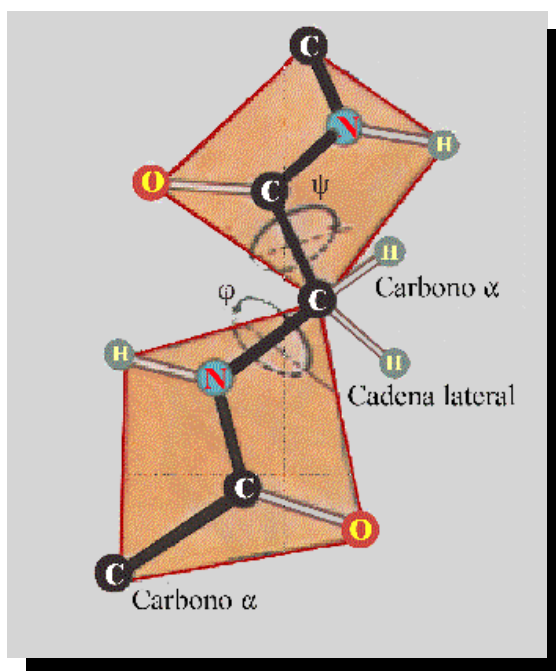


Figura I.1. Esquema de un enlace péptidico y su representación tridimensional.

Esta primera lista, principalmente la parte encargada de las peptidasas (perteneciente a la clase 3, subclase 3.4.), ha experimentado la mayor revisión, basada en las recomendaciones de un grupo de expertos del Comité de Nomenclatura de la Unión de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB), que todavía hoy sigue en ello

(www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzyme.html). Además, por si queda la posibilidad de que hubiese limitaciones con la clasificación para algunos de los enzimas aparece la clasificación denominada MEROPS, que asigna las peptidasas a familias en base a las similitudes de la secuencia de aminoácidos; y grupos de familias forman clanes de acuerdo a la estructura tridimensional (Barrett *et al.*, 1998).

Uno de los temas al que se ha dedicado gran parte de la investigación científica en los últimos años, ha sido el estudio del metabolismo proteico. El conocimiento de la maquinaria encargada de sintetizar proteínas (el anabolismo proteico), desde el proceso de transcripción del material genético hasta el mecanismo de traducción a nivel ribosomal, junto con las complejas modificaciones posttraduccionales, constituye un cuerpo de doctrina perfectamente coherente y sobradamente contrastado. Sin embargo, los procesos por los que las proteínas son nuevamente reducidas a sus pilares básicos, así como los mecanismos que regulan el catabolismo proteico, constituyen una laguna a pesar de que también se ha dedicado a este tema una considerable proporción de investigación experimental.

Todo lo que hoy se sabe sobre la degradación proteica se reduce al conocimiento de un determinado número de enzimas, ampliamente distribuidos en la naturaleza, con capacidad de catalizar la hidrólisis de los enlaces peptídicos.

Por otra parte, y a diferencia de los procesos anabólicos proteicos, todo este conocimiento se agrupa en una serie de datos que no presentan un nexo que interrelacione la actividad de unos enzimas con otros, ni con el resto del metabolismo celular, por lo que no se tiene aún un marco general donde pueda describirse una teoría del catabolismo proteico como un conjunto coherente de datos.

1.2. CLASIFICACIÓN.

Aunque actualmente resulte demasiado simplificado, clásicamente los enzimas proteolíticos se dividieron en exopeptidasas y endopeptidasas. Los primeros hidrolizan enlaces próximos (uno o dos residuos) a los extremos N- o C-terminal de la cadena polipeptídica, mientras que las endopeptidasas actuarían sobre enlaces distantes de los extremos de la cadena.

Dado que la especificidad de muchos de estos enzimas resulta demasiado compleja, debido a la existencia de enzimas con actividad exo- y endopeptidasa, (Singh y Kalnitsky, 1980) y ante la aparición de peptidasas que forman parte de complejos multicatalíticos (Tsukahara *et al.*, 1988), siempre se debería referir a que un determinado enzima tiene una “actividad peptidasa” concreta, más que a que sea una peptidasa. En el presente trabajo se utilizará indistintamente una u otra terminología aun siendo conscientes de este problema de nomenclatura. Además, la nomenclatura de las peptidasas es dificultosa. La especificidad es comúnmente difícil de definir dependiendo de la naturaleza de varios residuos aminoacídicos del enlace peptídico para ser hidrolizado y también de la conformación de la cadena polipeptídica sustrato.

La IUBMB clasificó a los enzimas proteolíticos en cinco clases o familias basándose en la comparación de sus centros activos, mecanismo de acción y estructura tridimensional. Cada familia tiene un conjunto característico de residuos aminoacídicos dispuestos en una configuración peculiar para formar el sitio activo. Además, cada clase de enzimas posee inhibidores característicos, lo que permite su clasificación dentro de un determinado grupo. Se cree que los miembros de cada familia descienden de una forma común ancestral por evolución divergente. Existen otros enzimas proteolíticos, actualmente aislados e identificados, que no pueden ser incluidos en esta clasificación hasta que no sea conocida la naturaleza de su centro activo y su mecanismo de acción (Barrett *et al.*, 1998). Estas cinco clases de enzimas proteolíticos basados en la naturaleza de los grupos responsables de la catálisis son:

- * Serina-peptidasas. Contienen al menos un resto de serina en su centro activo y son inhibidas específicamente por di-isopropil-fosfluoridato. Entre ellas citar tripsina, leucil endopeptidasa o prolil aminopeptidasa.
- * Cisteína-peptidasas. Caracterizadas por poseer un grupo tiol (-SH) del aminoácido cisteína en su centro activo. Activadas por ditioneitol (DTT) e inhibidas por 4-cloromercuribenzoato. Entre ellas se encuentran piroglutamil peptidasa I y glicil endopeptidasa.
- * Aspártico-peptidasas. Poseen un grupo carboxílico (usualmente del ácido aspártico) en su centro activo y son inhibidas por pepstatina. Como ejemplos renina y pepsina.

- * Metalopeptidasas. Caracterizadas por tener uno o dos iones metálicos en su centro activo (en la mayoría de los casos Zn^{2+}). Inhibidas por ácido etilén-diamino-tetraacético (EDTA) y fosforamidón. Entre ellas se encuentran la mayoría de las aminopeptidasas, como son las alanil-, leucil- o glutamil-aminopeptidasa.
- * Peptidasas no clasificadas. Se incluyen aquí peptidasas de mecanismo catalítico desconocido tales como algunas dipeptidasas.

Como se ha dicho previamente, existe una clasificación diferente a la adoptada por la E.C., que aun teniendo en cuenta el grupo catalítico, agrupa a las peptidasas en familias y clanes de acuerdo a la secuencia y estructura tridimensional:

- * Una familia de peptidasas es un grupo en el que cada miembro muestra una relación estadísticamente significativa en la secuencia de aminoácidos al menos con un miembro de la familia, en la parte de la molécula que es responsable de la actividad peptidasa (Reeck *et al.*, 1987). Cada familia de peptidasas es nombrada con una letra que denota el tipo catalítico (S, T, C, A, M, U; para serina, treonina, cisteína, aspartico, metalo o desconocida), seguido de un número arbitrario. Cuando una familia desaparece porque se fusiona con otra el número no vuelve a ser reutilizado.
- * Clan es el término usado para describir a un grupo de familias cuyos miembros vienen de una sola proteína ancestral, que ha divergido tan rápidamente que no se ha podido probar la relación por comparación de la estructura primaria (Rawlings y Barrett, 1993; Barrett y Rawlings, 1995). La clara evidencia de la relación entre familias es la similitud entre las estructuras tridimensionales. El nombre del clan se forma con la letra del sitio catalítico (como para las familias) seguido de una segunda letra arbitraria. Si un clan desaparece el nombre no se vuelve a utilizar. No todas las familias pertenecen a un clan y cuando es necesario dar una asignación a esto se usa SX, CX...

1.2.1. Endopeptidasas

Se dividieron en base al metabolismo catalítico en cuatro tipos:

- * Serina endopeptidasas
- * Cisteína endopeptidasas
- * Aspártico endopeptidasas
- * Metalopeptidasas

También nombrar las oligopeptidasas, que actúan de forma óptima en sustratos menores que las proteínas.

1.2.2. Exopeptidasas

Las exopeptidasas son enzimas hidrolíticos cuya acción se limita a uno u otro terminal de la cadena polipeptídica. Estos enzimas se clasifican de acuerdo a la especificidad que muestran por un determinado sustrato y se les suele asignar un nombre convencional que indica el extremo del péptido (grupo α -amino o α - carboxilo) frente al cual son activos y el tamaño del fragmento liberado (aminoácido, dipéptido o tripéptido aislado).

Las exopeptidasas que requieren un grupo α -amino libre se denominan aminopeptidasas si liberan aminoácidos, dipeptidil aminopeptidasas si liberan dipéptidos, y tripeptidil aminopeptidasas si liberan tripéptidos. Las exopeptidasas que requieren un grupo carboxilo terminal no sustituido en los péptidos se denominan carboxipeptidasas si liberan aminoácidos y dipeptidil carboxipeptidasas si liberan dipéptidos.

Un tercer grupo de exopeptidasas son las denominadas dipeptidasas y tripeptidasas, cuyo principal atributo común es su especificidad por sustratos que poseen una determinada distancia (de dos o tres aminoácidos respectivamente) entre el grupo α -amino libre y el grupo α -carboxilo libre. Esto da lugar a confusiones, ya que ciertas dipeptidasas y tripeptidasas parecen afectar a cadenas polipeptídicas mayores (Coffey y De Duve, 1968) y algunas aminopeptidasas pueden utilizar como sustratos dipéptidos y tripéptidos de diversa naturaleza (Kania *et al.*, 1977; Felgenhauer y Glenner, 1966).

Las omega peptidasas agrupan a aquellas exopeptidasas capaces de separar residuos terminales cuyo grupo α -amino o α -carboxilo no se encuentre libre porque esté ciclado (por ejemplo: piroglutamato aminopeptidasa), sustituido o unido a otros residuos terminales que formen enlace mediante un grupo carboxilo o amino no unido a un carbono α (por ejemplo: γ -glutamato aminopeptidasa).

Los nombres dados a la mayoría de las aminopeptidasas se basan frecuentemente en sus preferencias o requerimientos por un residuo N-terminal característico. Por ejemplo, un enzima que muestre su más alta tasa de hidrólisis sobre enlaces formados por alanina en el extremo amino-terminal se denominaría alanina aminopeptidasa.

De manera similar, los nombres aplicados a las carboxipeptidasas que liberan aminoácidos individuales sirven para identificar el residuo carboxi-terminal preferido o requerido por el enzima.

1.3. RESUMEN HISTÓRICO.

El estudio de los enzimas proteolíticos tuvo su origen a finales del siglo XIX en los laboratorios alemanes, cuando se descubrió que la composición química de los tejidos se alteraba tras su almacenamiento. Tales alteraciones se producían aun cuando se impedía la intervención bacteriana. Al describir la naturaleza de estos cambios, Jacoby (1900) introdujo el término autólisis para referirse al proceso de autodigestión de los tejidos, producido presumiblemente por efecto de distintas actividades enzimáticas. Pronto se descubrió (Hedin y Rowland, 1901) que la actividad proteolítica era mucho mayor a pH ácido en todos los tejidos excepto en el músculo esquelético, el cual manifestaba débil actividad a ambos lados de la neutralidad.

En 1929, Willstätter y Bamann propusieron el término catepsina para describir peptidasas que actuaban preferentemente en medio ácido y que serían localizadas posteriormente en todas las células y tejidos, siendo su origen lisosomal.

Un punto crucial en el estudio de estos enzimas fue la introducción de la hemoglobina como sustrato para medir la actividad proteolítica (especialmente la catepsina D) que se utiliza actualmente dada su facilidad de purificación y determinación (Anson, 1938). Además, se introdujeron sustratos sintéticos para su determinación, algunos de los utilizados fueron Z-Glu-Tyr (Z-: Benciloxycarbonil-), Bz-Arg-NH₂ (Bz-

: Benzoil-) y Leu-NH₂ como sustratos de las catepsinas I, II y III respectivamente (Fruton *et al.*, 1941a, 1941b). Esta última fue posteriormente reconocida como una aminopeptidasa y red denominada leucina aminopeptidasa. Además se descubrió la catepsina IV que describe la actividad hidrolítica sobre el sustrato Z-Gly-Phe y que finalmente ha sido identificada como una carboxipeptidasa.

En 1952, fueron clasificadas de nuevo las catepsinas por Tallan *et al.*, creando términos que aún resultan familiares: catepsina A, B y C. Posteriormente se descubrió la catepsina D y E (Press *et al.*, 1960; Lapresle y Webb, 1962).

A partir de 1970, el número de enzimas proteolíticos descritos se incrementó de forma abrumadora, siendo evidente que la nomenclatura enzimática se iba de las manos por no existir una autoridad que la guiara. En muchos casos el mismo enzima se conocía con nombres diferentes, mientras que a veces el mismo nombre era asignado a diferentes enzimas. Pero sus mecanismos catalíticos se encuadraron en uno de los previamente señalados. A continuación se hace referencia al descubrimiento de las exopeptidasas exclusivamente, agrupándolas según su localización subcelular (citosólicas, de membrana y lisosomales).

Las exopeptidasas citosólicas se encuentran entre las primeras proteasas conocidas (McDonald y Barrett, 1986). La mucosa intestinal fue la fuente original del descubrimiento de muchas exopeptidasas, ya que contiene una mezcla compleja de enzimas de diversa especificidad y naturaleza. Entre ellas se encuentran la leucina aminopeptidasa, primer ejemplo de exopeptidasa N-terminal conocido (Linderstrom-Lang, 1929), y varias dipeptidasas. Simultáneamente (Waldschmidt-Leitz y Purr, 1929) se descubrió en páncreas de buey una carboxipeptidasa. Más tarde (Folk, 1956) se describió otra carboxipeptidasa pancreática que mostraba preferencia casi absoluta por aminoácidos básicos. Esta última se denomina actualmente carboxipeptidasa B, y la primera, carboxipeptidasa A. Ambas son segregadas como zimógenos (procarboxipeptidasas) activables por tripsina.

Tras las aminopeptidasas de origen intestinal, se encontró que el riñón era una fuente aún más abundante de estas actividades enzimáticas (Spackman *et al.*, 1955) al igual que el cristalino y la pulpa dental. Hopsu *et al.* (1964) detectaron en los extractos de hígado de rata una nueva aminopeptidasa citosólica dependiente de Cl⁻ y grupos -SH,

que fue denominada aminopeptidasa B (arginina aminopeptidasa) debido a su estricta especificidad por residuos básicos; parece ser la contrapartida de la carboxipeptidasa B. La denominada alanina aminopeptidasa soluble fue descubierta en hígado (Behal *et al.*, 1966), pero su especificidad de sustrato, en contraste con la aminopeptidasa B, abarca la mayoría de residuos N-terminales de los péptidos, aunque la alanina sea el residuo preferido. Por otro lado, se identificó una nueva aminopeptidasa en riñón específica para los residuos aspártico y glutámico N-terminales (Cheung y Cushman, 1971), a la que más tarde se le dio el nombre de aspartato aminopeptidasa (Wilk *et al.*, 1998).

Por otro lado, las membranas celulares contienen exopeptidasas de todo tipo, y la mayoría de ellas fueron inicialmente descritas a partir de extractos renales. La aminopeptidasa A (glutamato aminopeptidasa) es relativamente específica para aminoácidos N-terminales acídicos con preferencia por hidrolizar enlaces peptídicos donde participa el glutámico (Glenner *et al.*, 1962), a diferencia de su contrapartida citosólica que prefiere aspartato.

La aminopeptidasa M (alanina aminopeptidasa de membrana) (Pfleiderer y Celliers, 1963) sería la contrapartida de la alanina aminopeptidasa citosólica con un amplio rango de acción sobre enlaces donde participan aminoácidos neutros y básicos N-terminales.

Desde que Fekete (1930) descubriera la capacidad del suero de mujeres embarazadas de degradar oxitocina, muchos investigadores estudiaron este enzima de membrana, que es una aminopeptidasa con especificidad por los enlaces peptídicos entre la cisteína N-terminal y la tirosina adyacente de la oxitocina o vasopresina, por lo que se le llamó oxitocinasa o vasopresinasa (Sjöholm e Yman, 1967)

A nivel lisosomal se ha podido demostrar que algunas catepsinas B, D, H son realmente exopeptidasas y no endopeptidasas. Sólo se ha purificado una aminopeptidasa a este nivel (Krischke *et al.*, 1976). Dicho enzima es una cisteína-proteinasa que, junto a su capacidad de hidrolizar proteínas, posee actividad aminopeptidásica. Por ello se le ha calificado de endoaminopeptidasa. Probablemente sea el enzima responsable de la actividad aminopeptidásica previamente insinuada por otros autores. Actualmente se le denomina catepsina H.

Por último, también se han encontrado representantes del grupo de las Ω -peptidasas en las tres localizaciones subcelulares previamente reseñadas (citosol, membrana y lisosomas). Por ejemplo, la piroglutamato peptidasa II es un enzima unido a membrana, mientras que la piroglutamato peptidasa I se encuentra en el citosol (McDonald y Barrett, 1986).

1.4. AMINOPEPTIDASAS.

En los últimos años se ha producido una importante aceleración en las investigaciones sobre enzimas proteolíticos, desarrollándose varias aplicaciones prácticas en biotecnología que sugieren que las peptidasas son potenciales dianas terapéuticas. El análisis de la secuencia completa de varios genomas ha mostrado que el 2 % de todos los productos genéticos son peptidasas, lo que indica que se trata de uno de los grupos funcionales de proteínas más importante (Barrett *et al.*, 1998).

A continuación, siguiendo a Barret *et al.* (1998) y Beynon *et al.* (2001), se expone un breve resumen de algunas de las aminopeptidasas presentes en el organismo de los mamíferos y descritas en la literatura. Junto a ellas se destacan algunas características y propiedades de estos enzimas.

1.4.1. Alanina Aminopeptidasa

Se han descrito dos actividades específicas que han sido denominadas, según su localización como, alanina aminopeptidasa soluble y alanina aminopeptidasa microsomal.

1.4.1.1. Alanina aminopeptidasa soluble.

- *Clasificación de peptidasas*: Clan MA, familia M1, MEROPS ID: M01.010

- *Clasificación enzimática del NC-UIBM*: E.C. 3.4.11.14.

Acción. Libera un aminoácido N-terminal, preferentemente Ala (en menor grado Leu, Arg, Phe, Tyr, Met), de un amplio rango de péptidos, aminoacil- β -naftilamidas y aminoacil-metilcumarinas.

Sustrato

artificial. Ala- β -naftilamida.

Propiedades

moleculares. Es una zinc-sialoglicoproteína de 100 KDa, con un ión Zn²⁺ unido a su única cadena proteica. Extremadamente sensible a la puromicina, también se inhibe por EDTA y 1,10-fenantrolina. Mientras que es activada por tioles, Ca²⁺ y Co²⁺. pH óptimo de 7.5.

Distribución. Ampliamente distribuido por diferentes especies animales, especialmente tejidos de mamíferos y fluidos corporales.

Aspectos

biológicos. La función fisiológica todavía no está bien conocida. La localización predominantemente citosólica no fundamenta el papel que también desarrolla en la degradación extracelular de péptidos bioactivos. Aunque exista en una amplia variedad de tejidos, la mayor parte del trabajo se ha realizado con enzimas cerebrales, ya que ha sido implicado en el metabolismo de las encefalinas. Pero su amplia distribución muestra que no tiene puramente un efecto regulador de los neuropéptidos, por lo que se sugiere que participa en procesos proteolíticos esenciales para el crecimiento y viabilidad celular.

1.4.1.2. Alanina aminopeptidasa microsomal

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

- *Clasificación enzimática del NC-UIBMB:* E.C. 3.4.11.2.

También llamada aminopeptidasa M, aminopeptidasa N (APN) 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-pnitroanilidas 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 (α) es susceptible de proteólisis generando dos fragmentos de 90 (β) y 45 (γ) 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).

1.4.2. Arginina Aminopeptidasa

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

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

También llamada aminopeptidasa B (APB)

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).

1.4.3. Cisteína Aminopeptidasa.

- *Clasificación de peptidasas:* Clan MA, familia M1, MEROPS ID: M01.011

- *Clasificación enzimática del NC-UIBMB:* E.C. 3.4.11.3.

También conocida como oxitocinasa.

Acción. Libera un aminoácido N-terminal, Cys de sustratos como la oxitocina y vasopresina, además de hidrolizar L-cys-di-naftilamida, aminoacil- β -naftilamidas y aminoacil-p-nitroanilidas.

Sustrato

artificial. Cys- β -naftilamida

Propiedades

moleculares. Es una glicoproteína en forma dimérica y cada subunidad contiene dos átomos de Zn²⁺. Dependiendo del método de purificación es de 14, 17 o 21 KDa. Su pH óptimo es 7.4. Se inhibe por agentes quelantes (1,10-fenantrolina), inhibidores clásicos (bestatina y amastatina) y por cationes divalentes (Cd²⁺, Cu²⁺).

Distribución. Abunda en plasma de gestantes y placenta de primates y humanos. También en el hipotálamo, existiendo trazas en suero de mujeres no embarazadas y hombres, aunque estudios inmunohistoquímicos muestran una amplia distribución de este enzima en una variedad de tejidos diferentes a la placenta, tales como el endotelio vascular, mucosa gastrointestinal, páncreas, conducto biliar, epitelio bronquial, túbulo renales, glándulas sudoríparas, adipocitos y músculo esquelético (Nagasaka *et al.*, 1997)

Aspectos

biológicos. Durante el embarazo la placenta libera esta oxitocinasa a la circulación materna (mediante un mecanismo desconocido). La actividad enzimática permanece en suero a bajas concentraciones en el primer trimestre y aumentan progresivamente durante el segundo y tercer trimestre hasta llegar al máximo en el momento del parto. Responsable de la degradación de péptidos como la oxitocina, arginina vasopresina (Mizutani *et al.*, 1995) y angiotensina III (Tsujimoto *et al.*, 1992) juega un importante papel en el desarrollo fetal y mantenimiento de la homeostasis durante la gestación (Yamahara *et al.*, 2000). Su distribución en un amplia variedad de tejidos sugiere la participación de la oxitocinasa, no solo en la gestación, sino también en otros procesos fisiológicos.

1.4.4. Aspartato Aminopeptidasa.

La descripción de este enzima corresponde a Wilk *et al.*, (1998).

- *Clasificación de peptidasas:* Clan MH, familia M18, MEROPS ID: M18.002
- *Clasificación enzimática del NC-UIBMB:* E.C. 3.4.11.21.

Acción. Libera un aminoácido N-terminal ácido de péptidos (Glu, Asp) con preferencia por el aspártico, y aminoacil- β -naftilamidas aunque con menor eficacia.

Sustrato

artificial. Asp- β -naftilamida

Propiedades

moleculares. Es una metalopeptidasa de 440 KDa sensible a agentes quelantes como el DTT e iones Zn²⁺. pH óptimo en el rango neutro (7.5).

Distribución. Es un enzima con distribución uniforme por diferentes especies y tejidos, aunque la mayor actividad se encuentra en los testículos. Es una enzima citosólica abundante en células de mamíferos.

Aspectos

biológicos. Debido a su distribución uniforme en todos los tejidos y su abundancia en el citosol, se sugiere que tenga un papel en el metabolismo general de péptidos y proteínas intracelulares. Un papel mas especializado en tejidos específicos puede ser el metabolismo de péptidos biológicamente activos como la angiotensina II.

1.4.5. Glutamato Aminopeptidasa.

- *Clasificación de peptidasas:* Clan MA, familia M1, MEROPS ID: M01.003

- *Clasificación enzimática del NC-UIBMB:* E.C. 3.4.11.7.

Acción. Libera restos glutámicos N-terminales y también, aunque en menor medida, restos aspárticos de péptidos, α -(L)-aminoacil- β -naftilamidas y α -(L)-aminoacil- ρ -nitroanilidas.

Sustrato

artificial. α -(L)-Glu- β -naftilamida

Propiedades

moleculares. Es una zinc-metalopeptidasa de 45-400 KDa, dependiendo del método de purificación y del tejido. Sensible a agentes quelantes (EDTA, EGTA, 1,10-fenantrolina), amastatina e iones de metales de transición (Zn^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+}). Se activa por Ca^{2+} . pH óptimo 7.2.

Distribución. Es un enzima con distribución uniforme en diferentes tejidos, aunque principalmente en cerebro y digestivo.

Aspectos

biológicos. Proteína integral de membrana de tipo II, de la que es bien conocido uno de sus sustratos fisiológicos, la angiotensina II (importante en la regulación de la presión sanguínea). Por esta razón se la ha llamado angiotensinasa, encargada de transformar la angiotensina II en angiotensina III, mediando así los efectos del sistema renina-angiotensina y la homeostasis de la presión sanguínea (Reaux *et al.*, 2000). Aunque este enzima se expresa en muchos tejidos, su expresión es específica de línea celular y la diferenciación es específica del estado de las células hematopoyéticas. También se sugiere que este ectoenzima puede estar implicado en la regulación de la proliferación de las células pre-B.

1.4.6. Pirrolidón Carboxipeptidasa.

Existen dos actividades específicas y diferenciadas de pirrolidón carboxipeptidasa según la localización, la actividad pirrolidón carboxipeptidasa I, localizada a nivel citosólico, y la actividad pirrolidón carboxipeptidasa II, localizada a nivel de membrana (también llamadas piroglutamato aminopeptidasas I y II, Pcp I y Pcp II, respectivamente). También se ha descrito esta actividad a nivel del suero, donde se le denomina tiroliberinasa (Cummins y O'Connor, 1998).

1.4.6.1. Pirrolidón Carboxipeptidasa I

- *Clasificación de peptidasas*: Clan CF, familia C15, MEROPS ID: C15.010

- *Clasificación enzimática del NC-UIBM*: E.C. 3.4.19.3.

Acción. Libera un grupo piroglutámico N-terminal de péptidos y proteínas, no siendo el segundo aminoácido Pro, además de aminoacil- β -naftilamidas, aminoacil-metilcumarinas y aminoacil- p -nitroanilidas.

Sustrato artificial. pGlu- β -naftilamida

Propiedades moleculares. Cistein-peptidasa monomérica de 24 KDa y pH óptimo entre 6.5-8.5. es un enzima sulfidril-dependiente, mostrando un requerimiento estricto de agentes como el DTT o 2-mercaptoetanol (2-ME). Se inhibe por iodoacetamida y otros agentes bloqueantes de grupos sulfidrilos. También es muy sensible a trazas de metales pesados. Tiene dos residuos de Cys, uno de los cuales está implicado en su actividad catalítica (*Figura I.2.*).

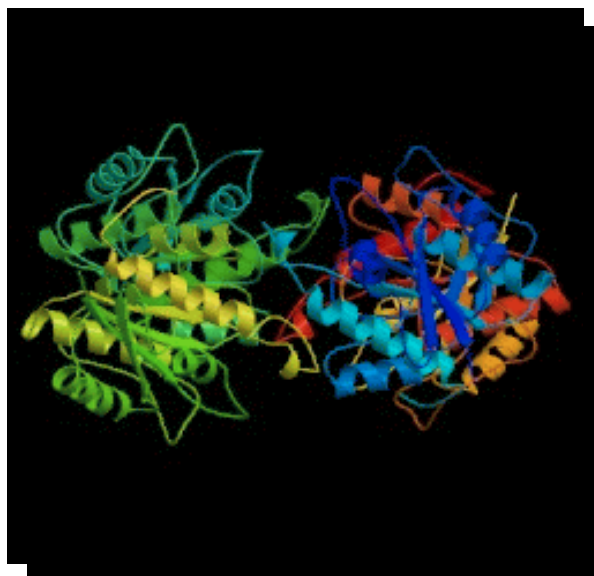


Figura I.2. Estructura tridimensional propuesta para la enzima pirrolidón carboxipeptidasa I.

Distribución. Exopeptidasa ampliamente distribuida por diferentes especies y tejidos a nivel citosólico, tales como músculo esquelético, cerebro y riñón.

Aspectos

biológicos. Capaz de liberar residuos piroglutámicos N-terminales de péptidos biológicamente activos, incluyendo TRH, GnRH, neurotensina y bombesina. Aunque su papel no está claro todavía, puede contribuir al catabolismo intracelular de péptidos hacia aminoácidos libres, los cuales pueden ser reincorporados a rutas biosintéticas (Mantle *et al.*, 1991).

1.4.6.2. Pirrolidón carboxipeptidasa II

- *Clasificación de peptidasas:* Clan MA, familia M1, MEROPS ID: M01.008

- *Clasificación enzimática del NC-UIBMB:* E.C. 3.4.19.6.

Acción. Libera el grupo piroglutámico N-terminal de tripéptidos pGlu-His-X y tetrapéptidos pGlu-His-X-Gly, con estrecha especificidad por sustratos como la TRH, además de el Glu del Glu-His-Pro- β -naftilamidas.

Sustrato

artificial. pGlu- β -naftilamida

Propiedades

moleculares. Metalopeptidasa glicosilada, zinc-dependiente de alto peso molecular, 230 KDa, formada por dos subunidades. Se inhibe por 1,10-fenantrolina y agentes quelantes como el EDTA. PH óptimo de 7.3.

Distribución. Ectoenzima localizada concretamente como proteína integral de membrana en la superficie de células neuronales (no células gliales), aunque también se encuentra en todo el SNC, retina, pulmón y otros tejidos.

Aspectos

biológicos. La alta especificidad por su sustrato TRH o análogos de TRH (Wilk, 1989). Está regulada por hormonas tiroideas (Schomburg y Bauer, 1995) y estrógenos (Cummins y O'Connor, 1998) de forma específica de tejido.

1.4.7. Leucina Aminopeptidasa.

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

- *Clasificación enzimática del NC-UIBMB:* 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- β -naftilamidas y aminoacil- ρ -nitroanilidas.

Sustrato

artificial. Leu- β -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 1.3.*)



Figura 1.3. Estructura tridimensional propuesta para la enzima leucina aminopeptidasa.

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 leucina amino peptidasa 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).

1.4.8. Tirosina Amino peptidasa.

Aunque todavía no se ha clasificado como tal, ha sido descrita una actividad tirosil amino peptidasa (Hui *et al.*, 1998).

Acción. Libera un resto Tyr N-terminal de las Met-encefalinas e hidroliza aminoacil- β -naftilamidas de aminoácidos con cadenas laterales alifáticas, polares no cargadas, cargadas positivamente o aromáticas.

Sustrato

artificial. Tyr- β -naftilamida

Propiedades

moleculares. Cistein-peptidasa dependiente de grupos tioles de una sola cadena polipeptídica de 110 KDa. Se inhibe con agentes quelantes (EDTA, 1,10-fenantrolina) y es muy sensible a la inhibición por amastatina y puromicina, también a los metales divalentes como Mn²⁺, Zn²⁺, Co²⁺, Cu²⁺, Ca²⁺. Sin embargo, Mg²⁺ lo restaura y el DTT es necesario para mantener la actividad enzimática. pH óptimo de 7.

Distribución. Distribución heterogénea, ha sido descrito exclusivamente en neuronas del SNC de cerebro de ratas (corteza e hipocampo), no en tejidos periféricos.

Aspectos

biológicos. Su enriquecimiento en sinaptosomas y terminaciones nerviosas sugiere que juega un papel importante en la neurotransmisión y diferenciación sináptica. Degrada encefalinas.

2. LA GLÁNDULA MAMARIA

2.1 INTRODUCCIÓN

La glándula mamaria, cuya función es la secreción de leche para amamantar a la prole, se adapta para esta función desarrollando un número de glándulas adecuado para mantener a un determinado número de recién nacidos, dependiendo de las especies (Zwieten, 1984). En roedores, las glándulas mamarias están alineadas ventro-lateralmente a lo largo de la línea de la leche, desde las cervicales hasta la zona inguinal. Solo existe una porción de la glándula mamaria externamente visible en las hembras, el pezón, estructura cutánea localizada ventro-lateralmente, a partir del cual se extiende el resto de la glándula dorso-lateralmente como una capa de tejido fibro-adiposo en un plano subcutáneo.

Las ratas hembras tienen seis pares de glándulas mamarias, localizándose el quinto y sexto par en la región inguinal, el primer par en la zona cervical, el segundo y tercer par en la zona torácica, y un par abdominal. En machos es un órgano atrofiado que raramente da origen a tumores espontáneos o es objeto de estudios de carcinogenicidad. El tamaño y distribución de las mamas variará en función de la edad, sexo, estimulación hormonal y condición reproductiva (Russo *et al.*, 1989b).

2.2. ESTRUCTURA DE LA GLÁNDULA MAMARIA

La clásica descripción de la distribución de la glándula mamaria se refiere a mamas de hembras paríparas que han alcanzado la madurez, en las que el primer par, o par cervical, se extiende hacia las glándulas salivares de la mandíbula y las parótidas y lateralmente a lo largo de la zona medial superior, alcanzando la almohadilla de tejido adiposo interescapular. El segundo y tercer par de la región torácica, se extienden lateral y dorsalmente desde los pezones, los cuales están localizados medialmente. El par abdominal y los dos inguinales se extienden medialmente en la región púbica, caudalmente a la región perianal y lateralmente a los miembros inferiores (Zwieten, 1984; Russo *et al.*, 1989b). La arquitectura básica de la glándula mamaria de rata es una estructura compleja compuesta de parénquima y estroma (Daniel y Silberstain, 1987; Russo *et al.*, 1989b). El parénquima consiste en uno o dos conductos galactóforos principales que crecen desde el pezón hasta los alrededores del tejido graso. El crecimiento de la glándula mamaria es el resultado de un proceso combinado de

alargamiento de los conductos principales de forma recta en las áreas cercanas al pezón, conocida en la rata como zona A (Russo, 1983; Russo y Russo, 1986; Russo *et al.*, 1989a; Russo *et al.*, 1989b) (*Figura I.4.*). Los conductos mamarios son estructuras tubulares con las paredes compuestas de dos tipos celulares principales, una capa interna de células epiteliales, bordeando el lumen y una capa externa y discontinua de células mioepiteliales que descansan en la membrana basal. En la siguiente porción, conocida como zona B, tendrá lugar la ramificación en pequeños conductos y brotes laterales.

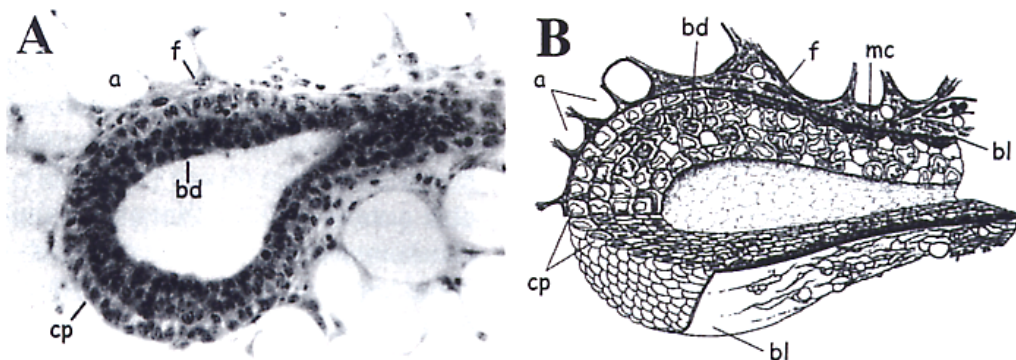


Figura I.4. Crecimiento de la glándula mamaria en ratas.

La porción de la glándula opuesta al pezón (zona C) cuenta con las estructuras ductales terminales de crecimiento más activo, los brotes terminales (del inglés Terminal End Bud, TEB) (Russo *et al.*, 1982; Russo *et al.*, 1990) (*Figura I.5.*). Estas estructuras representan el principal lugar de mitosis que facilita la elongación ductal y la ramificación en el tejido adiposo mamario. Varían en forma y tamaño, con un diámetro entre 0.1-0.5 mm, siendo de mayor tamaño en los conductos terminales periféricos (Hovey *et al.*, 2002).

Los TEB están compuestos de un epitelio de múltiples capas formado por grandes células cuboides que muestran un alto grado de proliferación. En la superficie basal de esta estructura, bajo la lamina basal se encuentran las células de recubrimiento (del inglés cap cells) (Williams y Daniel, 1983). Estas células pierden las características de células diferenciadas; pierden la polaridad citoplásmica, no forman uniones celulares y no contienen los elementos de un citoesqueleto altamente organizado, además de

considerarse como una población pluripotencial de células madre, capaces de diferenciarse hacia tipos celulares ductales o mioepiteliales mamarios (Daniel y Silberstein, 1987).

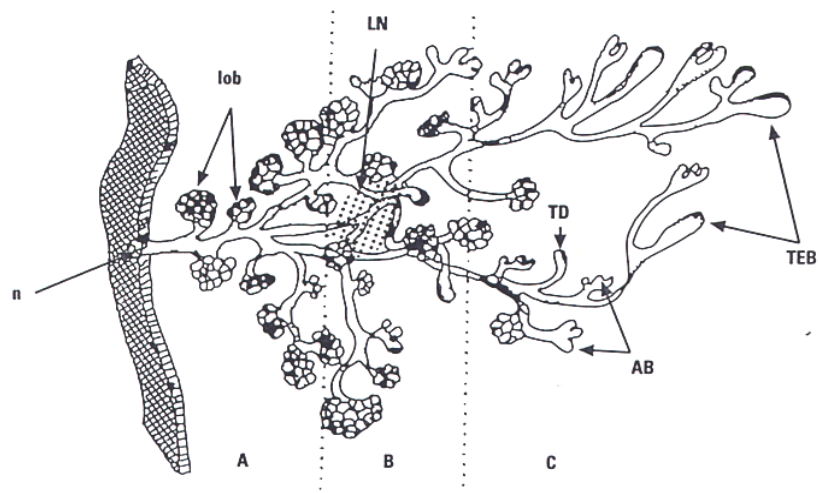


Figura I.5. Brotes terminales mamarios.

Conforme el conducto ductal se va desarrollando, las células de cubierta pueden reponerse a lo largo del perímetro de los TEB y adquirir características de células mioepiteliales. Otro grupo de estas células migrará hacia el lumen para dar lugar a las células del cuerpo (del inglés body cells), que posteriormente constituirán el epitelio ductal (Hovey *et al.*, 2002).

Los cuerpos celulares de las TEB experimentan continuas mitosis pero también, simultáneas apoptosis.

En la elongación ductal que ocurre durante la pubertad, los conductos ductales (Figura I.6.) también generan ramificaciones que rellenan los espacios del tejido graso mamario dirigidos por las TEB (Hovey *et al.*, 2002).

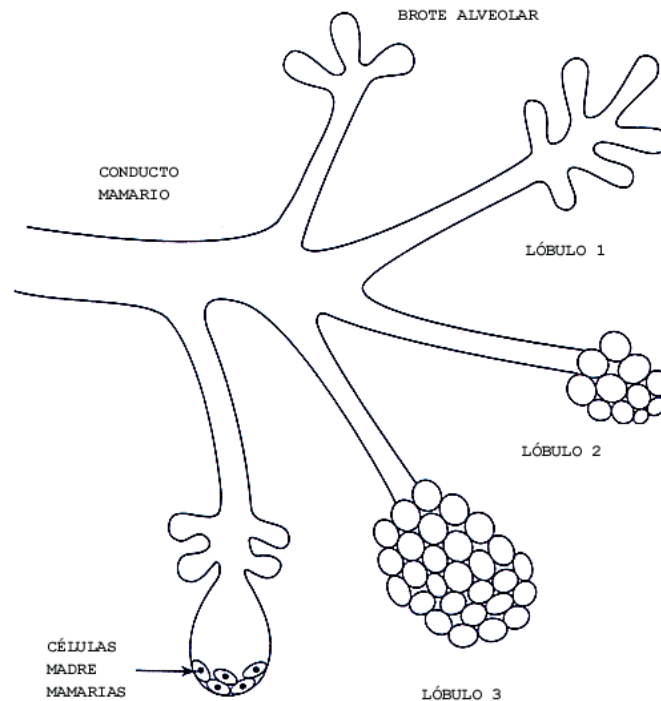


Figura I.6. Unidades ducto-lobulillares.

2.3. DESARROLLO Y MORFOGÉNESIS DE LA GLÁNDULA MAMARIA

En la mayoría de las especies, la glándula mamaria presenta un crecimiento isométrico antes de la pubertad. Estudios sobre las diferencias sexuales en la histogénesis de la glándula mamaria indican que la mama de roedores es sensible a las influencias de los esteroides gonadales durante el estado prenatal, siendo determinado el fenotipo sexual de la mama sobre el día 14 de gestación (Sakamura, 1987). Como hemos comentado, la glándula mamaria de rata se desarrolla a partir de un conducto galactóforo principal, que se ramifica en múltiples conductos secundarios, cuyo número aumentará con la edad del animal. A partir de la segunda semana de vida posnatal, los conductos se ramifican rápidamente. Estas ramificaciones terminan en TEB de apariencia abombada. El número de TEBs es máximo cuando la rata tiene 21 días de

edad, a partir de este momento los TEB empiezan a dividirse dando lugar a los brotes alveolares, AB. La progresiva diferenciación de TEBs a ABs se acentúa en cada ciclo del estro (Russo *et al.*, 1989a).

El inicio de la función ovárica y el comienzo de la pubertad aproximadamente a los 23 días de edad del animal, se manifiesta en un aumento de los niveles circulantes de gonadotropinas y estrógenos, entre los 23 y 35 días de edad (Hovey *et al.*, 2002). Seguido del inicio de la pubertad, el área de la glándula mamaria en rata (Sinha y Tucker, 1966) y ratón (Flux, 1954), incrementa entre 3.5 y 5 veces hasta los 40-50 días de edad, llegando a una meseta a los 100 y 110 días, respectivamente. Alrededor de los 26 días de edad, los conductos terminales se alargan y adquieren una forma bulbosa, formando estructuras conocidas como brotes terminales, los anteriormente citados TEB (Hovey *et al.*, 2002).

El ovario, a su vez depende de las gonadotropinas hipofisarias para su desarrollo y función. La hormona luteinizante (del inglés Luteinizing Hormone, LH) hipofisaria y la hormona estimulante del folículo (del inglés Follicle Stimulating Hormone, FSH) interaccionan con la hormona del crecimiento y la prolactina para modular la esteroidogénesis ovárica, así como la secreción de glicoproteínas no esteroideas tales como la inhibina y activina (Yung, 1988; Woodruff y Mayo, 1990; Peluso, 1992; Russo y Russo, 1994).

En general, los estrógenos son responsables del crecimiento ductal de la mama y la progesterona es necesaria para el crecimiento lóbulo-alveolar en ratón (Chatterton, 1971). Es posible que los estrógenos estimulen la secreción de factores de crecimiento tales como EGF (del inglés Epithelial Growth Factor) (Tonelli y Sorof, 1981) u otros factores de crecimiento de origen mamario o extra-mamario que pudieran sensibilizar a la glándula mamaria a la acción de factores mitogénicos (Dembinski y Shiu, 1987). Los efectos mamogénicos de los esteroides ováricos son muy dependientes de la integridad de la hipófisis, ya que los efectos de los estrógenos y la progesterona no se pueden poner de manifiesto en animales hipofisectomizados (Nandi, 1958). La elongación ductal y ramificación, que ocurre durante la pubertad, está positivamente regulada por los estrógenos ováricos y la GH hipofisaria, que a su vez podría actuar a través de su mediador local, el factor de crecimiento semejante a la insulina I (del inglés

Insulin- Like Growth Factor I, IGF-I) (Dickson *et al.*, 1994). Además, en rata, los estrógenos estimulan la secreción de PRL hipofisaria. Esta hormona, mas que la progesterona, parece regular el desarrollo lóbulo-alveolar de la glándula mamaria ejerciendo un efecto directo sobre el crecimiento del parénquima y epitelio mamario (Mizuno y Natio, 1956; Vonderhaar, 1988).

Como venimos comentando, la mama es el órgano dependiente de hormonas por excelencia. Su desarrollo esta influenciado por diferentes hormonas y factores de crecimiento, respondiendo de forma selectiva a determinados estímulos hormonales con la diferenciación o proliferación celular (Russo *et al.*, 2002). La respuesta de la glándula mamaria a este complejo hormonal e interacciones metabólicas se traduce en cambios en su desarrollo, que permanentemente modifican tanto sus características biológicas como su arquitectura (Russo y Russo, 1997b; Russo y Russo, 1998).

Diferentes hormonas poseen una influencia biológicamente significativa en el normal desarrollo de la glándula mamaria así como efectos significativos sobre su estado funcional normal. Esta múltiple influencia hormonal actúa de forma concertada para generar una respuesta integrada, estando bajo el control del eje hipotálamo-hipófisis anterior, el cual juega un papel primordial en el desarrollo y función de la glándula mamaria (Brooks y Koizumi, 1980; Baulieu y Kelly, 1990). Para evaluar el papel de las hormonas en la glándula mamaria neoplásica será de ayuda revisar la influencia hormonal necesaria para el desarrollo estructural y funcional de la glándula mamaria.

A pesar de la complejidad de los sistemas endocrinos, las hormonas pueden ser clasificadas en dos grandes categorías; aquellas que son reguladas por el sistema nervioso central, por el eje hipotalámico-hipofisario, y en aquellas cuya producción es independiente del sistema nervioso central, hormonas del sistema periférico, las cuales son reguladas por sus propios efectos (Baulieu y Kelly, 1990).

2.4. NEUROENDOCRINOLOGÍA DE LA GLÁNDULA MAMARIA

2.4.1. EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS

El desarrollo, anatomía y fisiología de la hipófisis y su relación con el hipotálamo han sido extensamente estudiadas (*Figura I.7*), especialmente en animales de experimentación, siendo la rata el animal mas frecuentemente utilizado (Baulieu y Kelly, 1990; Stefanescu *et al.*, 1994). De importancia para el desarrollo de la glándula mamaria es la pars distalis o lóbulo anterior de la hipófisis, que cuenta con cinco categorías de células secretoras de hormonas: células somatotropas, las cuales secretan la hormona del crecimiento; células lactotropas, secretoras de prolactina; células corticotropas, que secretan la hormona adrenocorticotropina (ACTH, del inglés adrenocorticotrophin) así como otros péptidos derivados del péptido precursor proopiomelanocortina (POMC), incluyendo la hormona estimulante de melanocitos α y γ (α / γ -MSH, del inglés α / γ -Melanocyte Stimulating Hormone), lipotropinas, endorfinas y encefalinas; hormonas tirotropas, productoras de la hormona estimulante del tiroides, TSH (del inglés Thyroid Stimulated Hormone); y las células gonadotropas, productoras de la hormona luteinizante, LH y la hormona estimulante del folículo, FSH (Russo y Russo, 1996a).

2.4.1.1. Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH)

Además de su expresión en el hipotálamo, la GnRH también se sintetiza en regiones extra-hipotalámicas del sistema nervioso central (Okon y Koch, 1977), así como en tejidos no neuronales como placenta humana (Seeburg y Adelman, 1984), ovario (Oikawa *et al.*, 1990), glándula mamaria (Palmon *et al.*, 1994), próstata (Qayum *et al.*, 1990); Azad *et al.*, 1993) y células linfoides (Azad *et al.*, 1991; Blalock y Costa, 1989). La función de este neuropéptido en tejido extra hipofisario está sin esclarecer, aunque recientemente se ha sugerido un papel autocrino / paracrino (Emons *et al.*, 1997; Schally, 1999), ya que una cantidad considerable de GnRH es sintetizada en la mama (Palmon *et al.*, 1994). La GnRH producida en la glándula mamaria podría actuar localmente de una forma autocrina y / o paracrina. Localmente la producción de hormonas podría alcanzar concentraciones que fueran suficientes para unirse y activar

a sus receptores. Por tanto, es posible que las adecuadas concentraciones de GnRH estén presentes en el tejido mamario para activar lugares de unión de baja afinidad (Levi *et al.*, 1996). La posibilidad de un papel autocrino / paracrino de la GnRH en la glándula mamaria es apoyada por los estudios llevados a cabo por Kottler *et al.* (1997), que han demostrado la co-expresión de ARNm tanto de esta hormona como de su receptor en glándula mamaria humana, sugiriendo un papel regulador en la mama. En este sentido, la presencia de GnRH en la leche humana, bovina y de rata en concentraciones superiores a las encontradas en muestras plasmáticas apoyan la posibilidad de una producción local de dicha hormona (Baram *et al.*, 1977).

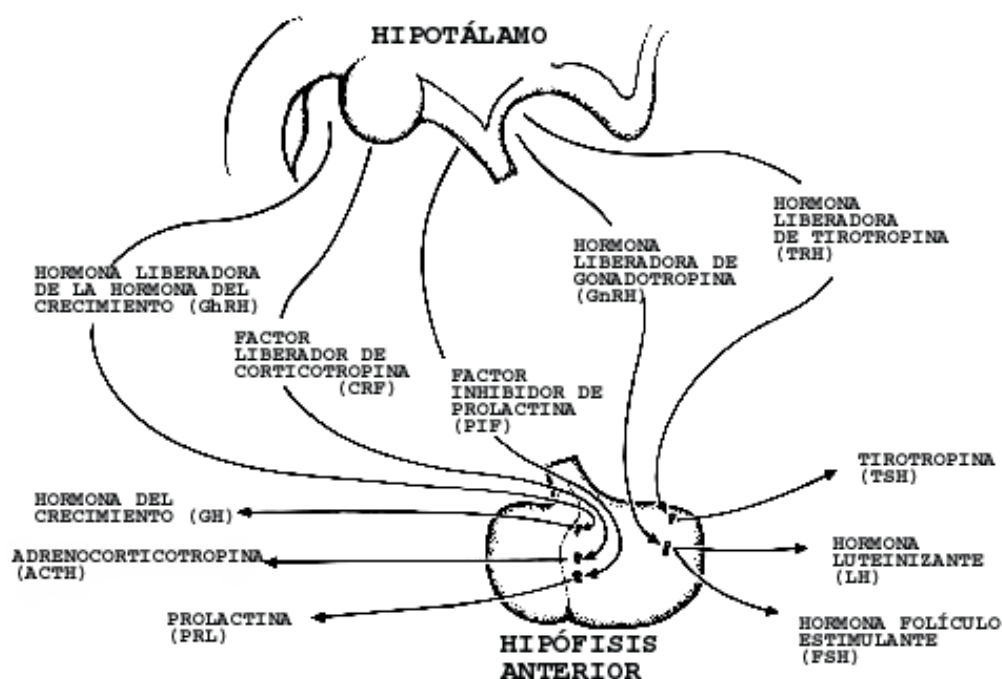


Figura 1.7. Factores de liberación hipotalámicos y adenohipofisarios.

Por otro lado, el descubrimiento de que no existen diferencias aparentes en la expresión de ARNm de los receptores de GnRH en la glándula mamaria de ratas vírgenes, preñadas y lactantes supone que la activación de los receptores mamarios está

regulada por la disponibilidad de GnRH. En este sentido, estudios llevados a cabo para determinar la posibilidad de que existieran isoformas de este receptor, pusieron de manifiesto que la secuencia de nucleótidos del GnRHR clonado a partir de la glándula mamaria de rata era idéntica a la de la hipófisis, aunque RT-PCR de ARN de tejido tumoral y normal hipofisario revela tres posibles transcritos de GnRHR, obtenidos a partir del splicing parcial o total del exon 2 (Kottler *et al.*, 1996). Esta observación apoyaría fuertemente la idea de que el splicing de GnRHR estuviera regulado de forma dependiente de tejido. Sin embargo, transcritos para receptores de GnRH también ha sido determinados en mama humana, pero no en ratón, sugiriendo una regulación génica específica de especie (Kakar *et al.*, 1994; Ikeda *et al.*, 1995).

2.4.1.1.1. *Hormonas esteroideas ováricas*

En la glándula mamaria, los estrógenos son considerados como aquellos que tienen un papel principal en promover la proliferación tanto del epitelio mamario normal como tumoral (Russo y Russo, 1997a; Russo y Russo, 1998). El estradiol actúa localmente en la glándula mamaria, estimulando la síntesis de ADN y promoviendo la formación de ramificaciones. Aunque la influencia de estrógenos en la actividad proliferativa de las células epiteliales mamarias ha sido tradicionalmente considerada por ser mediada por al menos tres mecanismos diferentes; uno mediado por receptor (Anderson, 1982; Huseby *et al.*, 1984; Dickson *et al.*, 1986; Huff *et al.*, 1988; Kumar *et al.*, 1987; King, 1992; Russo y Russo, 1996b), por un circuito autocrino / paracrino (Dickson *et al.*, 1986), o un mecanismo de retroalimentación negativo (Soto y Sonnenschein, 1987), sin embargo, es aceptado de forma general, que la actividad biológica de los estrógenos es mediada por un receptor nuclear estrogénico (ER). Este receptor, activado por su ligando, forma un homodímero con otro complejo receptor-ligando, activando la transcripción de genes específicos que contienen los elementos respuesta a estrógenos (ERE) (Tsai y O'Malley, 1994).

El hecho de que el epitelio mamario normal cuente tanto con receptores para estrógenos como para progesterona nos lleva a suponer un mecanismo mediado por receptor como el más fiable en la regulación hormonal del desarrollo de la mama (Russo *et al.*, 2000). Estudios llevados a cabo por Russo *et al.* (Russo y Russo, 1980; Russo y

Russo, 1987; Russo *et al.*, 1992; Calaf *et al.*, 1995; Russo y Russo, 1997a,b; Russo y Russo, 1998), demuestran que la actividad proliferativa del epitelio mamario, tanto en roedores como en humanos, varía con el grado de diferenciación del parénquima mamario. Es interesante el hecho de que el contenido en ER α y PgR en las estructuras lobulares de la mama es directamente proporcional al índice de proliferación celular, siendo máxima en los indiferenciados Lob 1, disminuyendo progresivamente en Lob 2, Lob 3 y Lob 4 (Russo *et al.*, 2002).

Russo *et al.* (1999) postulan que las estructuras lobulares tipo 1 contienen al menos tres tipos celulares; células ER positivas que no proliferan, células ER negativas que son capaces de proliferar y una pequeña proporción de células ER positivas que si tienen capacidad proliferativa. Por tanto, los estrógenos podrían estimular a las células ER positivas para producir factores de crecimiento que estimulan a sus células vecinas ER negativas, capaces de proliferar. En el mismo sentido, la pequeña proporción de células que son ER positivas y pueden proliferar podrían ser el inicio de tumores ER positivos. Esta posibilidad existe, así como, que las células ER negativas se conviertan en ER positivas, hecho que ha sido descrito (Kodama *et al.*, 1985; Podhacer *et al.*, 1986).

Por otro lado, la progesterona tiene un importante, pero controvertido papel en la biología de la glándula mamaria. Actúa, junto con los estrógenos, a través de su receptor específico PgR en el epitelio normal regulando el desarrollo mamario (Russo *et al.*, 2000). Debe tenerse en cuenta que, muchas acciones de la progesterona se dan frecuentemente, si no exclusivamente, sobre tejidos expuestos previamente a los estrógenos.

2.4.1.1.2. Acción conjunta de estrógenos y progesterona.

El papel de estas hormonas sobre la actividad proliferativa de la mama, indispensable para el crecimiento y desarrollo normal, ha sido durante largo tiempo, y todavía lo es, objeto de fuertes controversias. Aunque los estrógenos son conocidos por estimular la proliferación celular, el epitelio mamario de mujeres sexualmente maduras de ciclos normales no presentan una proliferación máxima durante la fase folicular del ciclo menstrual (Lippman *et al.*, 1987; Calaf *et al.*, 1995), cuando los estrógenos

alcanzan niveles de 200-300 pg / ml y la progesterona inferiores a 1ng / ml (Goodman, 1994). En cambio, el epitelio mamario presenta una actividad proliferativa máxima durante la fase luteal, cuando los niveles de progesterona alcanzan de 10 a 20 ng/ml y los niveles de estrógenos son dos o tres veces inferiores a los que se observan durante la fase folicular (Goodman, 1994). Estas observaciones son contradictorias cuando las analizamos a la luz de los datos obtenidos de un modelo experimental *in vitro*, ya que los estrógenos estimulan la proliferación de células mamarias en cultivo y tejido mamario implantado en ratones desnudos atímicos. La progesterona, sin embargo, no afecta o incluso inhibe el crecimiento celular en el mismo modelo (Huseby *et al.*, 1987; Katzenellenbogen *et al.*, 1987; Laidlaw *et al.*, 1995; Clarke *et al.*, 1997). En este sentido, estudios inmunocitoquímicos concluyen que el número de receptores ER α y PgR varía con el grado de desarrollo lobular del órgano y que el contenido en receptores esteroideos está linealmente relacionado con el índice de proliferación celular, así como que las células proliferantes son diferentes de aquellas que son ER α y PgR positivas de acuerdo con los datos que indican que los estrógenos controlan la proliferación celular por un mecanismo indirecto (Russo *et al.*, 2000). Todas estas ideas apoyan la hipótesis actual de que los estrógenos y/o progesterona controlan la actividad proliferativa de las células epiteliales luminales indirectamente mediante un mecanismo donde las células que contienen receptores actúan como sensores que secretan factores de crecimiento paracrinos positivos o negativos, de acuerdo con las concentraciones de estrógenos / progesterona predominantes para influenciar la actividad de células cercanas entradas en división (Anderson, 2002).

Ya que la actividad proliferativa del epitelio mamario tanto en roedores como en humanos, en respuesta a las hormonas circulantes, varía con el grado de diferenciación del parénquima mamario, la progresiva diferenciación de Lob 1 hacia Lob 2 y éste a Lob 3, que ocurre bajo las influencias hormonales del ciclo menstrual, y la completa diferenciación del Lob 4 como resultado del embarazo, conduce a una significativa reducción en la actividad proliferativa del epitelio mamario (Russo *et al.*, 1992; Calaf *et al.*, 1995; Russo y Russo, 1997a,b; Russo y Russo, 1998).

Por tanto, el contenido en ER α y PgR en las estructuras lobulares de la mama es directamente proporcional al grado de proliferación celular. Estos tres parámetros son

máximos en Lob 1, la estructura mas indiferenciada, disminuyendo progresivamente hasta Lob 4 (Dickson *et al.*, 1986; Soto y Sonnenschein, 1987; Huseby *et al.*, 1987; Huff *et al.*, 1988).

2.4.1.2. Hormona Liberadora de Tirotropina (TRH)

La presencia de esta hormona, junto con la GnRH, somatostatina, oxitocina, neurotensina, colecistoquinina y melatonina, en la leche de varias especies (Baram *et al.*, 1977; Leake *et al.*, 1981; Werner *et al.*, 1982; Werner *et al.*, 1985, 1986, 1988; Berseth *et al.*, 1990; Illnerova *et al.*, 1993), llevó a pensar que quizás existiera una expresión de TRH extra-hipotalámica (Chen *et al.*, 1999), pero estudios llevados a cabo por Strbak *et al.*, 1991 concluyeron que aunque dicho péptido esté presente en la leche, no existe una síntesis de TRH en glándula mamaria. Por otro lado, recientemente se han identificado receptores para TSH extra-tiroidales (Roselli-Rehfuss *et al.*, 1992; Paschke *et al.*, 1994; Davies, 1994; Endo y Onaya, 1994), concretamente en tejido graso, aunque en tejido mamario aún no han sido descritos.

2.4.1.2.1. Hormonas Tiroideas

Las hormonas tiroideas, junto con la PRL, juegan un papel importante en la regulación del desarrollo de la glándula mamaria del ratón. La disminución de los niveles séricos de hormonas tiroideas se traduce en el crecimiento retardado del sistema de conductos y en un desarrollo alveolar escaso o nulo (Hadley, 1997).

Normalmente se producen mayores cantidades de tiroxina T₄ que de triyodotironina T₃, siendo la concentración de T₄ en suero humano unas 50 veces superior a la de T₃. A pesar de esta diferencia en las concentraciones existen fuertes evidencias que apoyan que la T₃ es la principal hormona tiroidea fisiológicamente activa, que regula la actividad celular en muchas especies.

La presencia de hormonas tiroideas en la leche de mamíferos llevó a pensar, en un principio, que estas procedían de la circulación sanguínea, pero no se conocía el mecanismo por el que pasaban de la circulación sanguínea a la glándula mamaria. El contenido en hormonas tiroideas en la glándula mamaria difería mucho de T₄ a T₃, siendo superiores las concentraciones de ésta última incluso respecto a sus

concentraciones en suero. Por tanto, se asumió que existía una generación de T₃ a partir de T₄ a nivel local en glándula mamaria. A finales de los años 80, fue descrito un sistema de deiodinación de hormonas tiroideas en el tejido mamario de ratas y vacas, así como en la leche. Este descubrimiento se asoció con la producción mamaria de T₃ a partir de T₄ por la enzima tiroxin deiodinasa (5'D), aunque también exista una transferencia de T₃ desde el torrente sanguíneo a la leche (Slebozinski *et al.*, 1999).

En este sentido, el epitelio mamario normal expresa también los genes que codifican para receptores de hormonas tiroideas, por tanto es sensible a la T₃. La T₃ regula el desarrollo lóbulo-alveolar, incrementa las uniones de PRL y aumenta la producción de leche inducida por insulina, PRL e hidrocortisona (Singh y Bern, 1969; Vonderhaar y Greco, 1979; Selliti *et al.*, 1983). La hormona T₃ también modula la expresión de receptores de estrógenos (Cidlowski y Muldoon, 1975; Zhu *et al.*, 1996).

2.4.1.3. Prolactina.

La prolactina (PRL) es una hormona con un repertorio de acciones biológicas muy amplio, y dado que los variados efectos de esta hormona generalmente tienen alguna relación con las respuestas fisiológicas esenciales para el éxito reproductor, se le ha llamado “hormona de la maternidad”. Es capaz de ejercer un efecto directo sobre el crecimiento del epitelio y parénquima mamario (Mizuno y Natio, 1956). El control del desarrollo de la glándula mamaria y la estimulación de la síntesis de leche son procesos complejos que implican la participación de muchas hormonas que, en muchas especies, incluyen estrógenos, insulina, glucocorticoides, progesterona y somatotropina. Por tanto el crecimiento y desarrollo de las mamas así como la lactogénesis en la mujer está regulada, en parte por esta hormona lactotrópica de la hipófisis (Hadley, 1997).

Los estrógenos estimulan la secreción de PRL en la hipófisis anterior y estimulan la síntesis de PRL mediante un efecto directo sobre la transcripción del gen de la PRL. Estos aumentan la actividad mitótica y el número de células lactotropas en la hipófisis.

Dado que la glándula mamaria es un derivado tegumentario y se considera que está relacionado filogenéticamente con las glándulas sudoríparas, se puede concluir que la acción mamotrópica altamente especializada de la PRL en humanos y en la mayoría

de mamíferos puede haber evolucionado a partir de una acción más generalizada de la hormona sobre varias funciones tegumentarias (Hadley, 1997).

2.4.1.4. Hormona del Crecimiento (GH) ó Somatotropina (STH): Eje GH-IGF-I.

Es probable que las acciones de la STH sobre distintos tejidos estén mediadas por la producción local de IGF-I, IGF-II, o posiblemente otras somatomedinas (Hadley, 1997). Mientras que la hormona del crecimiento se considera el factor responsable de la morfogénesis mamaria ductal (Kleinberg *et al.*, 1990; Feldman *et al.*, 1993), IGF-I parece ser un factor necesario para el desarrollo normal de la glándula mamaria (Ruan y Kleinberg, 1999). El IGF-I tiene capacidad para modular la morfología de la glándula mamaria en diferentes momentos a lo largo de la vida, incluida la pubertad (Sachdev y Yee, 2001). Actualmente, se sabe que las acciones de la GH en el desarrollo del tejido mamario normal son mediadas por IGF-I, (*Figura 1.8.*) e incluso que la GH y el IGF-I median el desarrollo mamario glandular junto con los estrógenos (Kleinberg *et al.*, 2000). El estradiol incrementa la expresión, mediada por la GH, del ARNm de IGF-I en tejido mamario normal (Ruan *et al.*, 1995). El desarrollo de la glándula mamaria puede ser dividido en diferentes etapas, todas influenciadas por el eje GH-IGF-I, y aumentado su efecto por los estrógenos (Laban *et al.*, 2003). Los estrógenos aparte de ser fundamentales para el desarrollo mamario normal y de regular las rutas de señalización del IGF-I, mantienen una relación recíproca con este factor en la que IGF-I puede regular los ER y mediar la síntesis de estos de forma independiente de estrógenos (Lee *et al.*, 1997; Stoica *et al.*, 2000).

El IGF-I es necesario para el proceso de morfogénesis ductal; en ausencia de este factor el desarrollo mamario no ocurre, aun en presencia de estrógenos (Ruan y Kleinberg, 1999). El IGF-I también podría estar involucrado en el mantenimiento de la glándula mamaria adulta durante la lactancia (Laban *et al.*, 2003), es decir, en la prevención de la apoptosis durante la involución post-lactacional.

En cuanto a la GH, tanto sus transcritos como la proteína han sido localizados en células epiteliales de tejido normal. En este sentido, un aumento en los niveles del ARNm codificante para el receptor de GH (GHR) y de la propia proteína han sido

descritos tanto en los componentes estromales como epiteliales del tejido mamario Laban *et al.*, 2003).

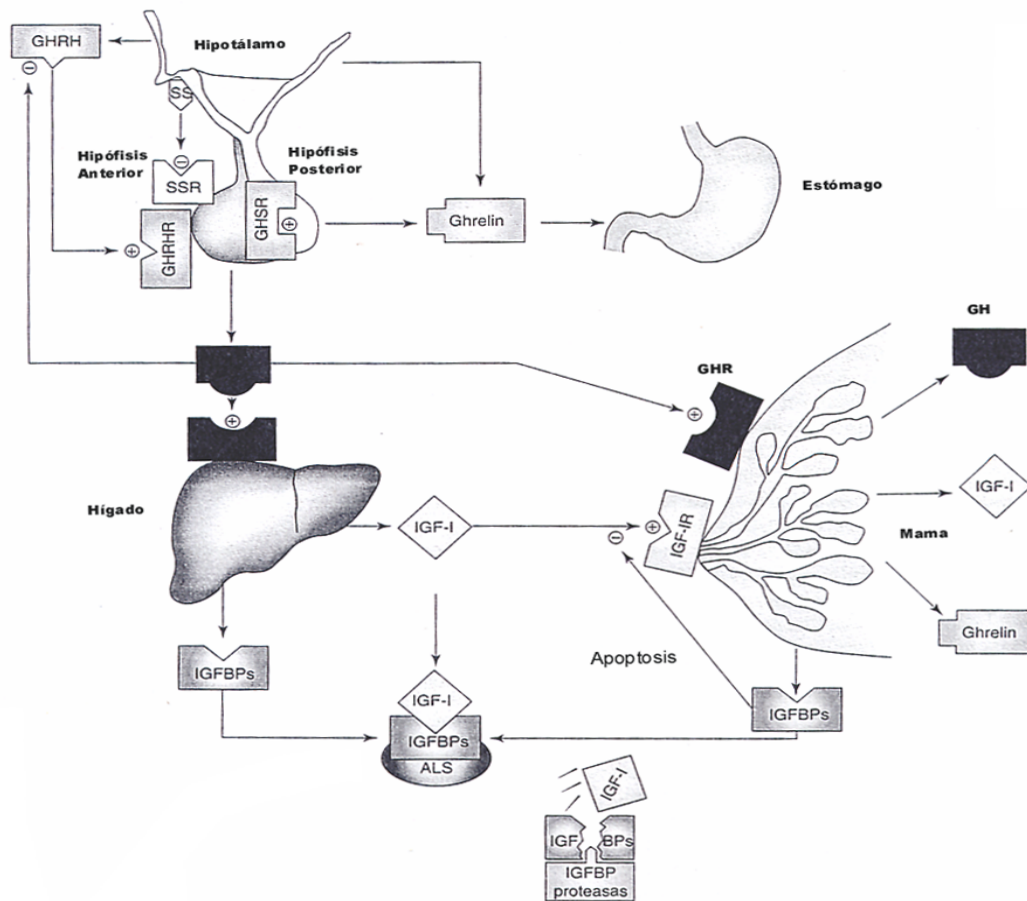


Figura 1.8. Eje Gh-IGF-I-Glándula Mamaria.

2.4.1.5. Oxitocina

La oxitocina (OT) fue la primera hormona peptídica cuya estructura primaria fue identificada (du Vigneaud *et al.*, 1953). Posteriormente el péptido fue sintetizado químicamente y aplicado en clínica para facilitar e inducir el parto. Los primeros efectos

fisiológicos reconocidos para la oxitocina fue la estimulación de las contracciones uterinas y la eyección de leche (Kimura *et al.*, 2003).

El principal órgano diana de la OT es la glándula mamaria de la hembra gestante. La OT produce la contracción de las células mioepiteliales, ocasionando un aumento de la presión intramamaria y la eyección de leche desde los alveolos y conductos hacia el exterior a través de las mamas (Hadley, 1997). En este sentido, la OT ha sido descrita por ser común en células sanas de tejido mamario (North *et al.*, 1995).

La presencia de cantidades equivalentes de oxitocina plasmática así como un número similar de neuronas oxitocinérgicas, tanto en machos como en hembras, sugiere un papel fisiológico y endocrino más general de esta hormona (Jankowski *et al.*, 2000).

La señal de la oxitocina es traducida a su efecto fisiológico a través de su receptor, OTR (del inglés Oxytocin Receptor). El OTR fue identificado en la glándula mamaria de rata por primera vez, mediante un ensayo farmacológico de unión a ligando (Soloff y Swartz, 1973).

La oxitocina actúa como un regulador del crecimiento a través de la activación de los sus receptores, distribuidos 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 está modulada por cambios en la concentración de hormonas, el sistema OT / OTR está fuertemente regulado por cambios en la expresión de los OTR, aunque hasta la fecha, los reguladores de los niveles de OTR en la glándula mamaria aún no son conocidos (Copland *et al.*, 1999).

2.4.2. OTRAS HORMONAS IMPLICADAS: OPIOIDE, SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA Y MELATONINA.

2.4.2.1. Opioides

El sistema opioide es uno de los principales sistemas inhibidores de mamíferos. Estos péptidos han sido identificados en glándula mamaria normal, así como sus receptores. En la mama han sido descritos algunos mecanismos de acción de dichos péptidos como la modulación de receptores de esteroides, secreción de proteasas e interacción con elementos del citoesqueleto (Panagiotou *et al.*, 1997, 1998, 1999).

Estudios realizados por Hatzoglov *et al.* (2000) mostraron una disminución del crecimiento celular en mama, mediante alguna ruta aún desconocida, aunque, en algunos estudios, se abre la posibilidad de que este mecanismo inhibidor de los opiáceos podría incluir a otros sistemas de receptores de membrana como la somatostatina. La modificación de la proliferación celular por opioides podría deberse a una parada específica de células en una fase determinada del ciclo celular (Panagiotou *et al.*, 1999).

2.4.2.2. Sistema Renina-Angiotensina

Varios estudios muestran que los componentes del sistema renina-angiotensina poseen múltiples, algunas veces opuestas, propiedades funcionales, aparte de sus efectos vasoconstrictores y funciones controlando el volumen sanguíneo y homeostasis. En este sentido, ha sido descrita una actividad angiogénica y proliferativa tanto en sistemas *in vivo* como *in vitro*, por la Ang II, siendo implicada en el crecimiento vascular tanto patológico como normal (Fernández *et al.*, 1985; Bell y Madri, 1990; Le Noble *et al.*, 1991; Stoll *et al.*, 1995; Hu *et al.*, 1996; Andrade *et al.*, 1996; Machado *et al.*, 2000).

2.4.2.3. Melatonina

Diferentes datos señalan un posible papel modulador de la melatonina en el crecimiento de la glándula mamaria (Mediavilla *et al.*, 1993). Coto-Montes *et al.*, (2003) afirman que dicho papel puede ser debido a dos causas diferentes; que la melatonina pudiera afectar al desarrollo mamario indirectamente, por cambios en los niveles circulantes de algunas hormonas gonadales e hipofisarias que controlan la mamogénesis, o por un mecanismo en el que la melatonina pudiera influenciar el crecimiento mamario mediante una acción directa sobre el tejido mamario, ya sea mediante un papel antioxidante o a través de receptores nucleares. En este sentido, se ha descrito la existencia de lugares de unión de melatonina en el núcleo celular de glándula mamaria de ratón, aunque los resultados obtenidos hacen suponer que la glándula mamaria hace la función de reservorio de melatonina. Esta afirmación se deriva de que valores de K_D (constante de disociación) obtenidos para la unión de melatonina al núcleo, por la noche, correlaciona con los niveles plasmáticos de esta indolamina en este periodo, mientras que valores de K_D obtenidos durante el día, nunca podrían ser

saturados por la melatonina plasmática. Sólo si es acumulada en la glándula mamaria, se alcanzarán los niveles suficientes de melatonina para unirse y activar a estos receptores nucleares. En este sentido, la melatonina almacenada en esta glándula alcanza dos puntos de magnitud superior a la plasmática durante el día (Coto-Monksa, sin publicar). Una explicación para los altos niveles de melatonina en la glándula mamaria de ratón es el alto contenido de tejido adiposo que contiene esta glándula y la alta lipofilicidad de la melatonina.

Por otro lado, la melatonina es un antioxidante involucrado en la protección celular contra el ataque de los radicales libres. Ésta reacciona tanto con oxígeno reactivo como con especies de nitrógeno (Allegra *et al.*, 2003), justificando, al menos en parte, la acción protectora de la melatonina bajo condiciones de alto estrés oxidativo. De tal forma que la presencia de altas cantidades de melatonina, junto con sus lugares de unión en la glándula mamaria, pueden contribuir a la defensa frente a radicales libres en el tejido mamario.

3. EL CÁNCER DE MAMA

3.1. GENERALIDADES

El cáncer consiste en el crecimiento descontrolado y la diseminación de células anormales en el organismo, que invaden y dañan tejidos y órganos. Es la segunda causa de muerte en los países desarrollados y concretamente es España, 82.000 personas mueren cada año como consecuencia de esta enfermedad. El cáncer no es una única enfermedad, sino un grupo de al menos 100 enfermedades distintas, aunque relacionadas a menudo con causas diferentes. Su aparición no se debe a un único factor sino a la combinación de varios factores que se engloban en dos grupos: la herencia genética y el ambiente. Por otra parte, en la aparición de la mayoría de los cánceres influye sobre todo la exposición a agentes químicos y radiaciones que afectan a las células alterándolas genéticamente, así como los hábitos de vida (tabaco, alcohol, dieta,...) y algunas infecciones (ciertos virus causantes de papilomas genitales, de la hepatitis B,...). En definitiva, el cáncer es un grupo de enfermedades de origen multigénico y multifactorial (revisado en Muñoz, 1997).

3.1.1. EL PROCESO DE CARCINOGENÉISIS

La carcinogénesis o aparición del cáncer es el resultado de dos procesos sucesivos: el aumento descontrolado de la proliferación de un grupo de células que da lugar a un tumor o neoplasia, y la posterior adquisición por estas células de capacidad invasiva, que les permite diseminarse desde su sitio natural en el organismo y colonizar y proliferar en otros tejidos u órganos (proceso conocido como metástasis) (*Figura I.9.*).

Un aumento del crecimiento de un grupo de células en el lugar donde normalmente se hallan, se conoce como tumor benigno. Los tumores benignos, se pueden eliminar completamente mediante cirugía. Por el contrario cuando las células de un tumor son capaces de invadir tejidos circundantes o distantes, tras penetrar en el torrente sanguíneo o linfático, y formar metástasis, se habla de tumor maligno.

Previa a la formación del tumor se origina una hiperplasia, es decir, un aumento controlado del número de células. Estas se pueden clasificar en hiperplasias usuales o sin atipia, donde no se observan variaciones en la citología y arquitectura del epitelio proliferado, o hiperplasias con atipia o atípica, donde se observan modificaciones citológicas o estructurales celulares semejantes a las de un carcinoma.

En cuanto a las células que forman el tumor, benigno o maligno, todas derivan de una sola célula, es decir, los tumores son monoclonales. El proceso de formación de un tumor a partir de una célula implica la acumulación sucesiva de alteraciones en las células durante un periodo de años. Hoy se piensa que desde el inicio del proceso hasta que un cáncer puede ser diagnosticado transcurren una o más décadas. Éste es el proceso de progresión tumoral, que se compone de cambios genéticos y de la selección progresiva de células cada vez más anormales en su crecimiento y comportamiento, adquiriendo la capacidad de invadir el tejido circundante y posteriormente, de originar metástasis (Muñoz, 1997).

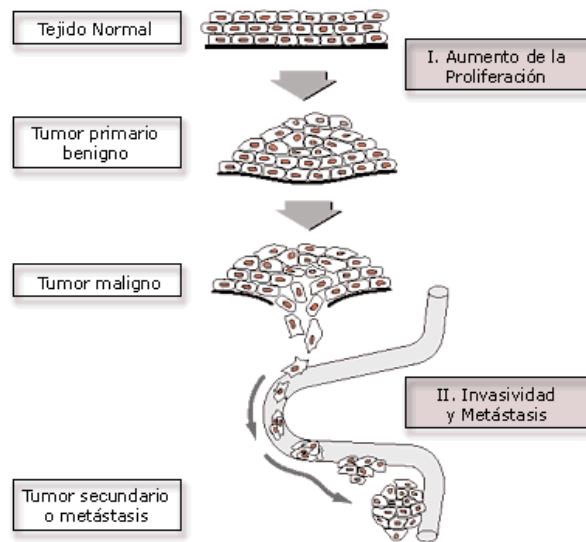


Figura I.9. Proceso de carcinogénesis.

3.1.2. TIPOS DE CÁNCER

En nuestro organismo existen unos 200 tipos celulares distintos, y si en un principio cualquiera de ellas puede potencialmente originar un tumor, en realidad el 90% de los tumores se originan a partir de células epiteliales (carcinomas). Otros tipos mayoritarios de tumores son los derivados de tejido conectivo o muscular (sarcomas), de la sangre (leucemias, linfomas, mielomas), o de células del sistema nervioso (neuroblastomas, gliomas). Se podría pensar que quizás estas células, es decir, aquellas a partir de las cuales se originan tumores más frecuentemente, fueran más susceptibles

al desarrollo de un tumor, pero parece ser que el motivo es otro. Las células epiteliales son las que mantienen durante mas tiempo en la vida del individuo la capacidad de dividirse, y por tanto, la funcionalidad de la maquinaria de proliferación. Por otro lado, debido a su localización recubriendo las superficies externas e internas del organismo, las células epiteliales están más expuestas a la acción de agentes tóxicos de todo tipo que pueden alterar su comportamiento.

Aunque muy minoritarios respecto a los cánceres esporádicos, existen casos de predisposición congénita al desarrollo de ciertos cánceres (cánceres hereditarios). Existen dos causas principales: alteraciones en los genes de reparación del ADN o mutaciones en oncogenes y/o en genes supresores que aparecen en las células germinales, espermatozoides u óvulos, y son transmitidas de una generación a otra. Es el caso del 5-10 % de los cánceres de mama, en los que se transmite una versión alterada de los genes BRCA1 y BRCA2. No se trata de que un individuo que padezca cáncer lo transmita a sus descendientes, si no de que la herencia de algunas mutaciones en ciertos genes puede predisponer a padecer tipos concretos de cánceres en individuos de una familia durante generaciones.

Los cánceres se clasifican en categorías según el órgano o tejido en el que se originan, con subdivisiones de acuerdo con el tipo específico de célula, su localización en el organismo y la estructura del tumor. De esta forma se consideran un centenar de cánceres, cuya clasificación no tendría sentido si no fuera por el hecho de que cada tipo es una entidad distinta. También existen distintos nombres para distinguir dentro de cada tipo de tumor aquellos que son benignos de los que son malignos y ocasionaran un cáncer. Un adenoma es un tumor benigno epitelial, mientras que un adenocarcinoma es su correspondiente tumor maligno. El prefijo “adeno” se refiere a un epitelio secretor, mientras que “escamoso” se reserva para los de recubrimiento (Muñoz, 1997).

3.1.3. ETAPAS DEL CÁNCER

La primera fase de un tumor es la alteración de la capacidad de proliferación de una célula como resultado de una mutación en uno de los genes que la controlan. Es la iniciación, y al agente que la causa se le llama iniciador. Esta célula iniciada crece a una velocidad ligeramente superior a las normales, y puede pasar inadvertida durante un

periodo de tiempo muy largo. El aumento de la incidencia del cáncer provocado por una repetida exposición a un carcinógeno de cualquier tipo indica la necesidad de mutaciones sucesivas. La incidencia del cáncer es posible aumentarla por el tratamiento con sustancias que no producen mutaciones: los agentes promotores tumorales. Éstos actúan modificando los productos de genes implicados en el control de la proliferación celular, de modo que su papel es colaborar con la mutación iniciadora, y solo causan cáncer cuando actúan de modo repetido tras el carcinógeno iniciador.

La siguiente fase, la promoción, es aquella en la que el agente promotor estimula el crecimiento de las escasas células iniciadas que con una sola mutación tenían ligeramente alterado el crecimiento. Este aumento de células con una mutación favorece la posibilidad de que alguna de ellas acumule una nueva mutación, que la haga proliferar de forma mas rápida, ya que la división celular aumenta el riesgo de adquirir mutaciones. La reducida posibilidad de mutaciones espontáneas hace que la duración de esta fase, en que el tumor aún no es visible, sea muy larga.

La tercera fase es la progresión tumoral o adquisición de nuevas alteraciones genéticas que provocan un aumento de la malignidad, con adquisición de capacidad invasiva y metastática (Muñoz, 1997).

3.1.4. CAPACIDAD INVASIVA Y METÁSTASIS

El fallo de los tratamientos y la muerte de los pacientes con cáncer es casi siempre debido a la metástasis. La capacidad de formar metástasis (*Figura I.10*) se basa en la adquisición de invasividad por las células del tumor primario. Por tanto, la invasividad es una característica esencial del cáncer. La invasividad incluye a su vez varios procesos: pérdida de la adhesión celular, degradación de la matriz extracelular y movilidad. Actualmente se cree que el proceso de aparición de células invasivas comienza en una fase relativamente temprana del crecimiento del tumor primario. Es decir, la metástasis requiere tumorigenicidad e invasividad, procesos que se inician en este orden pero que se solapan parcialmente, de modo que mutaciones que proporcionan a las células tumorales la capacidad de invadir y formar posteriormente metástasis se comienzan a acumular ya durante la fase de crecimiento del tumor primario. El crecimiento de un tumor, tanto primario como secundario, mayor de 5-10 mm de

diámetro requiere de vascularización. Sin la cercanía de vasos sanguíneos, las células tumorales no solo no pueden diseminarse, sino que mueren por deficiencia de nutrientes y oxígeno, y la incapacidad de eliminar el anhídrido carbónico, ácido láctico y otras sustancias de desecho debido a que los intercambios por simple difusión no alcanzan a las células internas del tumor. La angiogénesis, o formación de nuevos vasos sanguíneos es fundamental tanto al comienzo como al final del proceso de carcinogénesis. Al principio para el aumento del tamaño del tumor primario y para el acceso al torrente circulatorio de las células tumorales, lo que permitirá su diseminación. Y al final, cuando alguna célula ha sobrevivido a la extravasación y coloniza tejidos distantes, para poder reiniciar el crecimiento de nuevos tumores secundarios (Muñoz, 1997).

3.1.5. ORIGEN DEL CÁNCER

El cáncer es consecuencia de mutaciones en un número reducido de genes: los oncogenes, genes supresores de tumores y los genes de reparación del ADN.

Los oncogenes son formas mutadas de proto-oncogenes, genes normales que dan lugar a los componentes del ciclo de división que favorecen su funcionamiento. Su forma mutada estimula el crecimiento o la invasividad celular.

Un segundo grupo, los genes supresores de tumores, cuya función normal es controlar el ciclo de división celular, evitando un crecimiento excesivo, o el mantenimiento de las características que especifican la localización de las células en un lugar determinado.

Por último los genes de reparación del ADN, cuyo mal funcionamiento o mutación conduce a que las mutaciones que se producen en todos los genes, incluidos los oncogenes y genes supresores no sean adecuadamente corregidas y se acumulen rápidamente.

La existencia de genes implicados en la aparición de cáncer puede deducirse a partir de varios hechos: la existencia de virus que producen tumores, la existencia de cánceres hereditarios, la presencia de alteraciones cromosómicas en las células cancerosas y la relación entre el potencial mutagénico y carcinogenicidad de diversos agentes (Muñoz, 1997).

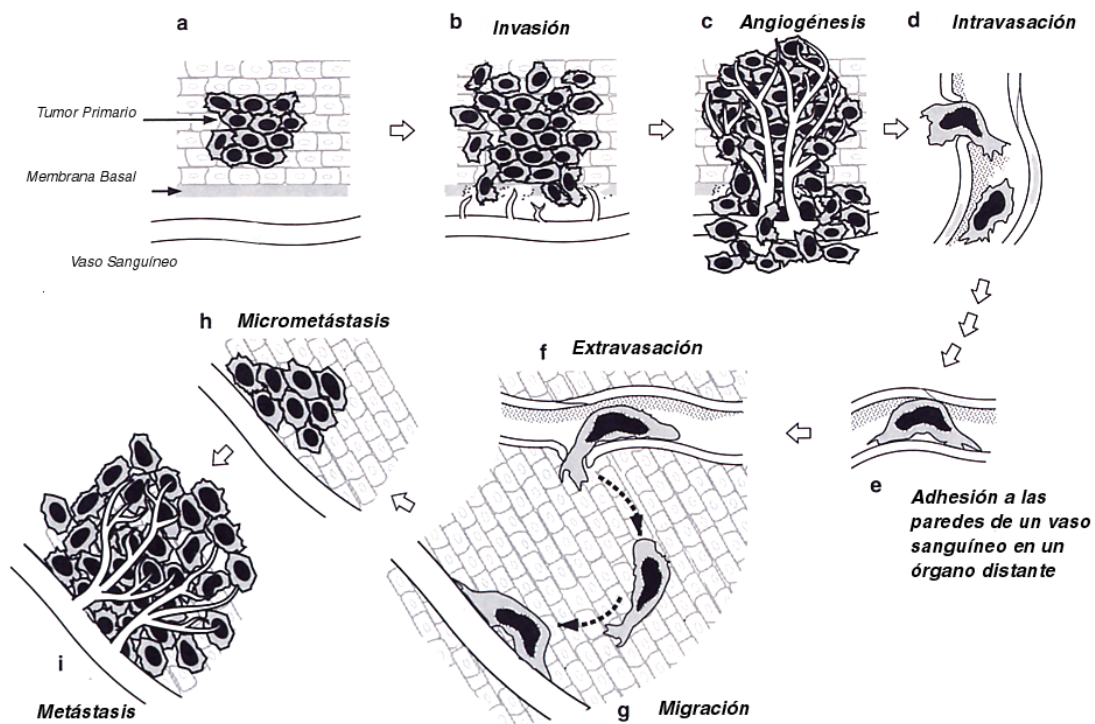


Figura I.10. Etapas del desarrollo del cáncer desde su inicio como un tumor primario hasta el momento en que genera metástasis.

3.1.6. AGENTES CAUSANTES DE MUTACIONES

Los agentes externos causantes de la aparición de cáncer son agrupables en tres categorías: compuestos químicos, agentes físicos y algunos microorganismos que causan infecciones.

La edad se considera el principal factor de riesgo para el desarrollo de esta enfermedad, salvo con alguna excepción como el cáncer de testículo o los neuroblastomas. Ésto se debe a que existe una fuente intrínseca de mutaciones en el ADN celular: los errores de las propias células, es decir, las alteraciones que la propia maquinaria química de la célula comete, especialmente durante el proceso de replicación del ADN y la división celular. Por otro lado existe una mayor probabilidad de exposición a agentes químicos, radiaciones y algunas infecciones. Junto a éstos, factores como la dieta o los hábitos de vida también contribuyen al desarrollo de ciertos tipos

de cánceres. En este sentido, la incidencia de un determinado tipo de cáncer varía según la edad, el sexo, la etnia, la geografía, o incluso en ocasiones, el estrato social.

Las causas ambientales también son responsables de notables variaciones en la incidencia de diversos tipos de cáncer. Es el caso del cáncer de mama, cuyo riesgo es veinte veces superior en Estados Unidos y Canadá que en América Central. La importancia de los factores ambientales en su sentido amplio (que incluye dieta, estilo de vida, agua, aire, geografía,..), o el nivel socioeconómico es también fácilmente deducible del estudio de las poblaciones migratorias.

El aspecto positivo de estas variaciones en la incidencia de cada tipo de cáncer es que indican que las causas externas, no genéticas, y por tanto en principio evitables, son responsables de un elevado porcentaje de cánceres.

Igualmente la dieta es otro posible factor ligado a ciertos tipos de cánceres. Algunas observaciones y estudios epidemiológicos han encontrado variaciones significativas en la incidencia de cánceres entre grupos de población de acuerdo a su consumo de carne y grasas, que serian factores de riesgo, o de frutas y verduras, que han sido propuestos como factores preventivos o protectores por su contenido en vitaminas o antioxidantes. Así se habla del efecto beneficioso de la fibra vegetal, del licopeno del tomate y otros carotenoides, vitamina C, vitamina E y análogos, calcio ó hierro. Sin embargo, los resultados obtenidos han sido globalmente inconsistentes. En el caso del cáncer de colon los antiinflamatorios no esteroideos como la aspirina están recibiendo mucha atención como posibles agentes preventivos. Igualmente el consumo elevado de alcohol parece tener una clara relación con el cáncer de boca, laringe, faringe, y esófago, quizá como causa directa, o el de hígado, probablemente por una vía mas indirecta a través de la progresiva destrucción del tejido hepático. Sin embargo, como resulta evidente en su asociación con el tabaco, el carácter negativo del alcohol se hace más claro cuando se acumula al de otros factores.

Por otro lado también ha sido aceptada la relación entre determinadas infecciones víricas y el riesgo de un determinado tipo de cáncer como es el caso de la infección por el virus de la hepatitis B y el cáncer de hígado, ciertos virus de papiloma y el carcinoma de cuello uterino así como retrovirus como el virus de la inmunodeficiencia humana

(HIV) causante del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) relacionado con aparición del sarcoma de Kaposi.

En cuanto al efecto de las radiaciones parece claro el efecto nocivo de los rayos X y gamma, así como de las radiaciones ultravioletas de la luz solar, y por tanto la conveniencia de protegerse de exposiciones innecesarias (Muñoz, 1997).

3.2. EL CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama es una enfermedad conocida desde el Antiguo Egipto. Un papiro datado entre los años 1600-1500 a.C. refleja, probablemente, la primera cita de un carcinoma mamario de la historia. Por tanto nos encontramos ante una antigua enfermedad, que ha llegado a ser la enfermedad maligna más común causante de muerte entre las mujeres de la Comunidad Europea, incrementándose en los países del Este (O'Higgins, 1992; Miller *et al.*, 1982).

En los años 80 se modificaron conceptos relacionados con el tratamiento quirúrgico y la curación del cáncer de mama, gracias al conocimiento de la biología molecular del inicio y progresión del cáncer así como de la interacción tumor-paciente: se demostraba que el perfil hormonal paracrino y autocrino de la mama en el momento de la extirpación del cáncer modulaba el curso posterior de la enfermedad. Se llegó así a la conclusión de que los mismos factores que eran responsables de la proliferación del tejido mamario normal durante la pubertad y en los cambios cíclicos del ciclo menstrual, están implicados en la promoción, progresión y aparición del cáncer de mama (Forbes, 1997).

El fracaso en la erradicación de esta enfermedad se debe, fundamentalmente, a la dificultad de identificar a un agente etiológico específico, de precisar el momento de inicio y de conocer los mecanismos moleculares responsables del inicio y progresión del cáncer. A pesar de los numerosos desaciertos en torno al origen del cáncer, existen evidencias de que el riesgo de cáncer de mama está relacionado con factores endocrinológicos y reproductivos. Por otro lado, estudios genéticos, epidemiológicos y clínicos han identificado una serie de parámetros biológicos y sociales como factores de riesgo asociados al cáncer de mama. Algunos de ellos serían la evidencia de genes susceptibles, como BRCA1 y BRCA2, la historia familiar de cáncer de mama, ovario

o endometrio, la historia individual de desórdenes mamarios, edad avanzada, estatus socioeconómico alto, exceso en la exposición a radiaciones ionizantes o consumo de alcohol (Metttlin, 1999; Pike *et al.*, 1993; Bernstein y Ross, 1993; Hu *et al.*, 2000).

3.2.1. LESIONES NEOPLÁSICAS MAMARIAS

La glándula mamaria es la localización más frecuente de tumores y/o neoplasmas. El término tumor y neoplasma son aplicados indistintamente a lesiones malignas y benignas porque el término tumor (del latín *tumere*) significa cualquier aumento patológico o nuevo crecimiento, como neoplasma (del griego *neos*, nuevo y *plasma*, formación) (Dorland, 1974).

Los tumores benignos son aquellos que no invaden tejidos adyacentes, no se metastatizan a órganos distantes y pueden ser eliminados por extirpación local. Suelen crecer de forma lenta a lo largo de los años, formando masas cohesivas que permanecen localizadas en su lugar de origen, siendo el fibroadenoma (lesión bien delimitada, de consistencia elástica, que contiene tanto elementos epiteliales como fibrosos) el más frecuente en la mama femenina. Los tumores malignos, son neoplasmas caracterizados por su habilidad para invadir, metastizarse y en último término, causar la muerte del hospedador, siendo el carcinoma ductal infiltrante el tipo histológico de cáncer de mama más frecuente (65-80 %) (Russo y Russo, 1996a).

La malignidad o benignidad tumoral, ya sean tumores inducidos mediante un carcinógeno o generados de forma espontánea se puede determinar por criterios derivados de un examen macroscópico, histopatológico y analizando el comportamiento biológico del tumor. Los principales criterios a tener en cuenta en un examen macroscópico, una vez realizado un examen general del tumor, son el índice de crecimiento y la apariencia macroscópica. Normalmente los tumores malignos tienden a tener un crecimiento muy rápido. En cuanto a la apariencia macroscópica, los carcinomas en general son suaves y carnosos, están muy bien vascularizados y tienen zonas de necrosis y hemorragias, e incluso algunos pueden contener sangre y material necrotizado, a diferencia de los fibroadenomas que son blancos, con una consistencia firme y elástica.

Entre los criterios histopatológicos de malignidad, el más importante es la pérdida del modelo tubular-alveolar de la glándula mamaria normal. Citológicamente, las células malignas son más grandes que sus homologas normales y existe un incremento en la proporción nucleocitoplasmática (Russo y Russo, 2000). La heterogeneidad epitelial presente en la glándula mamaria normal o incluso en las lesiones benignas, donde podemos encontrar células mioepiteliales, oscuras, intermedias o claras, raramente se observa en lesiones malignas (Russo *et al.*, 1983). El tipo celular predominante en lesiones malignas es de tipo intermedio, siendo difícil encontrar células oscuras. Por otro lado, el número de mitosis es generalmente mayor en lesiones malignas que en benignas (Russo y Russo, 1987).

En cuanto al criterio biológico de malignidad más fiable, sería la capacidad de un tumor de metastizarse hacia órganos distantes, aunque la habilidad de lesiones neoplásicas para generar angiogénesis ha sido también propuesta para ser un marcador biológico de malignidad, aunque todavía su uso no está muy extendido (Brem *et al.*, 1978; Maiorana y Gullino, 1978).

Se ha sugerido que el desarrollo de metástasis a distancia es una etapa tardía en la progresión de carcinoma mamario, que ocurre por adquisición de alteraciones genéticas que hacen a la célula competente para colonizar y proliferar en los distintos órganos. No obstante, algunos estudios han planteado una hipótesis alternativa, al encontrar no solo que algunas metástasis no comparten los cambios moleculares de los tumores primarios, sino que además, metástasis en órganos distintos de un mismo primario divergen también en su perfil genético (Kuukasjarvi *et al.*, 1997). Así mismo se indica el carácter específico de los genes implicados en la metástasis en distintos órganos, siendo diferentes los implicados, por ejemplo, en las metástasis óseas frente a las de glándula suprarrenal.

De hecho, el proceso de tumorigénesis mamaria resulta de la progresión de benigno a maligno, donde la acumulación de múltiples cambios genéticos desencadenan la evolución de un epitelio normal mamario a través de lesiones proliferativas benignas, a lesiones proliferativas atípicas, finalizando en carcinomas *in situ* y tumores invasivos.

Es difícil, a la vista de los conocimientos actuales, enumerar lesiones que en sentido estricto puedan considerarse iniciales del cáncer mamario. Desde principios del

siglo XIX se conoce que la enfermedad mamaria benigna pueda ser precursora del cáncer y por estudios más recientes, ya históricos, que algunas lesiones, en particular hiperplasias y carcinomas *in situ*, pueden preceder al carcinoma invasivo, existiendo un aparente continuo histológico entre ellos y también una presencia coincidente en la misma mama. Hay mujeres con procesos mamarios, como hiperplasias usuales, hiperplasias atípicas y carcinomas *in situ* que tienen un incremento en el riesgo relativo de padecer cáncer (Page *et al.*, 1985).

El dogma biológico del cáncer parece cumplirse también en la mama, considerándose que un cáncer invasivo está precedido por una serie de pasos intermedios. En un sentido general y quizás inapropiado, algunas de estas etapas, especialmente las que conllevan mayor riesgo de cáncer invasivo se consideran lesiones iniciales del carcinoma. Otras, como el carcinoma ductal *in situ*, además tienen algún rasgo fenotípico de malignidad, pero carecen de la habilidad de invadir y metastatizar, por lo que en este sentido son lesiones premalignas, preinvasivas o precursoras (González-Palacios, 2003).

Estas lesiones a las que podemos considerar como premalignas o precursoras del cáncer mamario se clasifican en:

- * **Hiperplasia Epitelial Ductal, Usual, Sin Atipia (HD):** El dato fundamental en la identificación de su carácter benigno es el polimorfismo de las células en proliferación, debido a su doble diferenciación mioepitelial y luminal, unida a la ausencia de patrones arquitecturales propios del crecimiento neoplásico intraductal.
- * **Hiperplasia Atípica Ductal y Lobulillar (HDA y HLA):** Son lesiones hiperplásicas que presentan algunos datos histológicos de carcinoma *in situ*.
 - * **Ductal:** Difiere de la HD en la presencia de características citológicas propias del carcinoma ductal *in situ* de bajo grado y que no se califica bien porque está mezclada con la HD o retiene hechos arquitecturales de ésta o bien porque aun siendo cualitativamente idéntica al CDIS (Carcinoma Ductal *In Situ*), es una lesión cuantitativamente limitada. Será la apariencia celular el dato más importante para separar la HD de la HDA. Las células proliferantes en la HDA tienen la monotonía y uniformidad citológica característica del carcinoma ductal

in situ, en tanto que la HA adopta el polimorfismo anteriormente señalado. La presencia de un alto grado de anaplasia en las células proliferantes califica la lesión como un carcinoma ductal *in situ*, independientemente de la arquitectura o grado de proliferación.

- * **Lobulillar:** Se define como una lesión lobulillar cualitativamente similar al carcinoma lobulillar *in situ*, pero con menor grado de afectación de los ductos o acinos lobulillares; sería un carcinoma lobulillar no desarrollado plenamente, aunque como él puede extenderse por el sistema ductal.
- * **Carcinoma Ductal y Lobulillar In Situ (CDIS y CLIS):** Ambos tipos de carcinoma no invasivo son enfermedades muy diferentes con distintos planteamientos terapéuticos.
- * **Carcinoma Ductal In Situ:** No es una entidad biológica homogénea. Con el mejor conocimiento de esta enfermedad se ha observado la gran heterogeneidad arquitectural existente, el alto componente subjetivo en su valoración y sobre todo el predominio de las formas mixtas, además de la escasa significación clínica de las diferentes formas, ya que cualquier subtipo arquitectural puede presentar cualquier grado nuclear, con necrosis o sin ella, y es que los rasgos citonucleares, y también la necrosis, son de considerable importancia en el CDIS. La clasificación del CDIS se hará en función a una serie de parámetros como son; a) el gradiente nuclear, b) necrosis, c) tamaño del CDIS, d) estado de los márgenes de resección y e) microinvasión.
- * **Carcinoma Lobulillar In Situ:** El CLIS tiene el mismo lugar de origen que la mayoría de los CDIS, la unidad ducto terminal ducto-lobulillar, pero la diferenciación neoplásica se produce hacia estructuras acinares más que ductales. La diferencia básica entre las dos enfermedades se refiere a su consideración biológica: el CDIS es una lesión preinvasiva, que si desarrolla un carcinoma infiltrante tiende a producirse en su vecindad. Por el contrario, el CLIS más que una lesión preinvasiva, se considera una lesión de riesgo para carcinoma infiltrante, que de producirse va a asentar en cualquier lugar tanto de la mama ipsilateral como de la contralateral. No presenta rasgos mamográficos distintivos (González-Palacios, 2003).

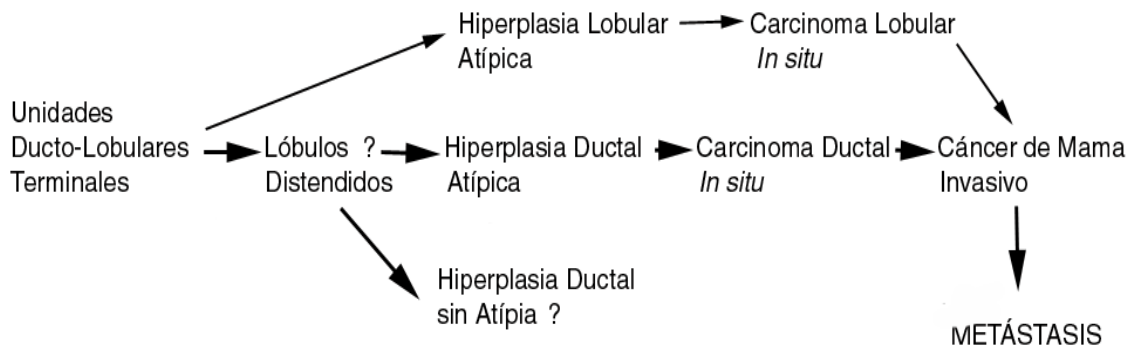


Figura I.11. Modelo de evolución de cáncer de mama propuesto por Allred et al., 2001.

Los diferentes estudios llevados a cabo en los últimos veinte años, han concluido en un modelo de evolución histológica de cáncer de mama humano, donde se propone que las células madre de las unidades ducto-lobulares terminales del epitelio normal mamario originan hiperplasias atípicas ductales y lobulares, las cuales progresan a carcinomas ductales y lobulares *in situ*, pudiendo desencadenar desórdenes invasivos y metastásicos (Figura I.11.) (Allred et al., 2001). Por tanto estas lesiones están asociadas a mayores riesgos de cáncer de mama invasivo (Anderson, 2002).

3.2.2. NEUROENDOCRINOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA

Como se ha visto en el capítulo anterior, el papel de las hormonas en el desarrollo de la glándula mamaria ha sido objeto de numerosos estudios. A pesar de la amplia información disponible, se encuentra bajo continuo examen y revisión.

Sin embargo, está bien establecido que el desarrollo de cáncer de la glándula mamaria sólo ocurre en presencia de un ovario funcional, el cual depende a su vez de las gonadotropinas hipofisarias para su desarrollo y funcionalidad. De hecho, mujeres que nunca han tenido un funcionamiento hormonalmente activo de los ovarios muestran una ausencia casi total de cáncer mamario, con una incidencia similar a la observada en varones (Spicer et al., 1994).

3.2.2.1. Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH)

Kottler *et al.*, (1997) han descrito la co-expresión de transcritos para la GnRH y su receptor en tejido neoplásico mamario, siendo la estructura primaria del GnRH-R hipofisario idéntica a la del mismo receptor localizado en mama humana. Igualmente ocurre en rata (Levi *et al.*, 1996).

Por tanto, además del establecido papel de la GnRH hipotalámica en la regulación de la síntesis y liberación de gonadotropinas hipofisarias, la GnRH sintetizada localmente en la glándula mamaria puede jugar un importante papel como regulador autocrino /paracrino de la mama (Kottler *et al.*, 1997).

3.2.2.2. Hormona Luteinizante (LH) y Hormona Folículo Estimulante (FSH)

La LH se encuentra elevada tanto en tejido mamario normal como neoplásico, siendo su concentración superior en tejido tumoral disminuyendo progresivamente en tejido normal (Robertson y Blamey, 2003).

3.2.2.2.1. Estrógenos y Progesterona

El desarrollo del cáncer de mama depende de los ovarios y de las condiciones endocrinas, moduladas por la función ovárica (Russo *et al.*, 2000). Sin embargo, la hormona específica o combinación de éstas, responsable del inicio del cáncer, aún no ha sido identificada, aunque la exposición de forma prolongada a altos niveles de estrógenos, tiene un papel fundamental en el desarrollo de esta enfermedad (Henderson *et al.*, 1988). El hecho de que la mayor actividad proliferativa y el más alto porcentaje de células positivas ER α y PgR sean características de la estructura lobular tipo 1 aporta una explicación para la alta susceptibilidad de estas estructuras a ser transformadas por carcinógenos químicos *in vitro*, apoyando la observación de que Lob 1 es el lugar de origen de los carcinomas ductales (Russo *et al.*, 1990, 1993, 1998). La relación entre la diferenciación lobular, proliferación celular y respuesta hormonal del epitelio mamario empieza a ser esclarecida.

Se han descrito tres posibles mecanismos responsables de la carcinogenicidad de los estrógenos; el más ampliamente aceptado es la actividad hormonal mediada por receptor, relacionada con la estimulación de la proliferación celular, resultando en

mayores oportunidades de acumulación de daños genéticos, que conducen a la carcinogénesis (Adlercreutz *et al.*, 1994; Nandi *et al.*, 1995). El segundo mecanismo es la activación del metabolismo mediado por el citocromo P450, lo cual supone efectos genotóxicos directos por aumento en el índice de mutaciones (Sipe *et al.*, 1994; Zhu y Liehr, 1996), y un tercer mecanismo que involucra al sistema de reparación del ADN, conduciendo a una acumulación de lesiones en el genoma, esencial para la tumorigénesis inducida por estrógenos (Yan y Roy, 1995).

El riesgo de desarrollo de cáncer mamario ha sido tradicionalmente asociado a la exposición a estrógenos, principalmente porque la mayoría de cánceres de mama contienen receptores para esta hormona. El incremento en la expresión del receptor de estrógenos α (ER α , del inglés Estrogen Receptor α) puede ser uno de los cambios más tempranos asociados al proceso tumorigénico, considerándose un parámetro de pronóstico significativo (Habel y Stanford, 1993; Molino *et al.*, 1997). La expresión del ER α aumenta en los primeros estadios de una hiperplasia ductal y aumenta aún más, con el aumento de la atipia, tal y como ocurre en la mayoría de células de hiperplasias ductales con atipia y en carcinomas ductales *in situ* (DCIS, del inglés Ductal Carcinoma *In situ*) (Shoker *et al.*, 1999a; Allred *et al.*, 2001). Como la expresión del ER α aumenta, la relación inversa entre la expresión del receptor y la proliferación se desregula (Shoker *et al.*, 1999b). Es interesante comprobar que una proporción de hiperplasias de tipo usual también contienen células ER α positivas proliferando (Clarke *et al.*, 1997).

En cuanto a los receptores ER β , existen datos que muestran una disminución en su regulación en lesiones como hiperplasias ductales con atipias y en DCIS, cuando comparamos con el epitelio normal mamario (Roger *et al.*, 2001). Estos autores también han puesto de manifiesto que dicho receptor está inversamente correlacionado con la proliferación y que la razón entre los ER α y ER β , incrementa con el aumento de la atipia. Esto se basa en el hecho de que el ER β modula negativamente el efecto de ER α (Roger *et al.*, 2001). En este sentido, se ha sugerido que los cánceres mamaros ER α negativos, se originan por la pérdida de la habilidad de las células para expresar ER α durante la evolución de los cánceres ER α positivos o que los cánceres ER α positivos y los ER α negativos son entidades diferentes (Moolgavkar *et al.*, 1980; Habel y Stanford, 1993).

Aunque es bien conocido que los estrógenos estimulan la expresión de los receptores de progesterona (PgR, del inglés Progesterone Receptor) en células tumorales mamarias, poco se sabe acerca de la modulación por estrógenos del PgRA y PgRB. En este sentido, Vienonen *et al.* (2002) concluyen que las células mamarias tumorales son heterogéneas en su respuesta a los estrógenos.

La expresión de los PgR en lesiones pre-malignas y pre-invasivas, según los pocos estudios disponibles, muestran que la expresión de los PgR también incrementa con el aumento de la atipia (Allred *et al.*, 2001). Se han desarrollado algunos trabajos que sugieren que la razón entre el PgRA y PgRB está alterada durante la tumorigénesis, predominando PgRA (Mote *et al.*, 2002). Como estos resultados pueden correlacionarse con la hipótesis de que el PgRA actúa con un represor dominante de la acción de PgRB, aún no se ha determinado, pero estos datos sugieren que la alteración de el índice entre las isoformas también tiene un papel importante en la tumorigénesis mamaria humana. Aproximadamente el 60 % de los carcinomas mamarios invasivos expresan una de las isoformas del PgR, y su expresión se considera un marcador de la funcionalidad del ER α (Allred *et al.*, 2001).

Pacientes cuyos tumores expresen tanto receptores ER α como PgR, tienen mayores probabilidades de respuesta a una terapia endocrina y tienen mejor pronóstico que aquellos que no contienen receptores esteroideos (Anderson, 2002).

El incremento en la expresión de los ER α y la pérdida de la relación inversa entre la expresión de los receptores esteroideos y la proliferación, ocurre en los primeros estadios del desarrollo de un tumor mamario, implicando que la desregulación de la expresión de ER α es un importante paso en el proceso tumorigénico. El aumento en la expresión de los ER α y PgR, podría sensibilizar al epitelio pre-maligno a los efectos proliferativos de sus ligandos, pero queda por determinar si el estradiol y la progesterona conducen la proliferación por el mecanismo indirecto ya descrito en el epitelio normal o si existe una ruta alternativa, más directa que conduce a la transformación maligna (Anderson, 2002).

3.2.2.3. Eje Hipotálamo-Hipófisis-Tiroides

Muchos años de especulación sobre un posible factor causal rodean a la asociación observada entre los desórdenes tiroideos y el carcinoma de mama, aunque todavía no hay resultados definitivos a este respecto (Goldman, 1990; Smyth, 1997).

Las hormonas tiroideas se relacionan desde antiguo con el riesgo de cáncer de mama. Existen autores que mantienen la hipótesis de que altos niveles de hormonas tiroideas restringen el desarrollo de un cáncer de mama, mientras que bajos niveles facilitan su crecimiento. En este sentido, se han desarrollado numerosos trabajos donde se considera que el hipertiroidismo protege contra el cáncer de mama, ya que la progresión de tales cánceres fué mas frecuentemente observada cuando el hipertiroidismo fue tratado (Smyth, 1997).

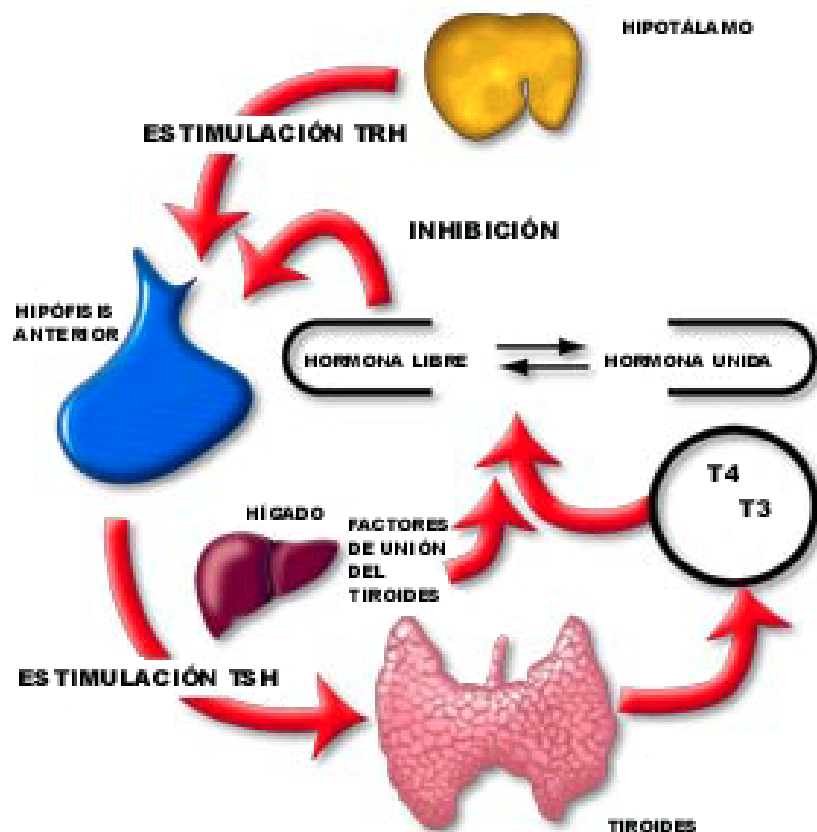


Figura I.12. Eje Hipotálamo-Hipófisis Anterior-Tiroides.

Por tanto, podemos desarrollar la hipótesis de que mayores niveles de hormonas tiroideas restringen el crecimiento del tumor mamario mientras que niveles inferiores facilitan tal crecimiento. El posible papel de las hormonas tiroideas sobre el metabolismo de estrógenos ha sido sugerido como un posible mecanismo involucrado en el cáncer de mama. Sin embargo, el incremento en estradiol libre observado en el cáncer de mama no presenta una correlación significativa con los cambios de T₄ y T₃ libres (Smyth, 1997), sugiriendo que los cambios observados en los niveles de hormonas tiroideas son independientes de alteraciones del metabolismo de estrógenos.

Una posible explicación es que los bajos niveles de hormonas tiroideas disminuyan el mecanismo de retroalimentación negativo en el eje hipotálamo-hipofisario (*Figura I.12.*), dando lugar a un incremento en la secreción de prolactina así como de TSH. Aunque muchos autores consideran que no existe un aumento en los niveles de prolactina basales entre controles y cáncer de mama, el aumento en la prolactina sérica en respuesta a la estimulación de TRH descrita por Mittra *et al.*, (1974) conduce a los autores a sugerir que niveles subóptimos de hormonas tiroideas circulantes pueden sensibilizar de forma anormal a las células epiteliales mamarias a la estimulación por prolactina, desencadenando una displasia y eventual hiperplasia del tejido mamario. La mayoría de estudios en cáncer de mama muestran unos niveles séricos de hormonas tiroideas dentro del rango normal, pero también han sido descritos incrementos y disminuciones en dichos niveles. En concreto, un aumento en los niveles de T₃ se ha descrito en fluido cístico mamario comparado con suero, sugiriendo un posible papel para esta hormona (Smyth, 1997). Estudios desarrollados por Silva *et al.* (2002) muestran alteraciones en la expresión de los receptores de hormonas tiroideas en tumores mamarios humanos, en concreto para el transcrito del receptor TRβ1, que debido a la transformación neoplásica sufre una alteración en el mecanismo normal de splicing, dando lugar a mensajeros aberrantes. Dada la complejidad del conjunto de actividades biológicas, un receptor de hormonas tiroideas (TR, del inglés Thyroid hormone Receptor) mutante puede comprometer al crecimiento celular o a un fenotipo diferenciado por múltiples rutas. Presumiblemente, los TR anormales pueden inhibir la inducción o represión de genes dianas mediante la actuación de T₃ como dominante negativo sobre los receptores celulares normales. Por otro lado, la ausencia de ARNm

para TR β 2 esta de acuerdo con la restringida expresión de esta isoforma (Forrest y Venntrom, 2000; Silva *et al.*, 2002). Sin embargo, existen estudios contradictorios sobre la posibilidad de que TR α y TR β sean genes supresores de tumores o de que, por el contrario, la expresión alterada de TR contribuya a la aparición o progresión del tumor mamario (Silva *et al.*, 2002). En recientes trabajos se han observado alteraciones en la expresión de dichos receptores en cáncer de mama humano (Silva *et al.*, 2002).

La relación entre el volumen del tiroides y el desarrollo del cáncer de mama, ha sido descrita también en trabajos cuya zona de origen son áreas endémicas de deficiencia en yodo (Spencer, 1954; Adamopoulos *et al.*, 1986), por tanto, también se sugiere un posible papel de la deficiencia de yodo en la promoción de esta enfermedad. Las funciones de la mama y el tiroides se solapan en la recaptación y utilización del yodo, aunque, aparte del requerimiento de yodo como un nutriente en la leche materna, no se conoce ningún papel para el yodo en la mama normal y neoplásica (Smyth *et al.*, 2000). De esta forma, el hecho de que el aumento del tiroides es más frecuente en pacientes mayores que tenían un cáncer mamario o desordenes mamarios benignos podría ser interpretado como un reflejo de la mejora en la ingesta de yodo en la dieta. Sin embargo, una deficiencia en yodo no puede ser la única respuesta a las diferencias entre edades en los pacientes, ya que tales diferencias no fueron observadas en los grupos control. Por tanto, la ausencia de una tendencia en las alteraciones en el volumen tiroideo sobre el periodo de tiempo investigado, sugiere que el aumento del tiroides o preceda o sea paralelo a la lesión mamaria (Smyth *et al.*, 1996).

La sorprendente asociación entre el cáncer de mama y el aumento del volumen tiroideo nos lleva a especular sobre la posibilidad de un estímulo, endocrino y de crecimiento, localizado en el tiroides, que ejerza una acción simultánea en la mama (Dumont *et al.*, 1991). El mecanismo por el cual dicho estímulo ejerce su acción en la mama, es desconocido, aunque la localización de un loci extra-tiroidal para el receptor de TSH (Roselli-Rehfuss *et al.*, 1992; Paschke *et al.*, 1994; Davies, 1994; Endo y Onaya, 1994) en concreto en tejido graso, puede tener alguna importancia en la mama.

Casi todas las formas de desórdenes tiroideos tienen algún estado que ha sido implicado con el cáncer de mama (Smyth, 2000). Así, se han descrito asociaciones entre el cáncer de mama e hipotiroidismo (Loeser, 1954; Stoll, 1965; Backwinkel y

Jackson, 1964; Takatani *et al.*, 1989), terapia de reemplazamiento T₄ (Kapdi y Wolfe, 1976), hipertiroidismo (Wanebo *et al.*, 1966; Moossa *et al.*, 1973) y tiroiditis (Ito y Maruchi, 1975). Por tanto, no sorprende que se especule sobre una posible relación entre las enfermedades tiroideas autoinmunes y el desarrollo de esta enfermedad. El uso de inmunoensayos específicos para anticuerpos de la peroxidasa del tiroides (TPO.Ab), y anticuerpos tiroglobulina (Tg.Ab) (Giani *et al.*, 1996) ha puesto de manifiesto un aumento en la prevalencia de TPO.Ab en el cáncer de mama.

Por otro lado, también ha sido propuesta la posibilidad de que el hipotiroidismo pudiera ser beneficioso para el cáncer de mama (Herbergs, 1988). Algunos trabajos muestran que la presencia de TPO.Ab está asociado con una significativa mejora en pacientes con cáncer de mama, y que la magnitud de este efecto pronóstico es similar a la de índices pronóstico bien establecidos como el tamaño tumoral o el estatus nodal axilar (Smyth *et al.*, 1998). Los anticuerpos tiroideos relacionados con el hipotiroidismo, se relacionan con una buena respuesta tumoral a la inmunoterapia con recombinantes de interleuquina 2, IL-2, e interferón alfa, IFN- α (Weijl *et al.*, 1993; Franzke *et al.*, 1999). En el caso de anticuerpos tiroideos asociados con un mejor progreso del cáncer de mama, carcinoma renal o melanoma, es posible que la respuesta inmune para el tiroides y el tejido tumoral pudiera ser regulada de forma similar y que fuera dirigida tanto contra antígenos tiroideos como tumorales. Otra posibilidad es que tanto el tumor como el tiroides compartan el mismo antígeno, como la expresión de TPO.Ab (Spitzweg *et al.*, 1998; Kilbane *et al.*, 1998).

Los trabajos realizados por Smyth *et al.* (1998) afirman que la relación entre TPO.Ab positivo y desórdenes mamarios, concretamente cáncer de mama, sugiere la presencia de una enfermedad tiroidea autoinmune en una proporción de pacientes con cáncer mamario. En este sentido, altos niveles séricos de TSH, junto con la presencia de TPO.Ab podría indicar susceptibilidad a un hipotiroidismo futuro (Vanderpump *et al.*, 1995). El mecanismo por el que TBO.Ab positivo y el aumento o disminución del volumen del tiroides podría influenciar la progresión de un carcinoma mamario, está lleno de conjeturas. La tendencia hacia una hipofunción tiroidea, concuerda con trabajos anteriores que muestran una asociación entre estas dos enfermedades, siendo el hipotiroidismo la más frecuentemente diagnosticada (Stoll, 1965; Takatani *et al.*, 1989).

Un factor que podría tener como consecuencia una aumento o disminución de la glándula tiroidea es la presencia de anticuerpos para receptores de tirotropina (TRAb), los cuales han sido descritos por estimular o impedir el crecimiento tiroidal (Rieu *et al.*, 1996; Drexhage, 1996; Miyamoto *et al.*, 1997). Pero, aunque la expresión de dichos receptores ha sido descrita en tejidos extratiroidales, aún no han sido localizados en glándula mamaria.

Por tanto, manifestaciones de autoinmunidad tiroidal están relacionadas con efectos beneficiosos sobre el carcinoma mamario y proporciona una fuerte evidencia, a la fecha, de una conexión biológica entre el carcinoma y la enfermedad tiroidea (Smyth *et al.*, 1998).

3.2.2.4. Eje Hipotálamo-Hipófisis- Glándula Adrenal

La hormona liberadora de corticotropina, CRH es sintetizada en el núcleo paraventricular del hipotálamo y transportada hacia la eminencia media y liberada a la circulación hipofisaria portal para estimular la liberación de ACTH de las células corticotropas de la hipófisis anterior, actuando sobre la glándula adrenal. Ray *et al.* (2000) analizaron inmunohistoquímicamente, en 100 casos de cáncer mamario, la presencia de ACTH, péptidos como ACTH, y la expresión de la oncoproteína c-erbB-2, y el receptor para el factor de crecimiento epitelial (del inglés Epithelial Growth Factor, EGF), así como los receptores de estrógenos. Un 15 % de los casos de carcinoma ductal infiltrante mamario fueron inmunopositivos para ACTH, mientras que un 38 % y 36 % de los tumores de mama fueron positivos para c-erbB-2 y EGF-R (del inglés Epithelial Growth Factor Receptor, EGF-R) respectivamente. Mientras que un 27% de los casos fueron positivos para los ER. La inmunoexpresión de todos los parámetros fue superior en los casos de cáncer de mama en mujeres de edades superiores a los 45 años, que en pacientes de edades inferiores. En este estudio, se observó una significativa relación estadística entre la inmunopositividad de ACTH y los ER, reflejando una probable relación entre ACTH y péptidos como ACTH y el proceso patológico del cáncer de mama.

Por otro lado, estudios llevados a cabo por van der Pompe *et al.* (1996) sobre el eje hipotálamo-hipófisis anterior-glándula adrenal, pusieron de manifiesto una

significativa elevación de los niveles basales de cortisol en pacientes con cáncer de mama en un estado temprano, siendo superiores estos niveles en pacientes con cáncer de mama metastático. Aunque, por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en los niveles plasmáticos basales de ACTH y prolactina. Estos datos apoyarían el hecho de que el cáncer de mama está asociado con una hiperactividad de la glándula adrenal, que puede ser debido al estrés fisiológico relacionado con la presencia de metástasis o de células tumorales en la circulación.

Desde el punto de vista de la implicación de la ACTH en el estrés, recientes trabajos apoyan la idea de que el estrés pudiera facilitar el proceso metastático vía supresión del sistema inmune (Taylor *et al.*, 1991).

3.2.2.5. Eje Hipotálamo-Hipófisis- Glándula Mamaria

3.2.2.5.1. Prolactina

Recientemente, se ha sugerido que la PRL podría jugar un importante papel en diferentes tipos de cáncer, tanto de tejidos reproductivos como no reproductivos, vía producción local y acumulación de la misma. La expresión, tanto de PRL como de su receptor en diferentes líneas celulares tumorales humanas, hace suponer que actúa como un factor de crecimiento autocrino / paracrino, pudiendo actuar también como un factor anti-apoptótico o como mitógeno. Por otro lado, la PRL aumenta la vida media de los alveolos lobulares en la glándula mamaria lactante, la cual sufre apoptosis desde el cese del amamantamiento y se retira la PRL (Flint y Knight, 1997).

La PRL incrementa la expresión de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 en células Nb2 (Leff *et al.*, 1996) que actúan como mitógenos en glía y en células de cáncer de mama. También existe una interacción entre la PRL y factores oncogénicos como Her-2 y BRCA1 (Yamauchi *et al.*, 2000; Favy *et al.*, 1999) .

Un hecho bien establecido, es que la PRL afecta al crecimiento celular y diferenciación en la mama, siendo necesaria para la producción de leche. Si la mama es la principal diana de la PRL, es de suponer que también esté involucrada en su crecimiento aberrante. En roedores, la hiperprolactinemia correlaciona con un incremento en la tumorigénesis mamaria. La administración de PRL incrementa la incidencia, tamaño y número de tumores espontáneos y tumores mamarios inducidos por

virus, así como el crecimiento de tumores inducidos por carcinógenos (Nandi *et al.*, 1995). Aún se encuentra sin esclarecer la asociación entre la PRL circulante y el cáncer de mama en humanos, aunque si existe una correlación entre el riesgo de cáncer de mama en mujeres postmenopáusicas y el incremento en los niveles séricos de PRL (Hankinson *et al.*, 1999).

Existe un reciente interés sobre la PRL, desde que se ha observado que el 80-90% de los carcinomas mamarios expresan receptores para la PRL, siendo esta expresión mayor en tejido neoplásico que en tejido adyacente (Llovera *et al.*, 2000), lo cual aumenta la evidencia de que la PRL actúa como un factor local de crecimiento. La expresión de PRL y su receptor ha sido localizada tanto en tejido normal como neoplásico mamario y en diferentes líneas celulares derivadas de mama.

En este sentido, los carcinomas mamarios que sobreexpresan el oncogen HER2 (símbolo oficial ERBB2) con un alto índice proliferativo y metastático, producen PRL de forma autocrina (Yamauchi *et al.*, 2000). La actividad mitogénica de la PRL producida localmente, ha sido descrita por la supresión de la proliferación de células cancerosas mamarias T47D por oligonucleótidos antisentido de PRL (Vonderhaar, 1998), anticuerpos anti-PRL (Ginsburg y Vonderhaar, 1995) o antagonistas de PRL (Chen *et al.*, 1999). Otros estudios han sugerido que la PRL podría estimular la expresión de ER en algunos cánceres de mama e hígado (Leung y Sasaki, 1973). En algunas líneas celulares de cáncer de mama, la PRL puede estimular la proliferación celular bajo determinadas condiciones, pero esto parece ser independiente de la expresión de los ER, sugiriendo que la acción de la PRL probablemente no sea mediada por un incremento en la expresión de los ER (Vonderhaar, 1998). Sin embargo, el hecho de que el tamoxifeno, un modulador y antagonista de ER concretamente en cáncer de mama, pueda prevenir la acción de la PRL sobre las células tumorales mamarias, nos hace pensar en otra forma de conexión entre ambas rutas (Frasor y Gibori, 2003).

La complejidad de la acción de la PRL ha quedado de manifiesto en un reciente trabajo sobre el incremento de la susceptibilidad del gen BRCA1 en las células de cáncer de mama por PRL (Favy *et al.*, 1999). Ya que BRCA1 es un supresor de tumores, su inducción por PRL podría antagonizar el efecto mitogénico de la PRL. Por otro lado,

la inducción de la motilidad de células de cáncer de mama por PRL, proporciona fuertes evidencias sobre su posible papel en la metástasis (Maus *et al.*, 1999).

3.2.2.5.2. *Oxitocina*

La OT ha sido descrita por ser común en células mamarias sanas, pero raramente o nunca ha sido detectada en células tumorales mamarias (North *et al.*, 1995). Además, la OT inhibe la proliferación de líneas celulares de cáncer de mama humano (Cassoni *et al.*, 1994) y por tanto juega un papel protector en la prevención de esta enfermedad (Murrel, 1995). *In vivo*, la OT significativamente reduce el crecimiento de TS/A de carcinoma mamario de ratón (Sapino *et al.*, 1998).

Este nonapéptido actúa como un regulador del crecimiento a través de la activación de su receptor transmembrana, OT-R, acoplado a proteínas G específicas, distribuido por la superficie celular (Sapino *et al.*, 1998; Cassoni *et al.*, 2001). Utilizando técnicas inmunohistoquímicas y RT-PCR, el receptor de OT y su ARNm, han sido detectados en tejido mamario normal y patológico (Sapino *et al.*, 1998). En la mama humana, el OTR ha sido localizado en células mioepiteliales a lo largo de lóbulos normales y en células intraductales de lesiones hiperplásicas benignas.

El receptor de oxitocina también ha sido localizado en casos de carcinoma mamario primario y metastático (Bussolati *et al.*, 1996), pero está sin esclarecer si estos receptores son funcionales. Copland *et al.* (1999) han demostrado que los receptores de OT son funcionales en células Hs578T de mama humana.

Sin embargo, Sapino *et al.* (1998) han descrito la pérdida de la correlación entre la presencia en carcinomas mamarios humanos de OTR y el estatus de los receptores de estrógenos. Aunque, por otro lado, si ha sido descrita una correlación entre la expresión de OTR y la progesterona. En este sentido, es posible que los estrógenos y la progesterona puedan modificar la respuesta secretora de la OT, actuando sobre la sensibilidad de la mama o sobre el mecanismo adrenérgico central de secreción de OT (Dreifuss *et al.*, 1992; Key y Pike, 1988).

Los péptidos opioides inhiben, en situaciones de estrés, la liberación de OT. En este sentido, existe una relación entre la función ovárica y estos péptidos en el hipotálamo, es decir, aumentan durante la pubertad y caen después de la menopausia.

Además, los estrógenos y la progesterona incrementan los niveles circulantes de β -endorfina durante la fase luteal del ciclo menstrual (Laatikainen, 1991).

Recientes estudios han puesto de manifiesto que, tanto en rata como en humanos, el receptor de OT interacciona con la progesterona. La interacción esteroide / receptor está modulada por GTP γ S, indicando una interacción directa entre OTR y esteroides (Grazzini *et al.*, 1998).

Por otro lado, Murrell propone que los carcinógenos en la mama son generados por la acción de radicales superóxido liberados cuando la distensión de los acinos glandulares, bajo la influencia de la PRL, genera una isquemia en los microvasos. Durante una isquemia localizada, el ATP es degradado a hipoxantina y ésta a xantina por la xantina deshidrogenasa. Más tarde, se dará la conversión de la xantina en ácido úrico (Jarasch *et al.*, 1981). Ambas reacciones generan radicales libres de oxígeno, los cuales pueden modificar químicamente o dañar, proteínas, lípidos, carbohidratos y nucleótidos (Slater, 1984). En este sentido, la peroxidación lipídica es un importante proceso mediador de radicales libres. Los daños generados por los radicales libres pueden dar lugar a una mutación, alterando la actividad biológica, desencadenando el proceso de carcinogénesis (Slater *et al.*, 1989). Éste es un modelo de hipoxia responsable de la fibrosis de la contractura de Dupuytren's (Murrell *et al.*, 1987, 1990).

Una obstrucción ductal impide la eliminación de carcinógenos por la mama. De esta forma, la estimulación de la mama podría causar la contracción de las células mioepiteliales, mitigando la distensión acinal y ayudando a la activa eliminación del fluido carcinogénico de la mama. La estimulación mamaria genera un incremento en los niveles de OT en la fase luteal pero no en la fase folicular del ciclo menstrual. Estudios epidemiológicos sobre el cáncer de mama sugieren, que periodos de lactancia prolongada, la actividad sexual en mujeres nulíparas así como los niveles de OT alcanzados por hombres y mujeres en el orgasmo, son factores que protegen del desarrollo de cáncer de mama (Murrell *et al.*, 1995). La hipótesis de dicho autor podría resumirse en que la producción regular de OT por estimulación mamaria es un factor clave en este punto de la prevención del cáncer mamario.

Aunque la OT siempre se ha considerado un estimulador de la secreción de PRL a nivel de la hipófisis, también ha sido descrita por inhibir dicha secreción en el hipotálamo (Mogg y Samson, 1990)

3.2.2.5.3. Vasopresina

Algunas células neoplásicas expresan genes para factores de crecimiento neuropeptídicos y sus receptores, generando ciclos autocrinos que promueven la proliferación de estas células (Sporn y Robert, 1985). En las células del cáncer de mama, han sido descritos mecanismos autocrinos para el caso de la oxitocina y vasopresina (Bussolati *et al.*, 1995; North *et al.*, 1995; North *et al.*, 1999; Taylor *et al.*, 1990). Recientes estudios han puesto de manifiesto que algunos neuropéptidos, tales como la vasopresina, no solo se expresan, sino que también son procesados hacia formas biológicamente activas en el tejido tumoral mamario y en líneas celulares.

Estudios realizados por Du *et al.* (2001) indican que no toda la vasopresina sufre este procesamiento por las células tumorales mamarias, aunque éstas expresan todos los receptores conocidos de la vasopresina (North *et al.*, 1995, 1999), y al menos uno de ellos, ha sido involucrado en un mecanismo autocrino de crecimiento (Taylor *et al.*, 1990). De hecho, estos autores muestran que cambios en la concentración de vasopresina puede significativamente influenciar el crecimiento celular de células MCF-7 (Taylor *et al.*, 1990). Por supuesto es posible que esta modulación del crecimiento por la vasopresina sea de influencia paracrina, más que autocrina, y que una población de células procesen vasopresina hacia su forma activa mientras que una población celular diferente exprese receptores para el péptido (Du *et al.*, 2001).

En este sentido estudios llevados cabo por el mismo autor, mostraron tras un análisis inmunohistoquímico, que la proteína relacionada con el gen de la vasopresina no era detectada en tejido mamario normal, a diferencia de todas las muestra examinadas de tejido neoplásico mamario que revelaban la presencia de vasopresina y otros productos de la expresión del gen de la vasopresina como la provasopresina. Estos estudios indicaron que la expresión del gen de la vasopresina es una característica selectiva de todos los tumores mamarios, y que además los productos de su expresión

podrían ser útiles marcadores para una detección temprana de esta enfermedad y posible diana para inmunoterapia (North *et al.*, 1995).

3.2.3. Otras Hormonas Implicadas

3.2.3.1. Opioides

Los opioides endógenos se han relacionado con la estimulación del crecimiento de tumores mamarios inducidos mediante carcinógenos químicos. Un bloqueo de sus receptores se traduce en una reducción del crecimiento de dichos carcinomas. Diferentes estudios han demostrado que la liberación de péptidos opiáceos inducida por el estrés, disminuye el tiempo de supervivencia de ratas con cáncer de mama. Además, los péptidos opiáceos pueden jugar un papel en cáncer mamario humano. Péptidos opioides y sus receptores han sido localizados tanto en tumores mamarios primarios como en diferentes líneas celulares de cáncer de mama (Hatzoglov *et al.*, 2000). Zagon *et al.* (2000) han demostrado la existencia de met-enkefalina y β -endorfina en adenocarcinoma mamario. Un estudio realizado por Scopsi *et al.* (1989) ha demostrado la presencia de péptidos opiáceos en carcinomas ductales infiltrantes, aunque no se ha establecido ninguna correlación entre los tumores positivos para los péptidos opiáceos y los ER. Hatzoglov *et al.* (2000) han descrito una acción conjunta de los péptidos opiáceos y la somatostatina en la glándula mamaria normal y neoplásica. La expresión de estas dos sustancias y de sus receptores en tumores mamarios y líneas celulares mamarias, y el papel inhibitor de ambos sistemas en la proliferación celular, vía inhibición de la adenilato ciclasa, ha hecho que se les implique en la inhibición del crecimiento celular de células tumorales y líneas celulares de forma dosis-dependiente y de manera reversible.

El sistema factor de crecimiento opioide- receptor del factor de crecimiento opioide (OGF-OGFR, del inglés Opioid Growth Factor-Opioid Growth Factor Receptor) ha sido implicado en el cáncer y en el proceso angiogénico. Asumiendo que ambos péptidos se encuentran en un delicado equilibrio, como muestran experimentos de exposición excesiva a OGF o de neutralización de la acción de OGF por anticuerpos contra este péptido, podríamos predecir que la alteración en uno o en ambos péptidos a nivel de la transcripción, podría tener importantes efectos sobre el crecimiento celular.

Zagon *et al.* (2000) han descrito que la disminución de los receptores OGF podría llevar a un crecimiento acelerado, debido a la incapacidad de OGF para traducir su señal por el bajo número de receptores, facilitando el proceso de carcinogénesis (Zagon *et al.*, 2002). Trabajos desarrollados por Blebea *et al.* (2000) han demostrado, por primera vez, que OGF es una sustancia inhibitoria de angiogénesis *in vivo*. Este péptido y su receptor están presentes en las células endoteliales angiogénicas, interaccionando OGF directamente con su receptor a nivel celular. Sus efectos no parecen ser citotóxicos, sino citostáticos, lo que estaría de acuerdo con los resultados expuestos por Zagon *et al.* (2002) que demuestran que el efecto inhibitor de OGF sobre la replicación celular está relacionado de forma directa con la fase del ciclo celular G₀ / G₁ en células tumorales, incrementando el número de células en esta fase y disminuyendo el número de células en fase S y G₂ / M. Dicho factor reduce significativamente la síntesis de ADN, y suprime la mitosis. No obstante, aún está sin esclarecer si OGF minimiza el crecimiento del cáncer por revocar un problema existente en el control del ciclo celular responsable, al menos en parte, del cáncer, o si OGF compensa una irregularidad mas allá de su participación en la etiología y patogénesis de la neoplásia (Zagon *et al.*, 2000). En el caso de un excesivo crecimiento de vasos sanguíneos, como en el caso de la angiogénesis tumoral, el sistema OGF-OGFR podría encontrarse a bajos niveles, debido a irregularidades a nivel de la transcripción o translación (Blebea *et al.*, 2000).

3.2.3.2. Melatonina.

Ya que una de las mas importantes funciones estudiadas de la glándula pineal ha sido su actividad moduladora sobre el eje neuroendocrino reproductor, ésta ha sido particularmente estudiada en tumores hormono dependientes, como los tumores mamarios hormono dependientes (Cos y Sánchez-Barceló, 2000a).

La hipótesis de un posible papel de la melatonina, hormona indólica producida fundamentalmente en la glándula pineal, en el desarrollo del cáncer mamario está basada en el hecho de que, dicha hormona, inhibe algunas de las hormonas gonadales e hipofisarias que controlan el desarrollo normal de la glándula mamaria, y las cuales son también responsables del crecimiento de tumores hormono dependientes de mama. Fue Cohen *et al.*, en 1978, quienes introdujeron por primera vez, la teoría del posible papel

de la glándula pineal en la etiología del cáncer de mama. Estos autores sugerían que una disminución en la función pineal, por cualquier causa, y la consecuente reducción de la secreción de melatonina, podría inducir un estado de relativo hiperestrogismo, y una temprana y prolongada exposición del tejido mamario normal a los estrógenos podría involucrarse en el desarrollo del proceso de carcinogénesis. Unos años más tarde, Tamarkin *et al.* (1982) describieron la relación existente entre la concentración plasmática de melatonina y el cáncer de mama. Mujeres con adenocarcinomas mamarios positivos para receptores de estrógenos tenían concentraciones plasmáticas de melatonina significativamente inferiores a las de mujeres sanas o mujeres con tumores mamarios negativos para receptores de estrógenos. Estudios posteriores, sobre todo epidemiológicos, describieron un baja incidencia de tumores mamarios en mujeres ciegas (Coleman y Reiter 1992, Feychting *et al.*, 1998, Kliukiene *et al.*, 2001) así como una relación inversa entre la incidencia de cáncer de mama y el grado de daño visual (Verkasalo *et al.*, 1999). Ya que la luz inhibe la secreción de melatonina, el relativo incremento de los niveles circulantes de melatonina en mujeres con una exposición a la luz disminuida, podría ser interpretado como una prueba del papel protector de la melatonina en la carcinogénesis mamaria.

Las diferentes acciones propuestas de la melatonina (Reiter, 1980; Brzezinski, 1997) que apoyan la hipótesis del posible papel oncostático de dicha hormona en tumores hormono dependientes son dos: a) la inhibición de las hormonas del eje neuroendocrino reproductor, conduciendo a la disminución de los niveles circulantes de hormonas esteroideas, y b) la habilidad de la melatonina a contrarrestar los efectos de los estrógenos a nivel de sus dianas, es decir, se comporta como un antiestrógeno. Por otro lado, tanto el aumento en la función inmune inducida por la melatonina (Maestroni, 1993) así como las propiedades antioxidantes de esta indolamina (Reiter *et al.*, 1995) también se consideran mecanismos involucrados en la acción oncostática de dicha hormona.

En la mayoría de estudios *in vivo* se han utilizado como modelos animales de cáncer de mama, aquellos inducidos mediante un carcinógeno, ya sea 7,12-dimetilbenz [a] antraceno (DMBA) o N-metilnitrosourea (NMU) (Cos y Sánchez-Barceló, 2000a, 2000b). Estos estudios tienen en común que se han basado en la comparación entre los

efectos de un carcinógeno en animales en los que, de alguna forma se han aumentado la función pineal frente a estos efectos en animales en los que se ha disminuido o inhibido la función de dicha glándula. A partir de este tipo de experimentos, se llega a la conclusión de que los animales con un aumento de la función pineal o tratados con melatonina, tienen (Cos y Sánchez-Barceló 2000 a, b) un incremento en el periodo de latencia tumoral, una significativa disminución en la incidencia tumoral, una reducción en el número y tamaño de los tumores, una mayor incidencia de fibroadenomas que de adenocarcinomas, un índice menor de crecimiento tumoral, y una mayor frecuencia de regresión en tumores espontáneos (Sánchez-Barceló *et al.*, 2003).

Otros tipo de estudios *in vivo* fueron llevados a cabo con una línea murina, C3H / Jax, con una alta incidencia de tumores mamarios espontáneos, donde se observó que tratamientos orales prolongados de melatonina reducen significativamente el desarrollo de tumores mamarios (Subramanian y Kothari, 1991). Finalmente, experimentos realizados en ratones transgénicos que sobreexpresan el proto-oncogen N-ras, involucrado en la carcinogénesis mamaria igualmente mostraron que el tratamiento de dichos ratones transgénicos con melatonina significativamente reduce la incidencia de lesiones mamarias, la expresión de la proteína N-Ras en lesiones focales hiperplásicas, y la incidencia de adenocarcinomas (Mediavilla *et al.*, 1997).

Los efectos oncostáticos de la melatonina en estos estudios *in vivo* podrían ser explicados por los efectos inhibidores de esta indolamina sobre el eje neuroendocrino reproductor (Reiter *et al.*, 1980; Brzezinski *et al.*, 1997), y la consecuente reducción de hormonas tales como la prolactina y a un aumento del estradiol, las cuales son responsables del desarrollo normal y patológico del epitelio mamario.

Recientes estudios *in vitro* desarrollados con células de cáncer mamario humano, MCF-7, cuyas características son, que expresan tanto receptores para estrógenos α y β , como receptores de melatonina MT1 (Yuan *et al.*, 2002), así como la forma salvaje de la proteína supresora de tumores p53, pusieron de manifiesto que la melatonina inhibe, de manera reversible, la proliferación celular. Estos efectos antiproliferativos tienen algunas características importantes; que son dependientes de la presencia de suero completo o suero mas estradiol, en el medio de cultivo, que son dosis dependientes, es decir, solo concentraciones de melatonina cercanas a 1 nanomolar (la concentración

nocturna en plasma de la mayoría de mamíferos) son efectivas para disminuir la proliferación celular, mientras que concentraciones fisiológicas superiores o inferiores, pierden este efecto antiproliferativo, que los precursores de melatonina, metabolitos u otros metoxiindoles no muestran dicho efecto inhibitorio, que los efectos antiproliferativos son dependientes del índice de crecimiento celular; un mayor índice de proliferación celular, mayor acción antiproliferativa de los niveles de melatonina y por último, que dichos efectos son dependientes del modelo de exposición de la melatonina, continuo o pulsátil, en el medio de cultivo. Los efectos antiproliferativos más altos se obtienen cuando la concentración de melatonina en el medio de cultivo se modifica cada 12 horas entre 10 pM y 1nM, mimetizando de este modo, las oscilaciones fisiológicas día / noche de la melatonina en el plasma de la mayoría de mamíferos (Sánchez-Barceló *et al.*, 2003).

Los efectos inhibidores del crecimiento de la melatonina, están relacionados con su efecto modulador sobre el ciclo celular. La melatonina, en presencia de suero normal o con estradiol, retarda o bloquea la progresión de células en G0-G1 en la fase S; así, cuando las células son incubadas con 1nM de melatonina, se observa una acumulación de células en G0-G1 junto con una disminución de la población de células en fase S (Cos *et al.*, 1991, García *et al.*, 1999). Los efectos moduladores de la melatonina sobre el ciclo celular, podría ser explicado por los efectos de esta indolamina sobre la expresión de algunas de las proteínas involucradas en el control de la transición G1-S. En este sentido, Mediavilla *et al.* (1999) mostraron que la melatonina a concentraciones nanomolares, incrementa la expresión de p53 y p21 WAF, aunque a pesar del incremento en p53, la melatonina no parece inducir apoptosis en estas células (Cos *et al.*, 2002).

La melatonina no sólo reduce la proliferación de células MCF-7, sino también su capacidad metastática. Este efecto es mediado, al menos en parte, por el incremento inducido por la melatonina en la expresión de dos proteínas de adhesión a la superficie celular: E-caderina y β_1 -integrina (Cos *et al.*, 1998), así como por el aumento en la comunicación intercelular por uniones gap, entre células epiteliales adyacentes (Cos y Fernández, 2000).

Los diferentes autores están de acuerdo en que los efectos oncostáticos de la melatonina sobre estas células son dependientes de su interacción con la ruta

dependiente de estrógenos en células tumorales. Las bases de esta hipótesis son, que la melatonina inhibe la proliferación sólo en aquellas células que expresan ER α (Cos y Sánchez- Barceló 2000a), que bloquea el efecto mitogénico del estradiol y contrarresta la capacidad invasiva inducida por estradiol en las células MCF- 7 (Cos *et al.*, 1998), así como potenciar la sensibilidad de las células MCF-7 a antiestrógenos como el tamoxifeno e inhibir la expresión de genes regulados por estrógenos como pS2 o catepsina (Molis *et al.*, 1995).

En este sentido, la transfección de receptores de melatonina MT1 en células MCF-7, ER α positivas, o en células MDA-MB-231, ER α negativas, significativamente aumenta los efectos de supresión del crecimiento sólo en las células MCF-7, es decir, en aquellas que expresan receptores de estrógenos (Yuan *et al.*, 2002).

El mecanismo por el cual la melatonina interacciona con la ruta de señalización de estrógenos, es una pregunta abierta. Existen evidencias que demuestran que dicha indolamina no se une a receptores de estrógenos ni interfiere con la unión del estradiol a su receptor (Molis *et al.*, 1994; García *et al.*, 1999), diferenciándose de esta forma de los clásicos antiestrógenos como el tamoxifeno y sus derivados.

El efecto de la melatonina se basa en la disminución de la expresión de ER α así como en la inhibición de la unión del complejo estradiol- receptor de estradiol a los elementos de respuesta a estrogénos (ERE, del inglés Estrogen Response Element) en el ADN (Lawson *et al.*, 1992; Molis *et al.*, 1994; García *et al.*, 1999), dependiendo estos efectos de su unión a receptores de unión a membrana de alta afinidad acoplados a proteínas G (Jones *et al.*, 2000; Ram *et al.*, 2002; Yuan *et al.*, 2002).

Por tanto podríamos concluir diciendo que la melatonina, a través de su acción antigonadotrópica y antiestrogénica, se comporta como un agente antitumoral en tumores mamarios hormono dependientes, que estas propiedades oncostáticas de la melatonina han sido observadas tanto en modelos *in vivo*, de inducción de tumores mamarios mediante carcinógenos químicos en rata, así como en modelos *in vitro* en células de tumores mamarios humanos MCF-7.

Por otro lado, las características oncostáticas de la melatonina comprenden diferentes aspectos de la biología del tumor, como su inicio, proliferación y metástasis,

así como las dosis fisiológicas en las cuales se observa dicho efecto (Sánchez-Barceló *et al.* 2003).

3.3. ANGIOGÉNESIS

La angiogénesis o formación de nuevos vasos sanguíneos, es una de las propiedades más importantes de las células neoplásicas en humanos y roedores (Gullino, 1977; Brem *et al.*, 1977; Maiorana y Gullino, 1978; Folkman *et al.*, 1989), y un proceso necesario para el crecimiento invasivo del tumor y la metástasis, constituyendo un punto importante en el control de la progresión del cáncer y en la conversión de un epitelio normal a neoplásico.

Esta neovascularización permite un rápido crecimiento del tumor por la llegada de oxígeno y nutrientes y eliminación de catabolitos, aunque también parece existir una estimulación paracrina de las células tumorales, por distintos factores de crecimiento generados por las células endoteliales vasculares.

3.3.1. ANGIOGÉNESIS Y SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA

Los componentes activos de la cascada del sistema renina angiotensina (SRA) se originan por proteólisis limitada, dando lugar a angiotensinas con actividades pro- y anti-proliferativas y angiogénicas, aparte de sus funciones biológicas controlando la homeostasis y volumen sanguíneo. En la década pasada, la Ang II fue ampliamente estudiada por tener propiedades proangiogénicas y de factor de crecimiento (Opie, 1994; Dostal y Baker, 1999). Existen evidencias que apoyan la idea de que tanto la Ang II como el enzima convertidor de angiotensina (ACE) pueden tener importantes papeles en la angiogénesis, crecimiento e invasión de los tejidos tumorales. La Ang II posee actividad angiogénica y proliferativa tanto en sistemas *in vivo* como *in vitro*, estando implicada tanto en el crecimiento vascular normal como patológico. Por otro lado, la Ang II estimula la producción de factor de crecimiento transformante β (TGF- β , del inglés Transforming Growth Factor- β) (Nicoletti y Michel, 1999), el cual es un factor promotor de la angiogénesis (Adrian, 1997). El factor de crecimiento VEGF es uno de los más importantes factores pro-angiogénicos, estando asociadas altas concentraciones en suero con la progresión tumoral, mala respuesta a tratamientos e índices de

supervivencia bajos en el caso del carcinoma de esófago (Dostal y Baker, 1999). Su receptor VEGF-R2, es sobreexpresado por la Ang II vía estimulación de receptor AT1 (Otani *et al.*, 2001).

En este sentido, la inhibición de SRA por inhibidores de ACE, atenúan la angiogénesis (Amaral *et al.*, 2001). Mientras que la Ang II estimula la neovascularización vía receptor AT1, uno de sus metabolitos, la angiotensina (1-7) presenta propiedades antiangiogénicas vía receptor AT2 (Machado *et al.*, 2000).

Por tanto, el papel del SRA en el proceso angiogénico está basado en que la Ang II es, en sí misma, un factor promotor de la angiogénesis a través de su receptor AT1. Puesto que las plaquetas expresan receptores AT1, se ha sugerido que estas células modulan la angiogénesis a través de la producción de diversos factores pro-angiogénicos. Además, algunas células tumorales expresan receptores AT1, sobre los que puede actuar directamente la AngII (Abali *et al.*, 2002).

III. HIPÓTESIS Y PLANTEAMIENTO

En los países desarrollados, el cáncer de mama es el cáncer más común entre las mujeres, y la principal causa de muerte entre éstas. Desde los años 80 se sabe que los mismos factores que son responsables de la proliferación del tejido mamario normal durante la pubertad y de los cambios cíclicos del ciclo menstrual, están implicados en la promoción, progresión y aparición del cáncer de mama. De hecho, los estrógenos y la progesterona son mitogénicos en tejido mamario, de modo que mujeres que nunca han tenido un adecuado funcionamiento de los ovarios en términos hormonales, muestran una ausencia casi total de cáncer de mama, siendo la incidencia similar a la observada en varones.

Los modelos en roedores han sido particularmente útiles para el estudio del cáncer de mama, porque en estas especies, la glándula mamaria es fuente de neoplasmas hormono-dependientes, que son en muchos aspectos similares a los mas frecuentes diagnósticos de malignidad detectados en mujeres. Existen numerosos trabajos que documentan que los mismos tipos de lesiones benignas, premalignas y malignas morfológicamente detectables que se desarrollan en la mama humana también aparecen en modelos de roedores durante la carcinogénesis mamaria. Es por ello que la inducción de carcinomas mamarios por inyección de N-Metil-nitrosourea (NMU) en ratas hembras es uno de los métodos mas frecuentemente utilizados para la investigación de la carcinogénesis de mama y de los tratamientos de tumores de mama. El estatus endocrino de dichos carcinomas, parece ser similar al del cáncer de mama en mujeres. Generalmente, la NMU induce carcinomas mamarios que se caracterizan por ser agresivos, localmente invasivos y capaces de metastizarse.

Dentro de este contexto, los enzimas proteolíticos (peptidasas) son particularmente interesantes en la investigación del cáncer porque pueden participar, al menos en parte, en la metástasis. La mayoría de peptidasas son exopeptidasas, que

liberan uno o varios aminoácidos del extremo N- o C- terminal, o endopeptidasas, que actúan internamente en el péptido. Las exopeptidasas que actúan en el extremo N-terminal y que liberan un solo residuo aminoacídico se conocen como aminopeptidasas (APs). Estas APs, generalmente son metalopeptidasas dependientes de zinc, es decir, hidrolasas en las que la ruptura del enlace peptídico es mediado por una molécula de agua, que es activada por un catión metálico divalente, normalmente el zinc. Algunas de estas aminopeptidasas son utilizadas en clínica como marcadores de enfermedades y además juegan un importante papel fisiológico en la regulación de varios péptidos biológicamente activos. Cambios en estos péptidos podrían reflejarse en modificaciones de las actividades enzimáticas. La finalidad del presente trabajo es analizar la actividad de un amplio espectro de aminopeptidasas, de sustratos neutros como la alanina aminopeptidasa, (APN, CD13); (E.C: 3.4.11.2), leucina aminopeptidasa (LeuAP); (E.C: 3.4.11.1), tirosina aminopeptidasa (TyrAP); (E.C: 3.4.11.-) y cistina aminopeptidasa (Oxitocinasa); (E.C: 3.4.11.3), básicos como la arginina aminopeptidasa (APB); (E.C: 3.4.11.6) ácidos, como la aspartato y glutamato aminopeptidasa (Aminopeptidasa A, APA); (E.C: 3.4.11.7) y de tipo omega, como la pirrolidon carboxipeptidasa (piroglutamato aminopeptidasa, Pcp); (E.C: 3.4.19.3) en el suero y diversos tejidos de ratas con tumores de mama inducidos por NMU, para evaluar, por un lado, el posible valor de estas actividades como marcadores biológicos de esta enfermedad, y por otro, el papel que pudieran desempeñar las distintas hormonas peptídicas a las que regulan, en la promoción y/o progresión tumoral.

De este modo, se han llevado a cabo los siguientes experimentos:

- * Inducción de tumores de mama en ratas mediante la administración de N-metil-nitrosourea.
- * Análisis de la evolución del peso corporal, localización y número de tumores, diámetros mayor y menor de los tumores.
- * Análisis de otros parámetros de desarrollo tumoral, como son el periodo de latencia, la incidencia tumoral y el número medio de tumores por rata.

- * Análisis de la actividad específica de APN, APB, oxitocinasa, Pcp, AspAP, GluAP, LeuAP y TyrAP en suero de ratas controles y ratas con cáncer de mama inducido por la administración de N-metil nitrosourea.
- * Análisis de la actividad específica soluble y unida a membrana de APN, APB, oxitocinasa, Pcp, AspAP, GluAP, LeuAP y TyrAP en el hipotálamo, la hipófisis anterior, la hipófisis posterior, la glándula pineal, la mama, el tiroides, la corteza y médula adrenal, el ovario y el útero.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

1 ANIMALES

En la realización del presente estudio se han utilizado cuarenta ratas vírgenes de la variedad Wistar, con un peso medio de 164.7 ± 4.7 g. 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.

1.1. GRUPOS EXPERIMENTALES

Las ratas se dividieron aleatoriamente en dos grupos. A un grupo de 30 animales se le inyectaron intraperitonealmente tres dosis de 50 mg / Kg peso de N-metil nitrosourea (NMU) disuelto en agua destilada (10 mg / ml) a los 50, 80 y 110 días del nacimiento, como describe Rivera *et al.* (1994). Dieciocho animales desarrollaron tumores, de los cuales se tomaron aleatoriamente 10 animales. Al grupo control, de diez animales, solo se le inyectó el disolvente, agua destilada. Para la detección y el control del crecimiento tumoral, las ratas fueron examinadas por palpación dos días a la semana después de la segunda inyección de NMU y se determinó el número de tumores, diámetro mayor y menor de cada tumor. El peso corporal de los animales se determinó cada semana.

El crecimiento del tumor también 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.

2. SACRIFICIO DE LOS ANIMALES Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS

A los 122 días de la primera inyección de NMU, los animales, tanto el grupo control como aquellos a los que se les habían inducido tumores mamarios mediante NMU, fueron sacrificados bajo anestesia de equitensin (2 ml/Kg de peso) administrada vía intraperitoneal.

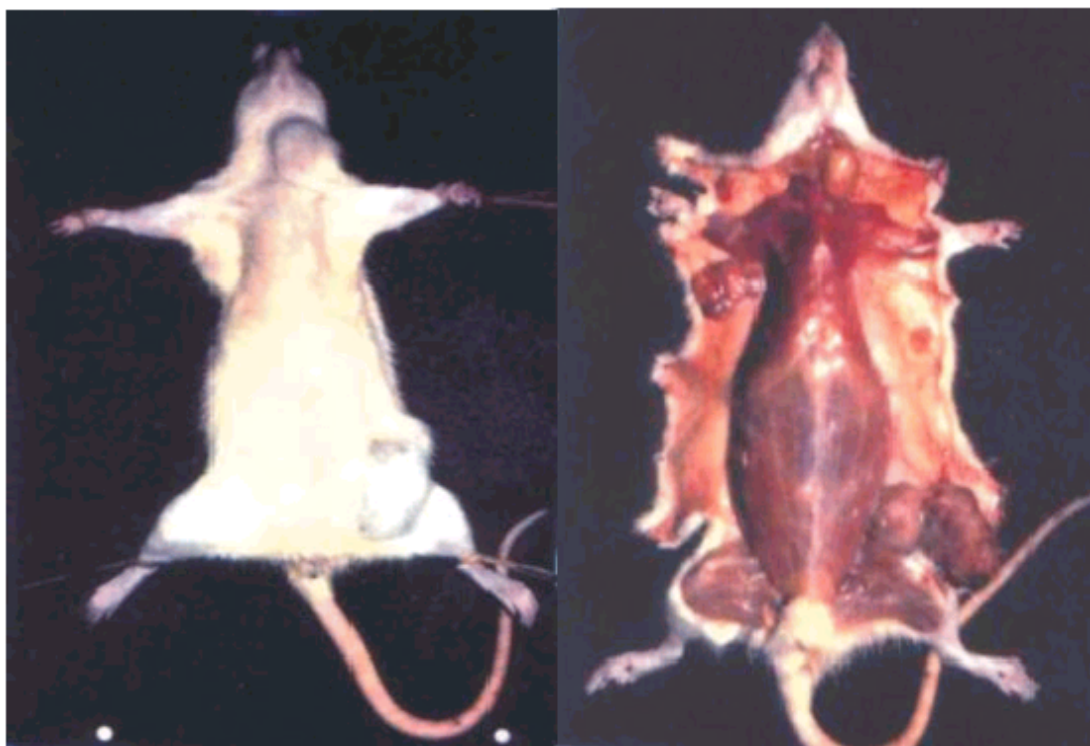


Figura M.1. Fotografía que muestra la localización de los tumores de mama inducidos por *N*-metilnitrosourea.

Tras colocar a los animales en posición decúbito supino, se fijan por patas y manos (*Figura M.1.*) y se procede a efectuar una incisión por la línea dorso-lateral desde el extremo del esternón hacia ambos laterales y se abre la calota torácica. 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 posterior análisis.

A continuación se procedió a perfundir a los animales con suero salino mediante la sección de la aurícula derecha como vía de salida de la solución de perfusión (suero salino fisiológico al 9 ‰). Esta solución se inyecta en el ventrículo izquierdo hasta que el líquido que fluye por la aurícula derecha aparece completamente limpio. Tras la perfusión se procede a la apertura de la calota, se extrae el cerebro y se disecciona para localizar el hipotálamo. Posteriormente se extrae la hipófisis y la glándula pineal. A continuación, se procedió a extraer el tiroides, las glándulas adrenales, mamas, ovario y útero, de animales control y tumorales, y los tumores de mama desarrollados. Los tejidos extraídos fueron congelados y almacenados a -80°C hasta su posterior uso. Finalmente, una parte de las muestras de tumores de mama fueron procesadas para su posterior análisis histológico.

3. ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LAS MUESTRAS MAMARIAS

Las muestras de tejido tumoral fueron procesadas para su examen histológico. Para ello, se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS durante toda la noche, posteriormente fueron deshidratadas en una escalera creciente de alcoholes, y tras pasar toda la noche en N-butílico, se realizaron los bloques de parafina. Los cortes, de un grosor de 10-15 µm, fueron teñidos con Hematoxilina-Eosina (*Figura M.2.*), para su observación al microscopio óptico. Todos los tumores de mama analizados fueron carcinomas ductales infiltrantes.

4. OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN SOLUBLE Y DE MEMBRANA

Los diferentes tejidos obtenidos se homogeneizan en 10 volúmenes de una solución tampón Tris-CIH 10 mM, pH 7.4. Con el fin de obtener la fracción soluble, el homogeneizado se ultracentrífuga a 100.000 g durante 30 minutos a una temperatura de 4°C. El sobrenadante obtenido fue empleado para la determinación de las distintas actividades aminopeptidasas solubles y el contenido de proteínas.

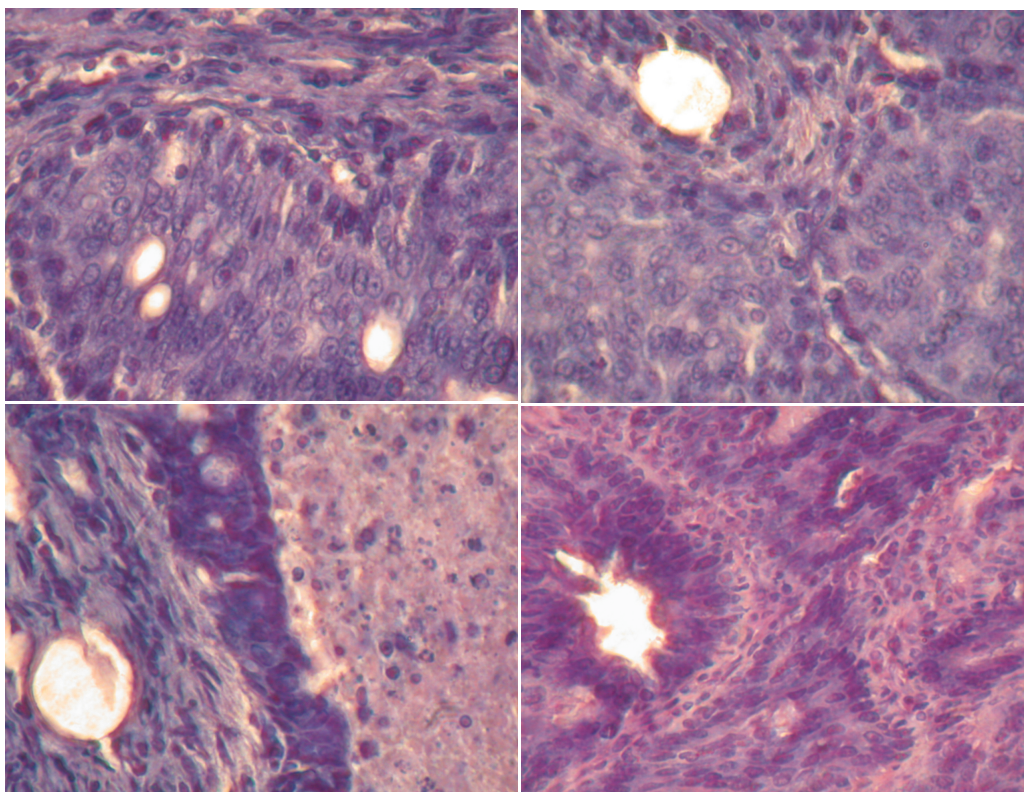


Figura M.2. Cortes histológicos de los tumores mamarios inducidos con *N*-metil nitrosourea, teñidos con hematoxilina-eosina. 400 X

Para solubilizar las proteínas de membrana, los precipitados obtenidos en la anterior ultracentrifugación se resuspenden en tampón Tris-ClH 10 mM al que se le añade Tritón X-100 al 1% (pH 7.4) y se ultracentrifuga a 100.000 g durante 30 minutos a 4 °C. Con el fin de retirar el detergente, que podría interferir en las posteriores determinaciones enzimáticas, a los sobrenadantes obtenidos se les añade 100 mg/ml del adsorbente polimérico Bio-Beads SM-2 y se mantienen en un rotor orbital durante 2 horas a 4°C. Tras este tiempo se retiran los Bio-Beads SM-2 y las muestras resultantes, se emplean para la determinación de las distintas actividades aminopeptidasas unidas a membrana así como el contenido de proteínas.

5. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE AMINOPEPTIDASAS

Las actividades aminopeptidasas solubles y unidas a membrana se analizaron fluorimétricamente utilizando como sustratos soluciones de alanina- β -naftilamida (AlaNNap, para la determinación de aminopeptidasa N, APN), arginina- β -naftilamida (ArgNNap, para la determinación de aminopeptidasa B, APB), cisteína- β -naftilamida (CysNNap, para la determinación de oxitocinasa, OTasa), piroglutamato- β -naftilamida (pGluNNap, para la determinación de pirrolidón carboxipeptidasa, Pcp), aspartato- β -naftilamida (AspNNap, para la determinación de aspartato aminopeptidasa, AspAP), glutamato- β -naftilamida (GluNNap, para la determinación de glutamato aminopeptidasa, GluAP), leucina- β -naftilamida (LeuNNap, para la determinación de leucina aminopeptidasa, LeuAP) y tirosina- β -naftilamida (TyrNNap, para la determinación de tirosina aminopeptidasa, TyrAP) según los modelos modificados de Greenberg (1962) (APN, APB, OTasa, LeuAP y TyrAP), Tobe *et al.* (1980) (GluAP), Cheung y Cushman (1971) (AspAP) y Schwabe y McDonald (1977) (Pcp), con algunas modificaciones:

En placas de 96 pocillos, se ponen diez microlitros de cada muestra y se incuban durante 30 minutos a 37°C con 100 μ l de la solución de sustrato que contenía 100 μ M de AlaNNap, ArgNNap, CysNNap, AspNNap, GluNNap, pGluNNap, LeuNNap o TyrNNap. Las reacciones fueron detenidas añadiendo 100 μ l de tampón acetato 0.1 M pH 4.2.

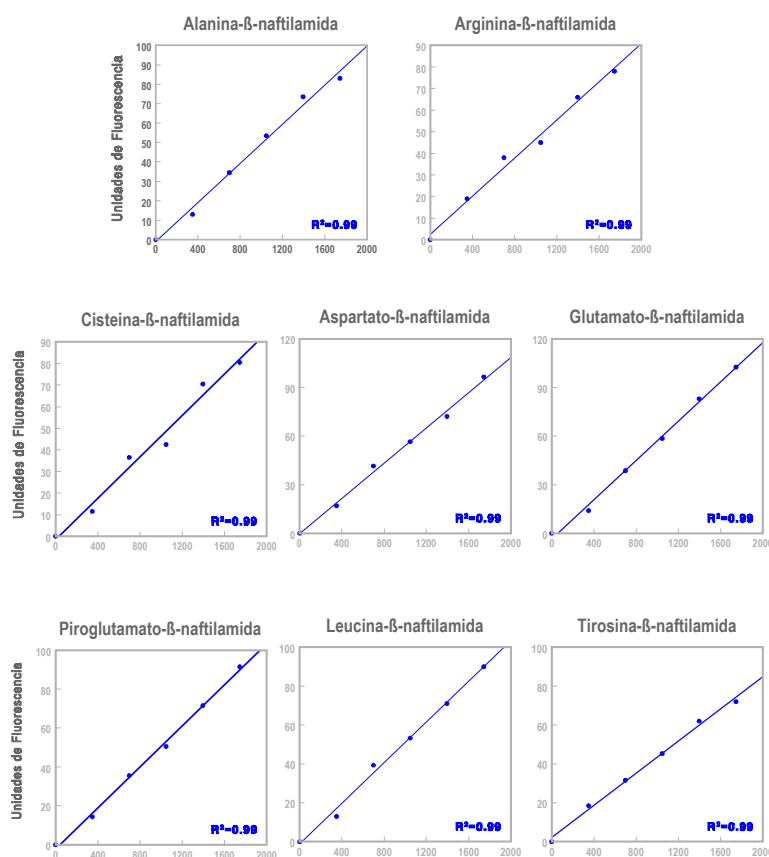
Todas las actividades fueron determinadas por duplicado. La cantidad de β -naftilamina obtenida como resultado de la actividad enzimática fue medida fluorimétricamente a una longitud de onda de emisión de 412 nm y de excitación de 345 nm. La actividad enzimática específica se expresó en picomoles de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

5.1. RECTA DE CALIBRADO DE β -NAFTILAMINA

La recta de calibrado de β -naftilamina se realizó disponiendo en los pocillos cantidades conocidas crecientes de este compuesto (en 10 μ l), a las que se añadieron 100

μl de las soluciones de sustrato conteniendo AlaNNap, ArgNNap, CysNNap, AspNNap, GluNNap, pGluNNap, LeuNNap o TyrNNap.

Rectas de Calibrado



pmoles de β-naftilamina

Figura M.3. Rectas de calibrado de β-naftilamina.

Tras incubar durante 30 minutos a 37°C, se añaden 100 μl de tampón acetato 0.1 M, pH 4.2. La β-naftilamina se determinó fluorimétricamente a una longitud de onda de emisión de 412 nm y de excitación de 345 nm. Cada muestra se midió por duplicado. Los valores de fluorescencia obtenidos con las muestras experimentales fueron extrapolados en esta recta de calibrado para conocer la cantidad de β-naftilamina liberada como resultado de la correspondiente actividad enzimática (Figura M.3.).

6. 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 μg de proteínas por lo que se considera ideal para los experimentos realizados.

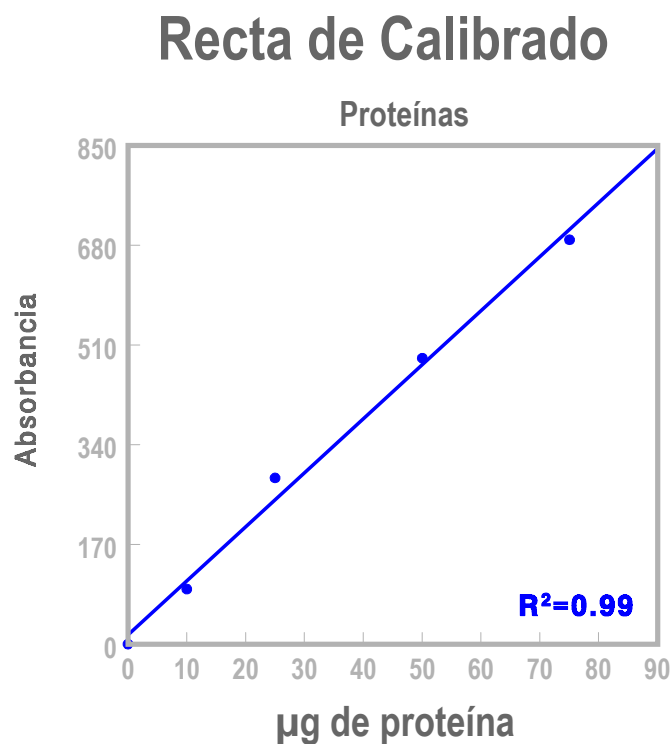


Figura M.4. Recta de calibrado de albúmina

Para la determinación de proteínas se han empleado 10 μl 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 leídas con un espectrofotómetro (CE 393 Digital Spectrophotometer, Cecil instruments) a 595 nm, se transforman en mg de proteínas por ml, empleando una recta de calibrado (ver más adelante) obtenida tras medir por el mismo procedimiento concentraciones crecientes de una solución de albúmina sérica bovina. Cada muestra se mide por duplicado.

6.1. RECTA DE CALIBRADO DE ALBÚMINA

La recta de calibrado de albúmina se obtiene tras medir por el procedimiento anteriormente descrito, concentraciones crecientes de una solución de albúmina sérica bovina. Cada muestra se midió por duplicado y estos valores de absorbancia fueron extrapolados en la recta de calibrado para obtener el valor de proteína (*Figura M.4.*).

7. 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.

8. SOLUCIONES

8.1. SOLUCIÓN DE N-METIL NITROSOUREA

Para preparar la solución de N-metil nitrosourea (Sigma) para animales de un peso corporal de 200 g, se toman 10 mg de NMU que se diluyen en 1 ml de agua destilada.

8.2. HEMATOXILINA

Preparar soluciones A y B.

- * Solución A: Hematoxilina (Sigma), 1 g y alcohol absoluto, 10 ml.
- * Solución B: Alumbre potásico, 20 g y agua destilada 200 ml. Disolver en caliente y filtrar.

Al día siguiente mezclar A y B, calentar a punto de hervir, retirar del fuego y añadir 3 ml de permanganato potásico en solución acuosa saturada. Hervir durante 5 minutos.

8.3. EOSINA

Para preparar 100 ml de eosina (Merck), se disuelven 0.3 g de eosina en 100 ml de alcohol 25°.

8.4. EQUITENSIN

Para la preparación del equitensín, se disolvieron en estricto orden los siguientes compuestos:

- * 21.25 g de hidrato de cloral en 49.4 ml de etanol absoluto.
- * A continuación se añadieron 4.8 g de pentobarbital sódico previamente disuelto en 81 ml de agua bidestilada.
- * Posteriormente, se añadieron 198 ml de 1,2-propilen glicol.
- * A la solución así obtenida, se añadieron 10.63 g de sulfato de magnesio, previamente disuelto en 50 ml de agua bidestilada.
- * La solución se completó hasta 500 ml de agua bidestilada.

8.5. TRIS-ClH, 50 mM

Para la preparación de 500 ml, se toman 3.027 g de Trizma Base (Tris-[hidroximetil]-aminometano) (Sigma) y se disuelven en agua destilada, ajustando al pH deseado con ClH 0.1 N (Merck).

8.6. TRIS-ClH, 10 mM

Para preparar 100 ml de este tampón, se toman 20 ml de Tris-ClH 50 mM y añadir agua destilada hasta completar el volumen.

8.7. TRIS-ClH, 10 mM, TRITÓN X-100 1%

Para la preparación de 50 ml, se toman 49.5 ml de Tris-ClH 10 mM y se le añaden 0.5 ml de Tritón X-100 (Sigma).

8.8. TAMPÓN FOSFATO 50 Mm, pH 7.4

Para preparar 1000 ml, se toman 13.40 g de fosfato sódico dibásico ($\text{PO}_4\text{HNa}_2 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) (Merck) y 7.8 g de fosfato sódico monobásico ($\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) (Merck), completando el volumen con agua destilada, y ajustando el pH con ClH 1 N.

8.9. TAMPÓN ACETATO, 0.1 M, pH 4.2

Para la preparación de 1000 ml, se pesan 8.203 g de acetato sódico (CH_3COONa) (Merck), se añaden 5.9 ml de ácido acético (CH_3COOH) (Panreac) y se afora hasta completar el volumen, ajustándose el pH con ácido acético.

8.10. SOLUCIONES DE INCUBACIÓN

8.10.1. Solución de alanina β -naftilamida

Para preparar 100 ml, se pesan 2.14 mg de alanina- β -naftilamida (AlaNNap) (Sigma), 10 mg de DTT, 10 mg de albúmina sérica bovina y se disuelven en tampón fosfato 50 mM. Se ajusta el pH a 7.4 con CIH 0.1N.

8.10.2. Solución de arginina- β -naftilamida

Para preparar 100 ml, se pesan 3.35 mg de arginina- β -naftilamida (ArgNNap) (Sigma), 10 mg de DTT, 10 mg de albúmina sérica bovina y se disuelven en tampón fosfato 50 mM. Se ajusta el pH a 7.4 con CIH 0.1N.

8.10.3. Solución de cisteína- β -naftilamida.

Para preparar 100 ml, se pesan 5.63 mg de cisteína- β -naftilamida (CysNNap) (Sigma), 10 mg de DTT, 10 mg de albúmina sérica bovina y se disuelven en tampón Tris-CIH 50 mM. Se ajusta el pH a 6 con CIH 0.1N.

8.10.4. Solución de piroglutamato- β -naftilamida.

Para preparar 100 ml, se pesan 2.54 mg de piroglutamato- β -naftilamida (pGluNNap) (Sigma), 10 mg de albúmina sérica bovina, 20 mg de DTT, 37.8 mg de EDTA y se disuelven en tampón fosfato 50 mM. Se ajusta el pH a 7.4 con CIH 0.1N.

8.10.5. Solución de aspartato- β -naftilamida.

Para preparar 100 ml, se pesan 2.58 mg de aspartato- β -naftilamida (AspNNap) (Sigma), 10 mg de albúmina sérica bovina, 37.8 mg de EDTA (Sigma), 39.4 mg MnCl₂ (Sigma) y se disuelven en tampón Tris-CIH 50 mM. Se ajusta el pH a 7.4 con CIH 0.1N.

8.10.6. Solución de glutamato- β -naftilamida

Para preparar 100 ml, se pesan 2.72 mg de glutamato- β -naftilamida (GluNNap) (Sigma), 10 mg de albúmina sérica bovina, 20 mg de DTT, 555 mg de CaCl₂ (Sigma) y se disuelven en tampón Tris-CIH 50 mM. Se ajusta el pH a 7.4 con CIH 0.1N.

8.10.7. Solución de leucina- β -naftilamida

Para preparar 100 ml, se pesan 2.92 mg de leucina- β -naftilamida (LeuNNap) (Sigma), 10 mg de DTT, 10 mg de albúmina sérica bovina y se disuelven en tampón fosfato 50 mM. Se ajusta el pH a 7.4 con CIH 0.1N.

8.10.8. Solución de tirosina- β -naftilamida

Para preparar 100 ml, se pesan 3.064 mg de tirosina- β -naftilamida (TyrNNap) (Sigma), 10 mg de DTT, 10 mg de albúmina sérica bovina (Sigma) y se disuelven en tampón fosfato 50 mM. Se ajusta el pH a 7.4 con CIH 0.1N.

8.11. SOLUCIÓN DE β -NAFTILAMINA

Se disuelve 1 mg de β -naftilamina (Sigma) en 1 ml de dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma). Se toman 50 μ l y se añaden 950 μ l de tampón fosfato.

8.12. SOLUCIÓN DE ALBÚMINA

Se disuelve 1 mg de albúmina sérica bovina (Sigma) en 1 ml de agua destilada.

8.13. SOLUCIÓN DE BRADFORD

Para preparar esta solución, se disuelven 100 mg de Coomasie G azul brillante (Sigma) en 50 ml de etanol al 96% (Merck). Se añaden 100 ml de ácido ortofosfórico al 85% (Panreac) y 50 ml de agua destilada. Se filtra con papel de filtro. La solución de trabajo debe estar diluida cinco veces con agua destilada.

V. RESULTADOS

1. EVOLUCIÓN DEL PESO CORPORAL Y PARÁMETROS DE CRECIMIENTO TUMORAL.

1.1. Evolución del peso corporal.

El análisis de la evolución del peso corporal de los animales tras la administración de NMU y sus respectivos controles muestra un aumento de peso con el tiempo sin diferencias significativas entre grupos (*Tabla R.1, Figura R1*). No obstante, en la semana trece y coincidiendo con la aparición del primer tumor, se encuentra un aumento significativo ($p < 0.01$) del peso corporal en los animales tratados con NMU, que vuelve a los valores control a partir de la semana 14.

PESO CORPORAL		
Semana	Control	Tumoral NMU
1	190.97 ± 3.79	198.53 ± 4.8
2	198.08 ± 4.5	200.82 ± 4.09
3	201.66 ± 5.67	202.93 ± 9.19
4	221.08 ± 5.36	206.32 ± 7.43
5	229.46 ± 5.23	215.56 ± 5.32
6	233.65 ± 4.37	228.5 ± 5.07
7	244.46 ± 5.06	236.59 ± 5.04
8	248.7 ± 5.75	244.94 ± 5.41
9	251.59 ± 5.01	246.24 ± 4.51
10	258.38 ± 5.57	249.83 ± 4.2
11	261.48 ± 4.92	254.83 ± 4.82
12	269.2 ± 6.79	260.89 ± 5.57
13	271.01 ± 5.8	303.8 ± 10.6
14	273.66 ± 6.04	281.87 ± 13.29
15	275.52 ± 4	274.95 ± 8.49
16	277.65 ± 5	269.12 ± 8.4
17	279.54 ± 6	269.28 ± 6.66
18	281.21 ± 5	269.93 ± 7.89
19	282.7 ± 4	278.27 ± 7.58
20	284.03 ± 5	280.08 ± 7.36

Tabla R.1. Datos de la evolución del peso corporal, expresado en gramos, desde la primera semana tras la exposición al carcinógeno, hasta la semana en que los animales fueron sacrificados. (Media ± SEM; n = 10)

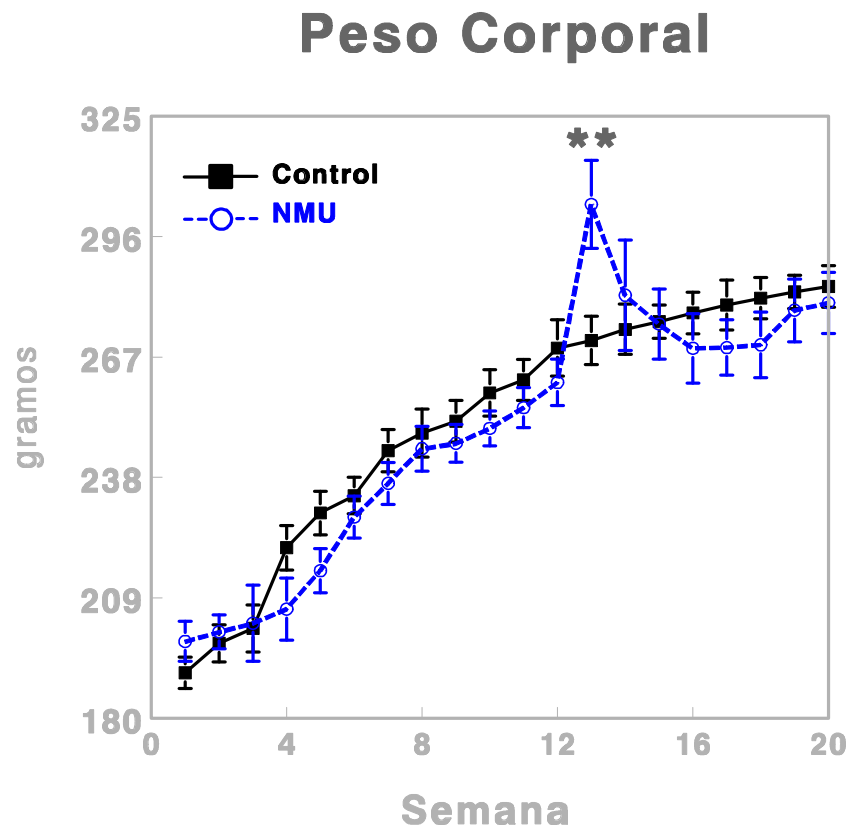


Figura R.1. Evolución del peso corporal de los animales tras la administración de NMU y sus respectivos controles. (Media \pm SEM; ** $p < 0.01$; $n = 10$)

1.2 Localización y tamaño de los tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea. Parámetros de crecimiento tumoral.

El análisis del número de tumores, diámetro mayor y diámetro menor de los tumores de mama inducidos por la administración de NMU (*Tabla R.2.*), muestra un incremento con el tiempo, a partir de la semana 13 de aparición del primer tumor. Aparece además (*Tabla R.3.*) un periodo de latencia de 113.0 ± 4.2 días (Media \pm SEM), una incidencia tumoral del 60 % y un número medio de tumores por rata de 1.93 ± 0.4 (Media \pm SEM). La figura R.2. muestra la localización de los tumores.

PARÁMETROS TUMORALES			
Semana	Nº Tumores	Diámetro Mayor	Diámetro Menor
13	1 \pm 0	1.5 \pm 0.5	1.25 \pm 0.25
14	1 \pm 0	2 \pm 0.5	1.37 \pm 0.23
15	1 \pm 0	2.5 \pm 0.54	2.25 \pm 0.32
16	1.2 \pm 0.2	2.1 \pm 0.43	1.8 \pm 0.37
17	1.28 \pm 0.18	2.39 \pm 0.42	2.14 \pm 0.31
18	1.4 \pm 0.22	2.3 \pm 0.35	2.13 \pm 0.35
19	1.6 \pm 0.3	2.66 \pm 0.3	2.36 \pm 0.27
20	1.93 \pm 0.4	2.71 \pm 0.28	2.38 \pm 0.25

Tabla R.2. Evolución del número de tumores, diámetro mayor y diámetro menor, tras la aparición del primer tumor. (Media \pm SEM; n = 10)

Periodo de Latencia	Incidencia Tumoral	Tumores por Rata
113.0 \pm 4.2	60 %	1.93 \pm 0.4

Tabla R.3. Parámetros de crecimiento tumoral en animales con cáncer de mama inducido por la administración de N-metil nitrosourea. (Media \pm SEM; n = 10)

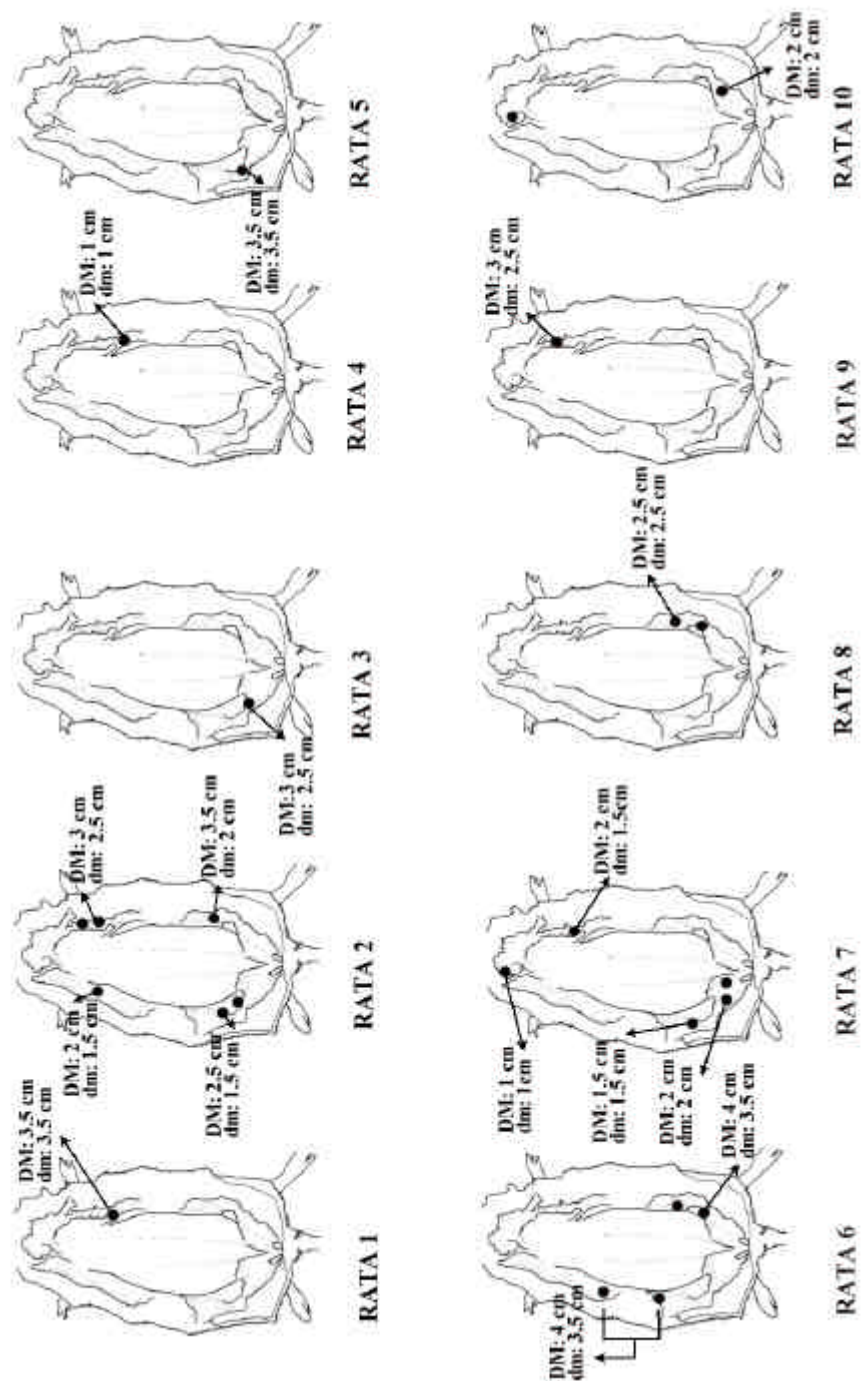


Figura R.2. Localización, diámetro mayor, y diámetro menor de los tumores de mama inducidos por la administración de N-metil nitrosourea en cada animal.

2. ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE AMINOPEPTIDASAS SÉRICAS EN RATAS CON TUMORES DE MAMA INDUCIDOS POR N-METIL NITROSOUREA.

2.1. Actividad específica de aminopeptidasas del suero en animales controles y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea.

El análisis del efecto de la actividad específica de aminopeptidasas del suero en animales controles y con tumores de mama inducidos por la administración de NMU, muestra los siguientes resultados:

La actividad específica de aminopeptidasa N no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU (*Tabla R.4., Figura R.3.*).

La actividad específica de aminopeptidasa B muestra (*Tabla R.4., Figura R.4.*) un incremento significativo ($p < 0.01$) del 32 % en los animales con tumores de mama inducidos por NMU, respecto a los controles.

La actividad específica oxitocinasa muestra un incremento significativo (*Tabla R.4., Figura R.5.*) ($p < 0.01$) del 45 % en los animales con tumores de mama inducidos por NMU respecto a los controles.

La actividad específica pirrolidón carboxipeptidasa (*Tabla R.4., Figura R.6.*) muestra un descenso significativo ($p < 0.05$) del 28 % en los animales con tumores de mama inducidos mediante NMU respecto a los controles.

La actividad específica aspartato aminopeptidasa no muestra cambios significativos entre los animales control y los animales con tumores de mama inducidos por NMU (*Tabla R.4., Figura R.7.*).

La actividad específica glutamato aminopeptidasa muestra un incremento significativo ($p < 0.05$) del 54.61 %, en los animales con tumores de mama inducidos mediante NMU respecto a los controles (*Tabla R.4., Figura R.8.*).

La actividad específica leucina aminopeptidasa muestra un incremento significativo (*Tabla R.4., Figura R.9.*) ($p < 0.01$) del 54.41 % en los animales con tumores de mama inducidos por NMU respecto a los controles.

La actividad específica tirosina aminopeptidasa muestra un incremento significativo ($p < 0.05$) del 60.8 % en los animales con tumores de mama inducidos por NMU respecto a los controles (*Tabla R.4., Figura R.10.*).

SUERO		
	Control	NMU
Aminopeptidasa N	143.54 ± 8.30	157.23 ± 8.68
Aminopeptidasa B	133.15 ± 10.08	176.70 ± 10.12
Oxitocinasa	88.43 ± 13.77	128.22 ± 6.40
Pirrolidón Carboxipeptidasa	72.35 ± 6.40	51.95 ± 6.41
Aspartato Aminopeptidasa	68.52 ± 5.61	76.76 ± 8.54
Glutamato Aminopeptidasa	50.61 ± 8.02	78.25 ± 7.05
Leucina Aminopeptidasa	109.83 ± 13.77	169.59 ± 11.85
Tirosina Aminopeptidasa	70.83 ± 9.68	113.9 ± 13.07

Tabla R.4. Valores de actividades específicas de aminopeptidasa N, aminopeptidasa B, oxitocinasa, pirrolidón carboxipeptidasa, glutamato aminopeptidasa, aspartato aminopeptidasa, leucina aminopeptidasa y tirosina aminopeptidasa del suero de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en picomoles de la correspondiente aminoacil-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media ± SEM; n = 9)

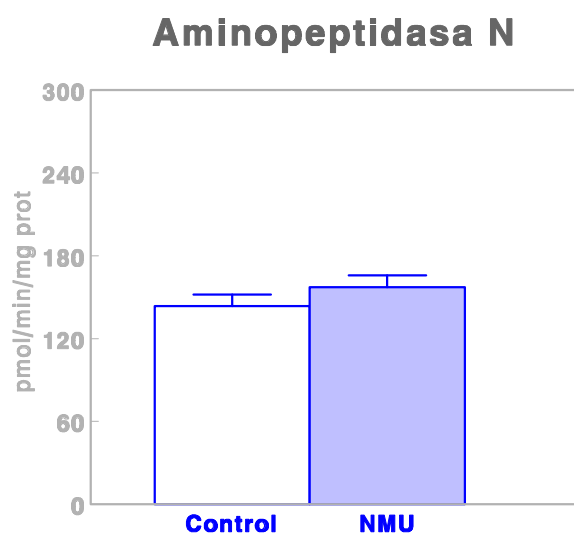


Figura R.3. Representación de los valores de actividad específica de aminopeptidasa N del suero de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en picomoles de alanina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; n = 9)

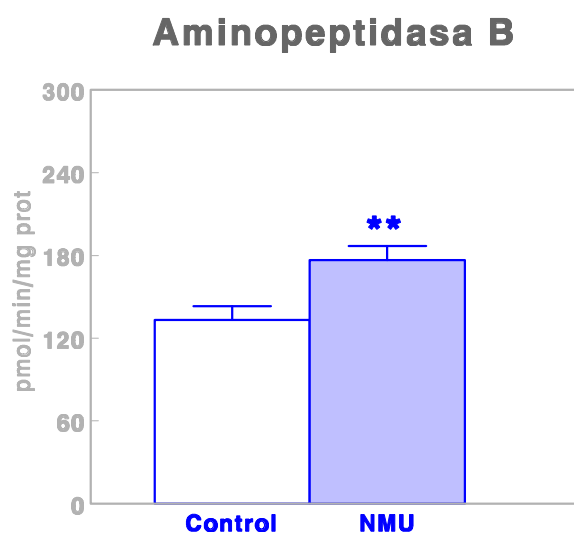


Figura R.4. Representación de los valores de actividad específica de aminopeptidasa B del suero de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en picomoles de arginina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; **p<0.01; n = 9)

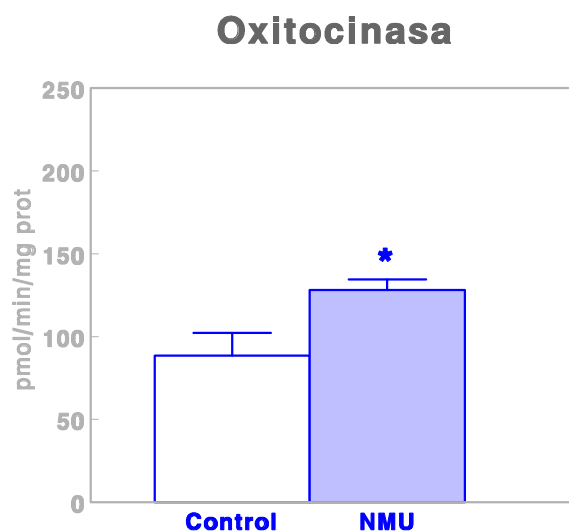


Figura R.5. Representación de los valores de actividad específica de oxitocinasa del suero de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en picomoles de cistina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; * $p < 0.05$; $n = 9$)

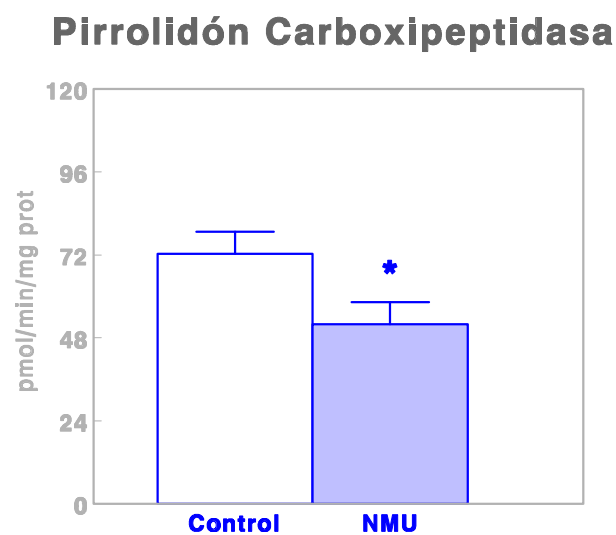


Figura R.6. Representación de los valores de actividad específica de pirrolidón carboxipeptidasa del suero de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en picomoles de piroglutamato- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; * $p < 0.05$; $n = 9$)

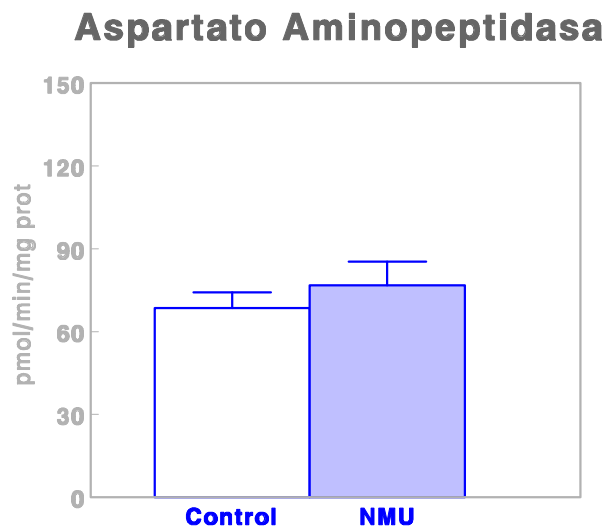


Figura R.7. Representación de los valores de actividad específica de aspartato aminopeptidasa del suero de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en picomoles de aspartato- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; n = 9)

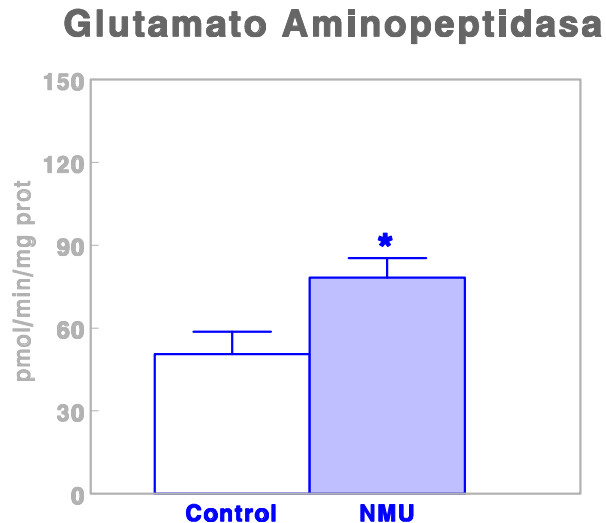


Figura R.8. Representación de los valores de actividad específica de glutamato aminopeptidasa del suero de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en picomoles de glutamato- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; *p<0.05; n = 9)

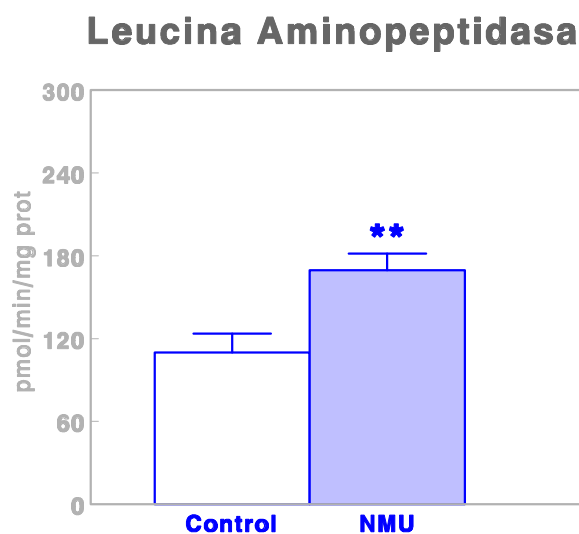


Figura R.9. Representación de los valores de actividad específica de leucina aminopeptidasa del suero de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en picomoles de leucina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; ** $p < 0.01$; $n = 9$)

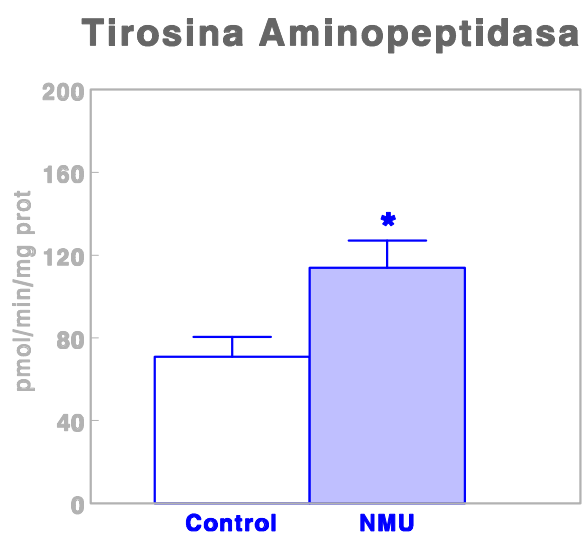


Figura R.10. Representación de los valores de actividad específica de tirosina aminopeptidasa del suero de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en picomoles de tirosina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; * $p < 0.05$; $n = 9$)

3. ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE AMINOPEPTIDASAS TISULARES EN RATAS CON TUMORES DE MAMA INDUCIDOS POR N-METIL NITROSOUREA.

3.1. Actividad específica de aminopeptidasas solubles y unidas a membrana en el hipotálamo de animales controles y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea.

El análisis de la actividad específica de aminopeptidasas solubles y unidas a membrana en el hipotálamo de animales controles y con tumores de mama inducidos por la administración de NMU, muestra los siguientes resultados:

La actividad específica aminopeptidasa N soluble muestra un descenso significativo ($p < 0.001$) del 66 % en los animales con tumores de mama inducidos por NMU respecto a los controles. Sin embargo, la actividad específica de aminopeptidasa N unida a membrana no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU (*Tabla R.5., Figura R.11.*).

La actividad específica de aminopeptidasa B soluble muestra un descenso significativo ($p < 0.001$) del 72.7 % en los animales con tumores de mama inducidos por NMU respecto a los controles (*Tabla R.5., Figura R.12.*). Por el contrario la actividad específica de aminopeptidasa B unida a membrana no muestra cambios significativos entre los animales control y los animales con tumores de mama inducidos por NMU.

La actividad específica de oxitocinasa soluble muestra un descenso significativo ($p < 0.001$) del 48.4 % en los animales con tumores de mama inducidos por NMU respecto a los controles (*Tabla R.5., Figura R.13.*). Sin embargo, la actividad específica de oxitocinasa unida a membrana no muestra cambios significativos entre los animales control y los animales con tumores de mama inducidos por NMU.

La actividad específica de pirrolidón carboxipeptidasa soluble muestra un descenso significativo ($p < 0.01$) del 41.91 %, en los animales con tumores de mama inducidos por NMU, respecto a los controles (*Tabla R.5., Figura R.14.*). Por el contrario, la actividad específica de pirrolidón carboxipeptidasa unida a membrana no muestra ningún cambio significativo entre los animales controles y los animales con tumores mamarios inducidos por NMU.

La actividad específica de aspartato aminopeptidasa soluble muestra un descenso significativo ($p < 0.01$) del 49.59 % en los animales con tumores de mama inducidos por NMU respecto a los controles (*Tabla R.5., Figura R.15.*). Por el contrario, la actividad específica de aspartato aminopeptidasa unida a membrana muestra un incremento significativo ($p < 0.05$) del 106.67 % en los animales con tumores de mama inducidos por NMU respecto a los controles.

La actividad específica de glutamato aminopeptidasa soluble y de glutamato aminopeptidasa unida a membrana (*Tabla R.5., Figura R.16.*) no muestra cambios significativos en los animales con tumores de mama inducidos por NMU respecto a los controles.

La actividad específica de leucina aminopeptidasa soluble muestra un descenso significativo ($p < 0.001$) del 65.87 % en los animales con tumores de mama inducidos por NMU respecto a los controles. Sin embargo, la actividad específica de leucina

aminopeptidasa unida a membrana (*Tabla R.5., Figura R.17.*) muestra un aumento significativo ($p < 0.05$) del 33.8 % en los animales con tumores de mama inducidos por NMU respecto a los controles.

La actividad específica de tirosina aminopeptidasa soluble muestra un descenso significativo ($p < 0.01$) del 72.63 % en los animales con tumores de mama inducidos por NMU respecto a los controles. Por el contrario la actividad específica tirosina aminopeptidasa unida a membrana no muestra ningún cambio significativo (*Tabla R.5., Figura R.18.*) en los animales con tumores de mama inducidos por NMU respecto a los controles.

HIPOTÁLAMO					
SOLUBLE			UNIDA A MEMBRANA		
	Control	NMU		Control	NMU
APN	18.63 ± 2.16	6.32 ± 0.74	APN	5.32 ± 0.32	5.76 ± 0.50
APB	25.47 ± 4.33	6.94 ± 0.76	APB	6.09 ± 0.69	7.65 ± 0.63
OTasa	7.82 ± 0.76	4.03 ± 0.49	OTasa	5.04 ± 0.37	6.53 ± 0.77
Pcp	5.45 ± 0.69	3.16 ± 0.29	Pcp	5.081 ± 0.57	6.46 ± 0.64
AspAP	5.54 ± 0.95	3.29 ± 0.21	AspAP	2.78 ± 0.47	5.76 ± 1.03
GluAP	2.82 ± 0.60	2.23 ± 0.32	GluAP	4.11 ± 0.52	5.47 ± 0.73
LeuAP	21.38 ± 3.23	7.29 ± 0.83	LeuAP	5.55 ± 0.50	7.42 ± 0.68
TyrAP	10.01 ± 2.08	2.74 ± 0.44	TyrAP	2.95 ± 0.35	3.04 ± 0.48

Tabla R.5. Valores de actividades específicas solubles y unidas a membrana de aminopeptidasa N, aminopeptidasa B, oxitocinasa, pirrolidón carboxipeptidasa, glutamato aminopeptidasa, aspartato aminopeptidasa, leucina aminopeptidasa y tirosina aminopeptidasa del hipotálamo de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en nanomoles de la correspondiente aminoacil- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; n = 10)

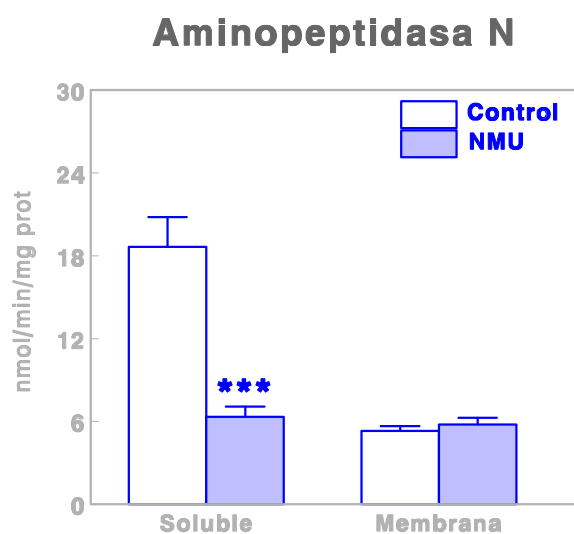


Figura R.11. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de aminopeptidasa N de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en nanomoles de alanina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; *** p <0.001; n = 10)

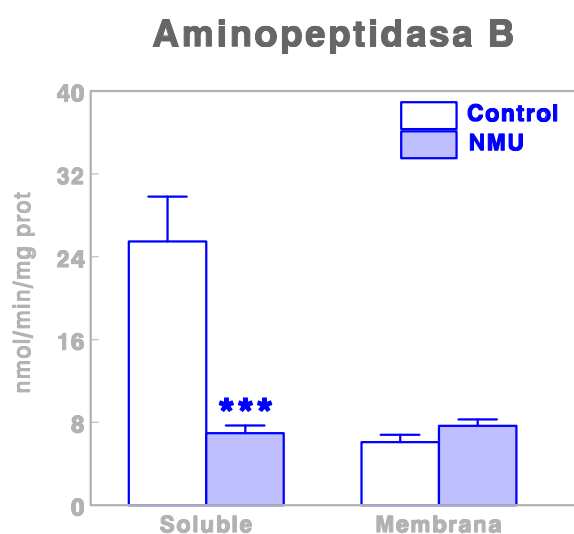


Figura R.12. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de aminopeptidasa B de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en nanomoles de arginina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; *** p <0.001; n = 10)

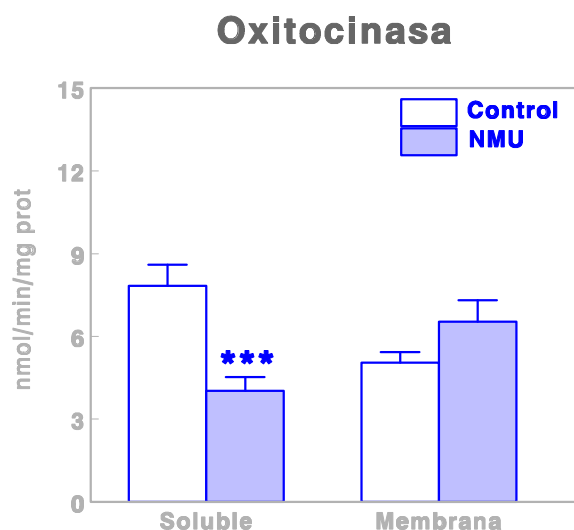


Figura R.13. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de oxitocinasa de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en nanomoles de cistina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; *** p <0.001; n = 10)

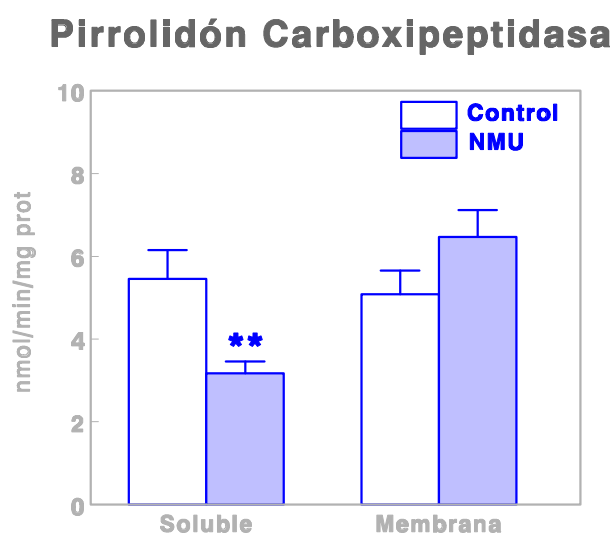


Figura R.14. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de pirrolidón carboxipeptidasa de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en nanomoles de piroglutamato- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; ** p <0.01; n = 10)

Aspartato Aminopeptidasa

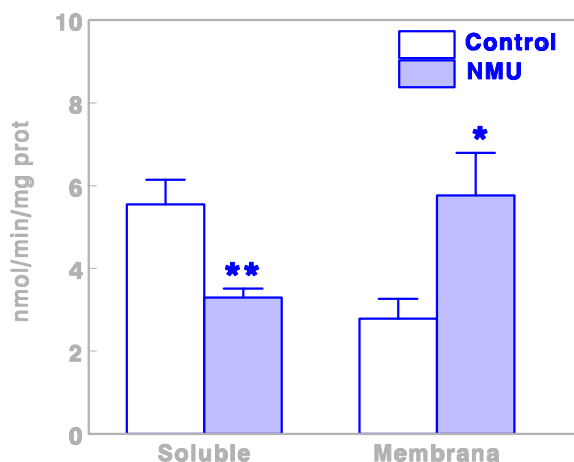


Figura R.15. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de aspartato aminopeptidasa de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en nanomoles de aspartato- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; $n = 10$)

Glutamato Aminopeptidasa

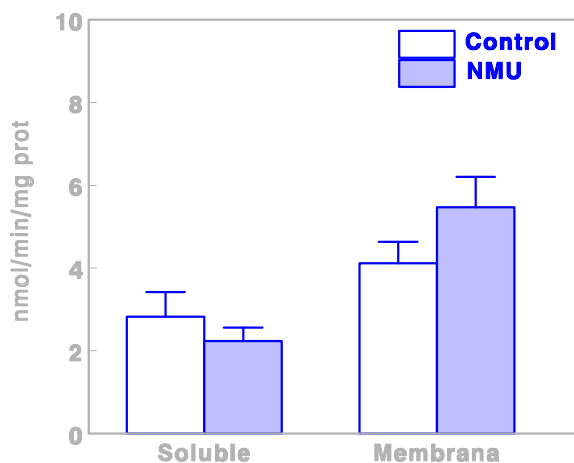


Figura R.16. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de glutamato aminopeptidasa de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en nanomoles de glutamato- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; $n = 10$)

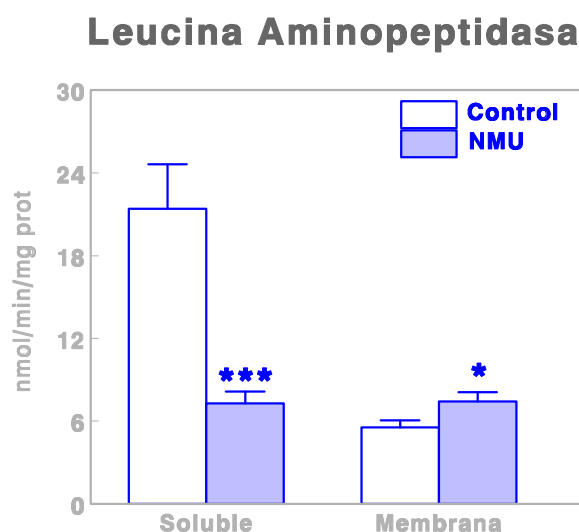


Figura R.17. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de leucina aminopeptidasa de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en nanomoles de leucina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; * p <0.05; *** p <0.001; $n = 10$)

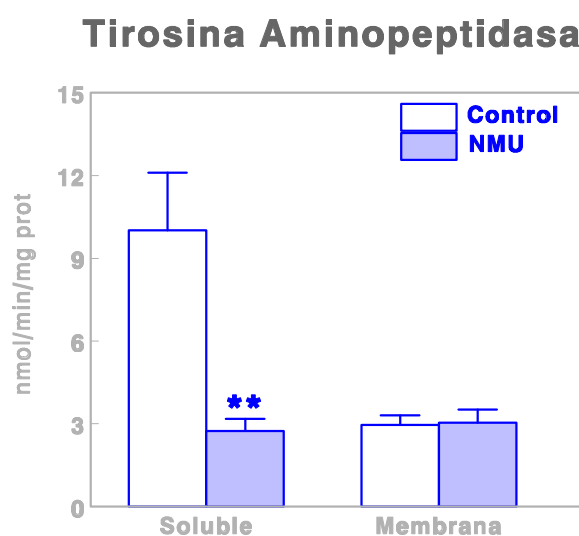


Figura R.18. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de tirosina aminopeptidasa de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en nanomoles de tirosina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; ** p <0.01; $n = 10$)

3.2. Actividad específica de aminopeptidasas solubles y unidas a membrana en la hipófisis anterior de animales controles y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea.

El análisis de la actividad específica de aminopeptidasas solubles y unidas a membrana en la hipófisis anterior de animales controles y con tumores de mama inducidos por la administración de NMU, muestra los siguientes resultados:

La actividad específica de aminopeptidasa N soluble muestra un descenso significativo ($p < 0.01$) del 20 % en los animales con tumores de mama inducidos por NMU respecto a los controles (*Tabla R.6., Figura R.19.*). Sin embargo, la actividad específica de aminopeptidasa N unida a membrana no muestra cambios significativos en los animales con tumores de mama inducidos por NMU respecto a los controles.

La actividad específica de aminopeptidasa B soluble muestra un descenso significativo ($p < 0.01$) del 17.45 % en los animales con tumores de mama inducidos por NMU respecto a los controles. Por el contrario, la actividad específica de aminopeptidasa B a membrana no muestra cambios significativos en los animales con tumores de mama respecto a los tumorales (*Tabla R.6., Figura R.20.*).

La actividad específica de oxitocinasa soluble y de oxitocinasa unida a membrana no muestra cambios significativos entre los animales con tumores de mama inducidos por NMU y los animales controles (*Tabla R.6., Figura R.21.*).

La actividad específica de pirrolidón carboxipeptidasa soluble y de pirrolidón carboxipeptidasa unida a membrana no muestra cambios significativos entre los animales con tumores de mama inducidos por NMU y los animales controles (*Tabla R.6., Figura R.22.*).

La actividad específica de aspartato aminopeptidasa soluble y de aspartato aminopeptidasa unida a membrana no muestra cambios significativos entre los animales con tumores de mama inducidos por NMU y los animales controles (*Tabla R.6., Figura R.23.*).

La actividad específica de glutamato aminopeptidasa soluble y de glutamato aminopeptidasa unida a membrana no muestra cambios significativos entre los animales con tumores de mama inducidos por NMU y los animales controles (*Tabla R.6., Figura R.24.*).

La actividad específica de leucina aminopeptidasa soluble muestra un descenso significativo ($p < 0.01$) del 22.26 % en los animales con tumores de mama inducidos por NMU respecto a los controles (*Tabla R.6., Figura R.25.*). Por el contrario, la actividad específica leucina aminopeptidasa unida a membrana no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU.

La actividad específica de tirosina aminopeptidasa soluble muestra un descenso significativo ($p < 0.01$) del 29.18 % en los animales con tumores mamarios inducidos por

NMU respecto a los controles (*Tabla R.6., Figura R.26.*). Sin embargo, la actividad específica tirosina aminopeptidasa unida a membrana no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU.

HIPÓFISIS ANTERIOR					
SOLUBLE			UNIDA A MEMBRANA		
	Control	NMU		Control	NMU
APN	11.12 ± 0.49	8.92 ± 0.31	APN	4.47 ± 0.22	5.73 ± 0.7
APB	18.30 ± 0.56	15.11 ± 0.74	APB	6.33 ± 0.36	6.32 ± 0.71
OTasa	4.95 ± 0.37	3.81 ± 0.41	OTasa	2.37 ± 0.20	3.28 ± 0.60
Pcp	2.03 ± 0.11	2.28 ± 0.18	Pcp	0.93 ± 0.14	0.94 ± 0.25
AspAP	2.40 ± 0.14	2.77 ± 0.23	AspAP	1.38 ± 0.19	1.41 ± 0.34
GluAP	3.09 ± 0.17	3.23 ± 0.24	GluAP	2.90 ± 0.3	3.18 ± 0.52
LeuAP	8.25 ± 0.43	6.41 ± 0.13	LeuAP	2.87 ± 0.14	3.44 ± 0.43
TyrAP	10.14 ± 0.63	7.18 ± 0.47	TyrAP	2.19 ± 0.18	2.73 ± 0.48

Tabla R.6. Valores de actividades específicas solubles y unidas a membrana de aminopeptidasa N, aminopeptidasa B, oxitocinasa, pirrolidón carboxipeptidasa, glutamato aminopeptidasa, aspartato aminopeptidasa, leucina aminopeptidasa y tirosina aminopeptidasa de la hipófisis anterior de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en nanomoles de la correspondiente aminoacil- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; n = 10)

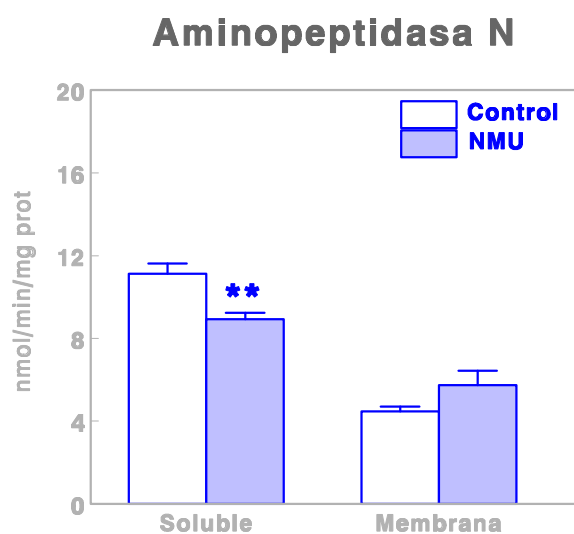


Figura R.19. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de aminopeptidasa N de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en nanomoles de alanina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; ** $p < 0.01$; $n = 10$)

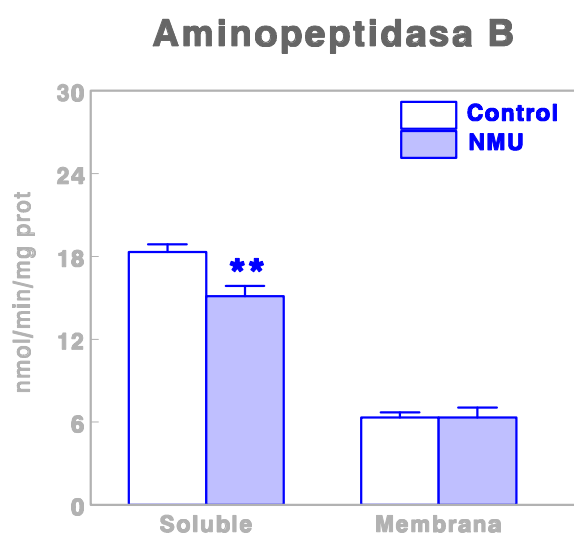


Figura R.20. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de aminopeptidasa B de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en nanomoles de arginina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; ** $p < 0.01$; $n = 10$)

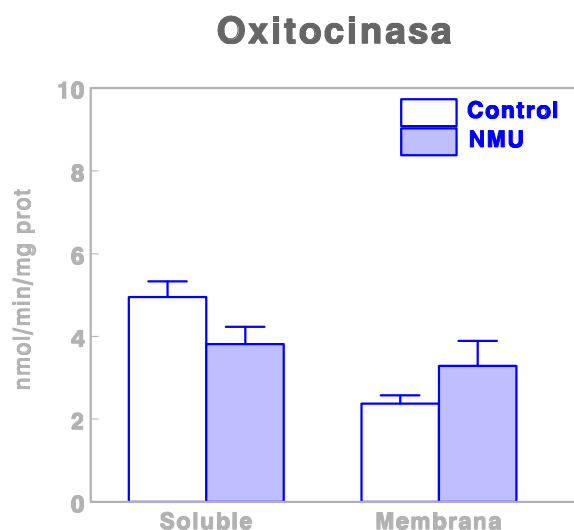


Figura R.21. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de oxitocinasa de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en nanomoles de cistina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; n = 10)

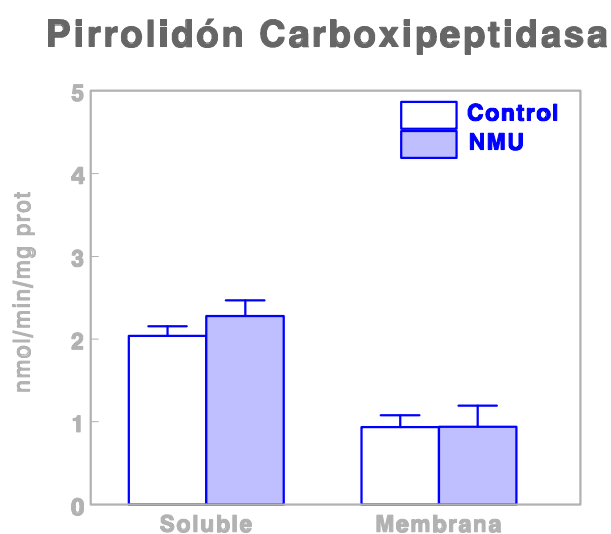


Figura R.22. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de pirrolidón carboxipeptidasa de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en nanomoles de piroglutamato- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; n = 10)

Aspartato Aminopeptidasa

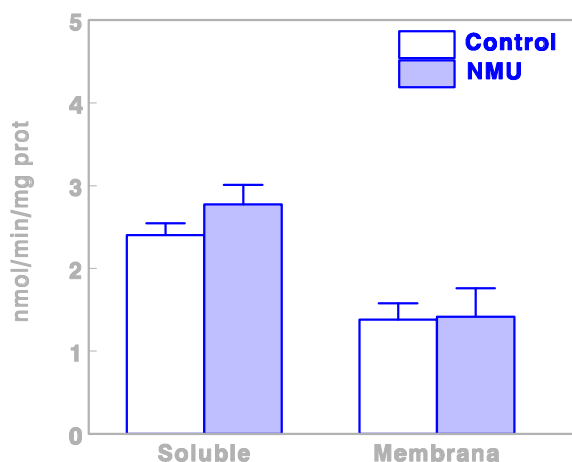


Figura R.23. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de aspartato aminopeptidasa de ratas control y con tumores de mama inducidos por *N*-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en nanomoles de aspartato- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; n = 10)

Glutamato Aminopeptidasa

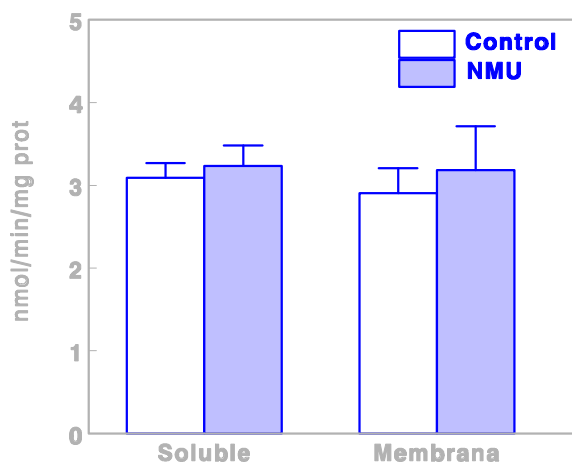


Figura R.24. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de glutamato aminopeptidasa de ratas control y con tumores de mama inducidos por *N*-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en nanomoles de glutamato- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; n = 10)

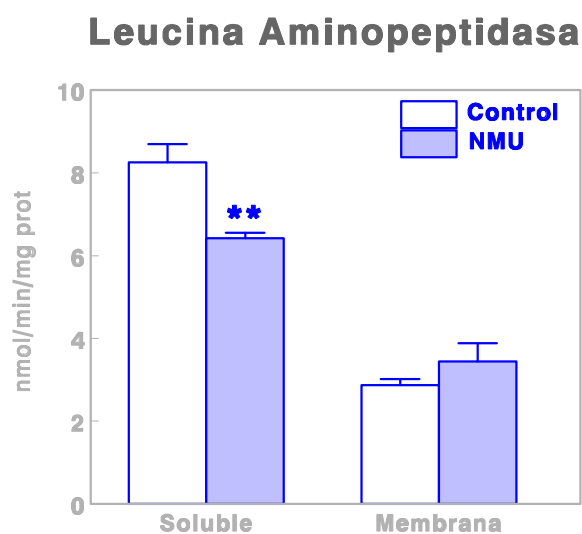


Figura R.25. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de leucina aminopeptidasa de ratas control y con tumores de mama inducidos por *N*-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en nanomoles de leucina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; ** $p < 0.01$; $n = 10$)

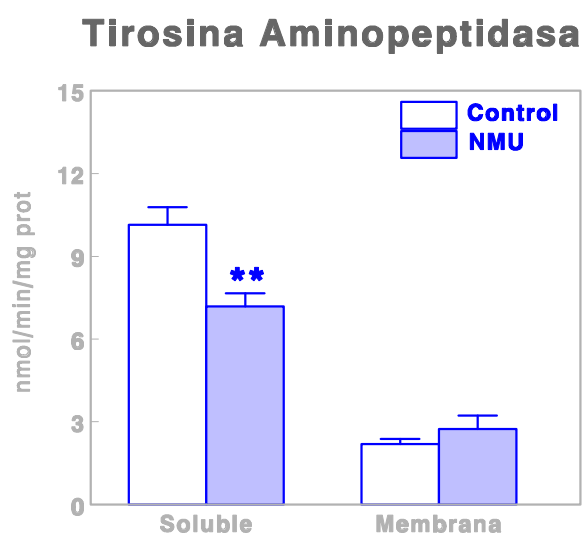


Figura R.26. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de tirosina aminopeptidasa de ratas control y con tumores de mama inducidos por *N*-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en nanomoles de tirosina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; ** $p < 0.01$; $n = 10$)

3.3. Actividad específica de aminopeptidasas solubles y unidas a membrana en la hipófisis posterior de animales controles y con tumores de mama inducidos por N-nitil nitrosoarea.

El análisis de la actividad específica de aminopeptidasas solubles y unidas a membrana en la hipófisis posterior de animales controles y con tumores de mama inducidos por la administración de NMU, muestra los siguientes resultados:

La actividad específica de aminopeptidasa N soluble no muestra cambios significativos (*Tabla R.7., Figura R.27.*) entre los animales control y los animales con tumores de mama inducidos por NMU. Sin embargo, la actividad específica de aminopeptidasa N unida a membrana muestra un descenso significativo ($p < 0.05$) del 58.35 % en los animales con tumores de mama inducidos por NMU respecto a los controles.

La actividad específica de aminopeptidasa B soluble y de aminopeptidasa B unida a membrana no muestra cambios significativos entre los animales control y los animales con tumores de mama inducidos por NMU (*Tabla R.7., Figura R.28.*).

La actividad específica de oxitocinasa soluble y de oxitocinasa unida a membrana no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU (*Tabla R.7., Figura R.29.*).

La actividad específica de pirrolidón carboxipeptidasa soluble y de pirrolidón carboxipeptidasa unida a membrana no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU (*Tabla R.7., Figura R.30.*).

La actividad específica de aspartato aminopeptidasa soluble y de aspartato aminopeptidasa unida a membrana no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU (*Tabla R.7., Figura R.31.*).

La actividad específica de glutamato aminopeptidasa soluble y de glutamato aminopeptidasa unida a membrana no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU (*Tabla R.7., Figura R.32.*).

La actividad específica de leucina aminopeptidasa soluble y de leucina aminopeptidasa unida a membrana no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU (*Tabla R.7., Figura R.33.*).

La actividad específica de tirosina aminopeptidasa soluble y de tirosina aminopeptidasa unida a membrana no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU (*Tabla R.7., Figura R.34.*).

HIPÓFISIS POSTERIOR					
SOLUBLE			UNIDA A MEMBRANA		
	Control	NMU		Control	NMU
APN	2.92 ± 0.37	2.35 ± 0.16	APN	1.49 ± 0.26	0.62 ± 0.22
APB	2.94 ± 0.32	3.14 ± 0.19	APB	1.50 ± 0.41	1.10 ± 0.23
OTasa	1.47 ± 0.16	1.70 ± 0.11	OTasa	1.82 ± 0.28	1.56 ± 0.24
Pcp	0.98 ± 0.11	1.18 ± 0.14	Pcp	0.94 ± 0.22	0.93 ± 0.17
AspAP	1.05 ± 0.15	1.17 ± 0.16	AspAP	1.13 ± 0.40	1.52 ± 0.35
GluAP	1.2 ± 0.19	1.30 ± 0.2	GluAP	1.15 ± 0.18	0.78 ± 0.12
LeuAP	2.93 ± 0.35	2.62 ± 0.2	LeuAP	2.97 ± 0.51	2.25 ± 0.38
TyrAP	3.56 ± 0.48	2.84 ± 0.33	TyrAP	4.82 ± 0.89	2.76 ± 0.33

Tabla R.7. Valores de actividades específicas solubles y unidas a membrana de aminopeptidasa N, aminopeptidasa B, oxitocinasa, pirrolidón carboxipeptidasa, glutamato aminopeptidasa, aspartato aminopeptidasa, leucina aminopeptidasa y tirosina aminopeptidasa de la hipófisis posterior de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en nanomoles de la correspondiente aminoacil-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media ± SEM; n = 10)

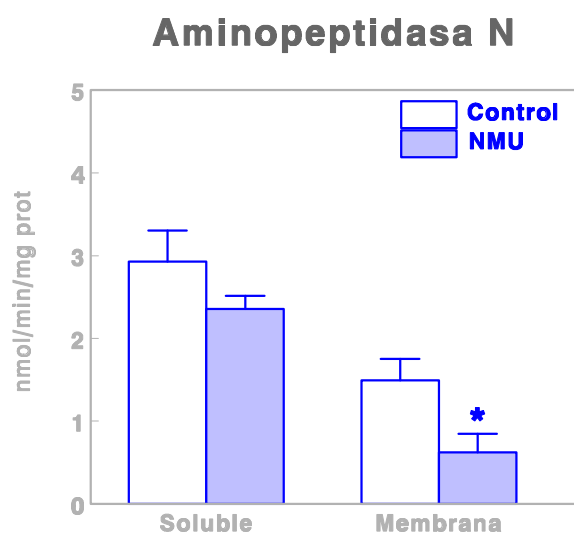


Figura R.27. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de aminopeptidasa N de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en nanomoles de alanina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; * $p < 0.05$; $n = 10$)

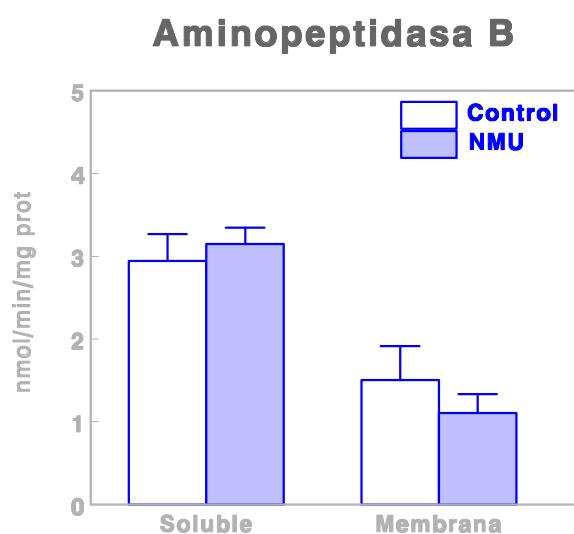


Figura R.28. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de aminopeptidasa B de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en nanomoles de arginina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; $n = 10$)

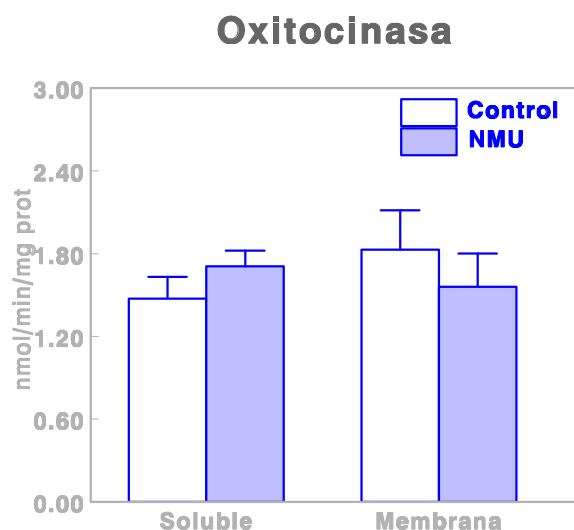


Figura R.29. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de oxitocinasa de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en nanomoles de cistina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; n = 10)

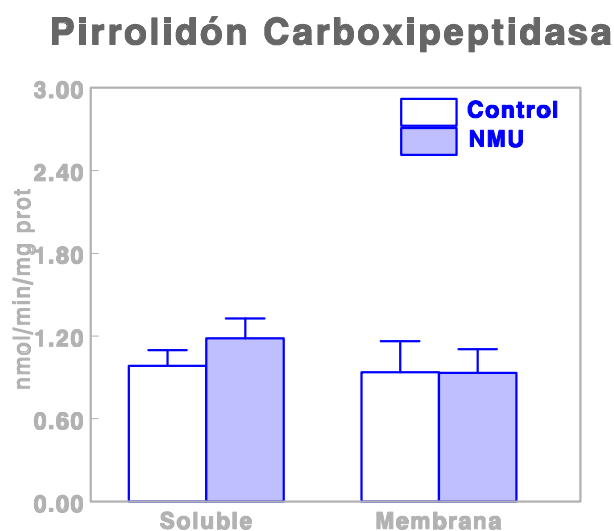


Figura R.30. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de pirrolidón carboxipeptidasa de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en nanomoles de piroglutamato- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; n = 10)

Aspartato Aminopeptidasa

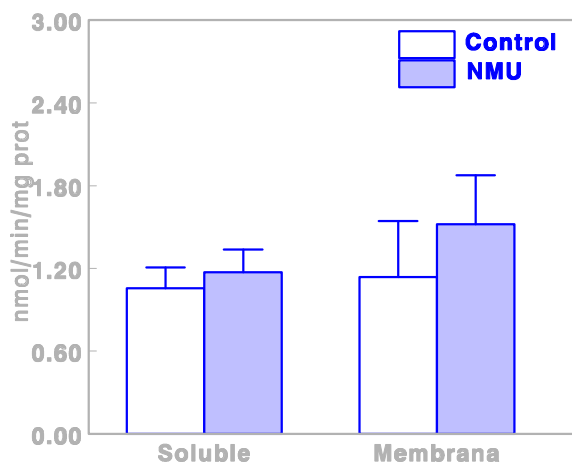


Figura R.31. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de aspartato aminopeptidasa de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en nanomoles de aspartato- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; n = 10)

Glutamato Aminopeptidasa

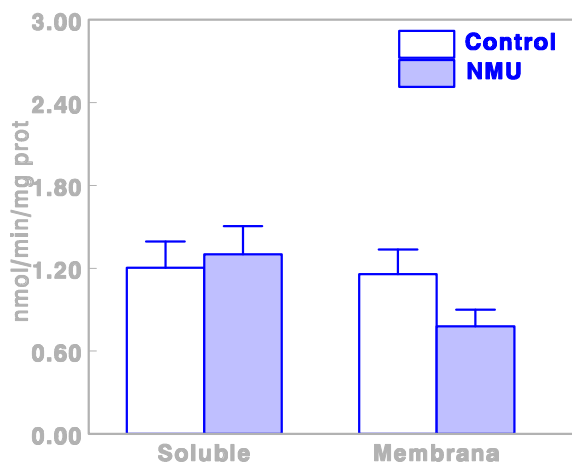


Figura R.32. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de glutamato aminopeptidasa de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en nanomoles de glutamato- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; n = 10)

Leucina Aminopeptidasa

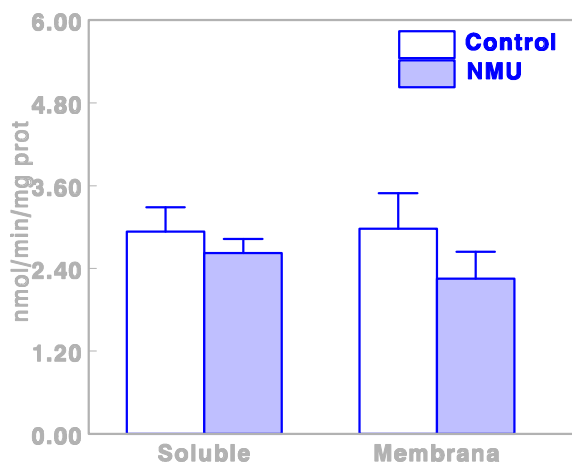


Figura R.33. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de leucina aminopeptidasa de ratas control y con tumores de mama inducidos por *N*-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en nanomoles de leucina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; n = 10)

Tirosina Aminopeptidasa

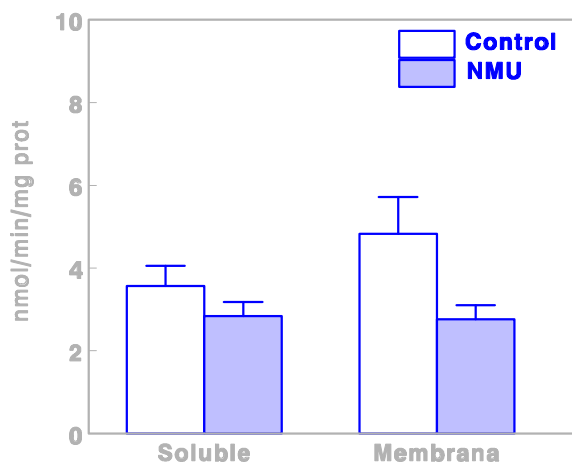


Figura R.34. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de tirosina aminopeptidasa de ratas control y con tumores de mama inducidos por *N*-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en nanomoles de tirosina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; n = 10)

3.4. Actividad específica de aminopeptidasas solubles en la glándula pineal de animales controles y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea.

El análisis de la actividad específica de aminopeptidasas solubles en la glándula pineal de animales controles y con tumores de mama inducidos por la administración de NMU, muestra los siguientes resultados:

La actividad específica de aminopeptidasa N soluble (*Tabla R.8., Figura R.35.*) no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU.

La actividad específica de aminopeptidasa B soluble (*Tabla R.8., Figura R.36.*) no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU.

La actividad específica de oxitocinasa soluble muestra un descenso significativo ($p < 0.05$) del 46.33 % en los animales con tumores de mama inducidos por NMU respecto a los controles (*Tabla R.8., Figura R.37.*).

La actividad específica de pirrolidón carboxipeptidasa soluble (*Tabla R.8., Figura R.38.*) no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU.

La actividad específica de aspartato aminopeptidasa soluble muestra un descenso significativo ($p < 0.01$) del 79 % en los animales con tumores de mama inducidos por NMU respecto a los controles (*Tabla R.8., Figura R.39.*).

La actividad específica de glutamato aminopeptidasa soluble (*Tabla R.8., Figura R.40.*) no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU.

La actividad específica de leucina aminopeptidasa soluble (*Tabla R.8., Figura R.41.*) no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU.

La actividad específica de tirosina aminopeptidasa soluble (*Tabla R.8., Figura R.42.*) no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU.

Las actividades específicas de aminopeptidasa N, aminopeptidasa B, oxitocinasa, aspartato aminopeptidasa, glutamato aminopeptidasa, pirrolidón carboxipeptidasa, leucina aminopeptidasa y tirosina aminopeptidasa unidas a membrana no fueron detectadas por el método fluorimétrico empleado.

GLÁNDULA PINEAL		
SOLUBLE		
	Control	NMU
Aminopeptidasa N	4.15 ± 0.33	3.32 ± 0.45
Aminopeptidasa B	5.11 ± 0.46	3.90 ± 0.66
Oxitocinasa	3.60 ± 0.3	1.93 ± 0.59
Pirrolidón Carboxipeptidasa	1.31 ± 0.17	2.05 ± 0.52
Aspartato Aminopeptidasa	1.51 ± 0.28	0.31 ± 0.15
Glutamato Aminopeptidasa	1.59 ± 0.27	1.3 ± 0.2
Leucina Aminopeptidasa	5.02 ± 0.36	4.12 ± 0.23
Tirosina Aminopeptidasa	3.59 ± 0.43	3.19 ± 1.20

Tabla R.8. Valores de actividades específicas solubles de aminopeptidasa N, aminopeptidasa B, oxitocinasa, pirrolidón carboxipeptidasa, glutamato aminopeptidasa, aspartato aminopeptidasa, leucina aminopeptidasa y tirosina aminopeptidasa de la glándula pineal de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en nanomoles de la correspondiente aminoácil-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media ± SEM; n = 7)

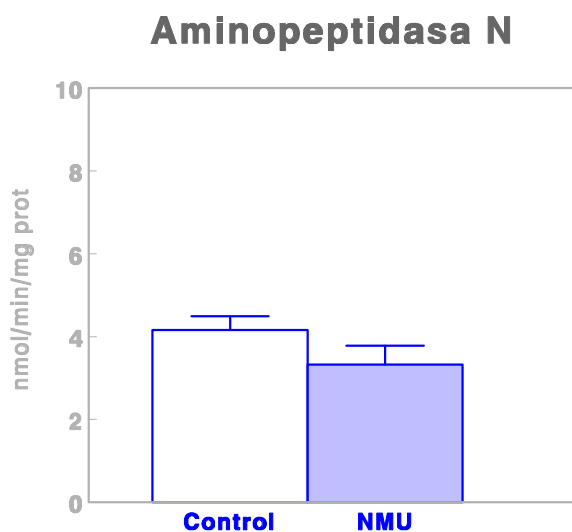


Figura R.35. Representación de los valores de actividad específica soluble de aminopeptidasa N de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en nanomoles de alanina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; n = 7)

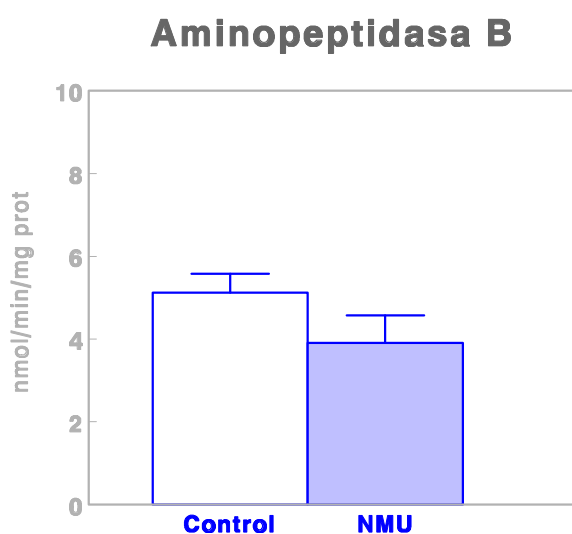


Figura R.36. Representación de los valores de actividad específica soluble de aminopeptidasa B de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en nanomoles de arginina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; n = 7)

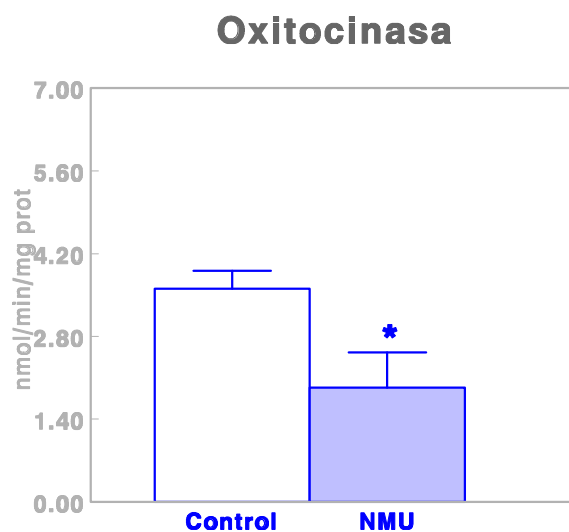


Figura R.37. Representación de los valores de actividad específica soluble de oxitocinasa de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en nanomoles de cistina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; * $p < 0.05$; $n = 7$)

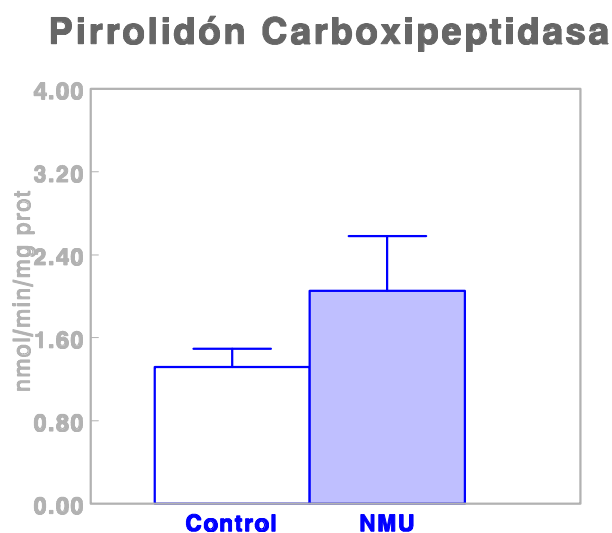


Figura R.38. Representación de los valores de actividad específica soluble de pirrolidón carboxipeptidasa de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en nanomoles de piroglutamato- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; $n = 7$)

Aspartato Aminopeptidasa

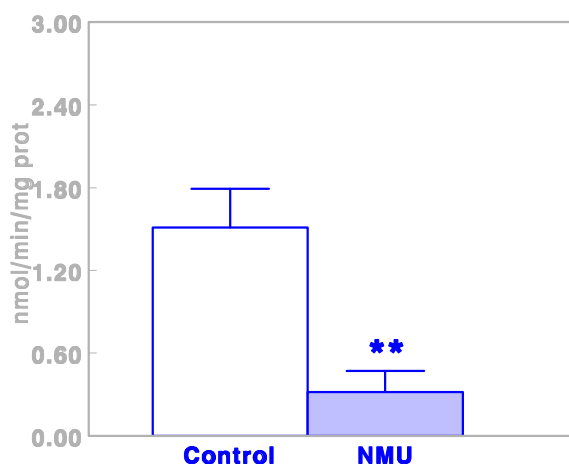


Figura R.39. Representación de los valores de actividad específica soluble de aspartato aminopeptidasa de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en nanomoles de aspartato- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; n = 7)

Glutamato Aminopeptidasa

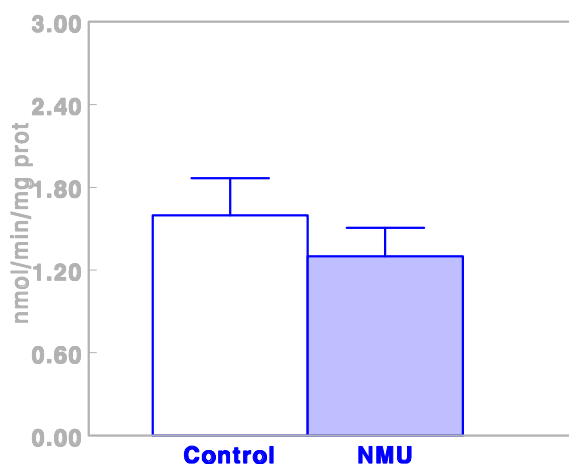


Figura R.40. Representación de los valores de actividad específica soluble de glutamato aminopeptidasa de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en nanomoles de glutamato- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; n = 7)

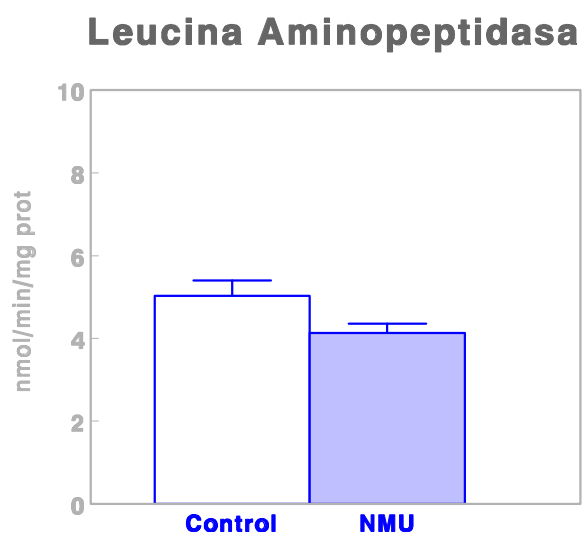


Figura R.41. Representación de los valores de actividad específica soluble de leucina aminopeptidasa de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en nanomoles de leucina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; n = 7)

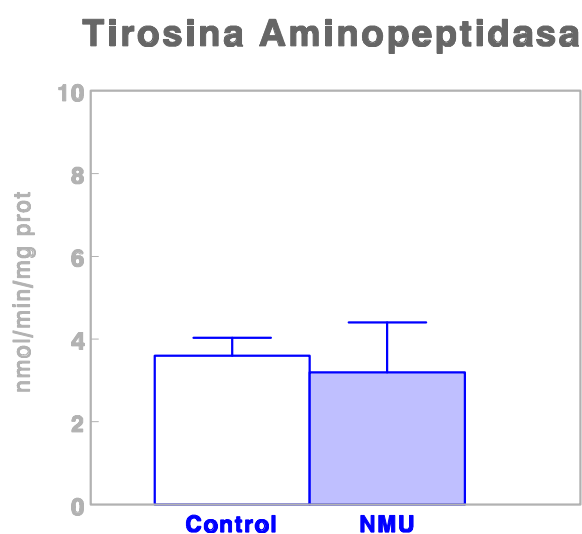


Figura R.42. Representación de los valores de actividad específica soluble de tirosina aminopeptidasa de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en nanomoles de tirosina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; n = 7)

3.5. Actividad específica de aminopeptidasas solubles y unidas a membrana en la glándula mamaria de animales controles y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea.

El análisis de la actividad específica de aminopeptidasas solubles y unidas a membrana en la glándula mamaria de animales controles y con tumores de mama inducidos por la administración de NMU, muestra los siguientes resultados:

La actividad específica de aminopeptidasa N soluble muestra un descenso significativo ($p < 0.05$) del 32.09 % en los animales con tumores de mama inducidos por NMU respecto a los controles (*Tabla R.9., Figura R.43.*). Sin embargo, la actividad específica de aminopeptidasa N unida a membrana no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores mamarios inducidos por NMU.

La actividad específica de aminopeptidasa B soluble muestra un descenso significativo ($p < 0.001$) del 48.45 % en los animales con tumores de mama inducidos por NMU (*Tabla R.9., Figura R.44.*) respecto a los controles. Por el contrario, la actividad específica de aminopeptidasa B unida a membrana no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU.

La actividad específica de oxitocinasa soluble y de oxitocinasa unida a membrana (*Tabla R.9., Figura R.45.*), no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU.

La actividad específica de pirrolidón carboxipeptidasa soluble muestra un incremento significativo ($p < 0.001$) del 1882.7 % en los animales con tumores de mama inducidos por NMU respecto a los controles. Del mismo modo, la actividad específica de pirrolidón carboxipeptidasa unida a membrana muestra un aumento significativo ($p < 0.05$) del 125.24 % en los animales con tumores de mama inducidos por NMU respecto a los controles (*Tabla R.9., Figura R.46.*).

La actividad específica de aspartato aminopeptidasa soluble muestra un incremento significativo ($p < 0.001$) del 1132.58 % en los animales con tumores de mama inducidos por NMU respecto a los controles. Del mismo modo, la actividad específica de aspartato aminopeptidasa unida a membrana muestra un aumento significativo ($p < 0.01$) del 137 % en los animales con tumores de mama inducidos por NMU respecto a los controles (*Tabla R.9., Figura R.47.*).

La actividad específica de glutamato aminopeptidasa (*Tabla R.9., Figura R.48.*) soluble no muestra cambios significativos entre los animales control y los animales con tumores de mama inducidos por NMU. Sin embargo, la actividad específica de glutamato aminopeptidasa unida a membrana muestra un incremento significativo ($p < 0.01$) del 136.7 % en los animales con tumores de mama inducidos por NMU respecto a los controles.

La actividad específica de leucina aminopeptidasa soluble muestra un descenso significativo ($p < 0.001$) del 42.81 % en los animales con tumores de mama inducidos por NMU respecto a los controles (*Tabla R.9., Figura R.49.*). Por el contrario, la actividad específica leucina aminopeptidasa unida a membrana no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU.

La actividad específica de tirosina aminopeptidasa soluble muestra un descenso significativo ($p < 0.001$) del 35.93 % en los animales con tumores de mama inducidos NMU respecto a los controles. Sin embargo, la actividad específica tirosina aminopeptidasa unida a membrana no muestra cambios significativos entre los animales controles y tumorales (*Tabla R.9., Figura R.50.*).

GLÁNDULA MAMARIA					
SOLUBLE			UNIDA A MEMBRANA		
	Control	NMU		Control	NMU
APN	560.03 ± 55.4	380.28 ± 35.7	APN	771.29 ± 213.7	712.02 ± 58.2
APB	1037.2 ± 70.7	534.58 ± 54.1	APB	853.02 ± 210.6	916.53 ± 86.7
OTasa	349.98 ± 60.3	479 ± 100.3	OTasa	648.21 ± 215.2	612.14 ± 63.0
Pcp	33.17 ± 8	657.69 ± 64.2	Pcp	339.94 ± 155.3	765.71 ± 83.2
AspAP	32.16 ± 1.8	396.41 ± 27.5	AspAP	197.2 ± 114.5	467.39 ± 30.4
GluAP	82.52 ± 22.2	73.55 ± 11.9	GluAP	295.95 ± 48.7	700.73 ± 84.0
LeuAP	833.75 ± 82.8	476.78 ± 37.2	LeuAP	950.96 ± 340.1	850.41 ± 82.7
TyrAP	820.85 ± 46.9	525.83 ± 34.8	TyrAP	762.75 ± 83.2	627.73 ± 66.2

Tabla R.9. Valores de actividades específicas solubles de aminopeptidasa N, aminopeptidasa B, oxitocinasa, pirrolidón carboxipeptidasa, glutamato aminopeptidasa, aspartato aminopeptidasa, leucina aminopeptidasa y tirosina aminopeptidasa de la glándula mamaria de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en picomoles de la correspondiente aminoacil-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media ± SEM; n = 10)

Aminopeptidasa N

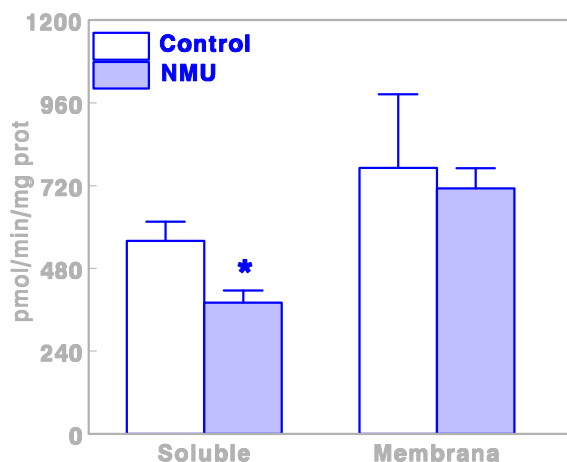


Figura R.43. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de aminopeptidasa N de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en picomoles de alanina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; * $p < 0.05$; $n = 10$)

Aminopeptidasa B

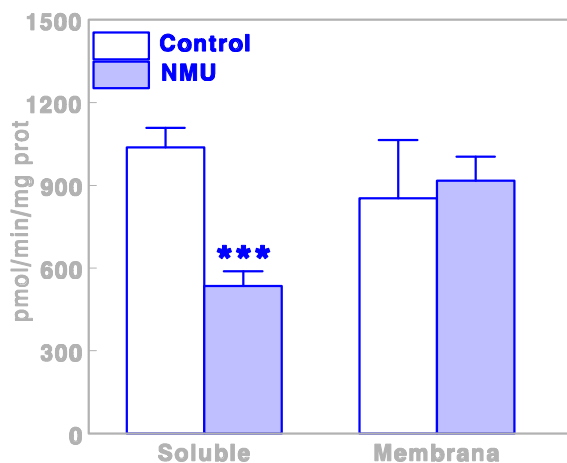


Figura R.44. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de aminopeptidasa B de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en picomoles de arginina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; *** $p < 0.001$; $n = 10$)

Oxitocinasa

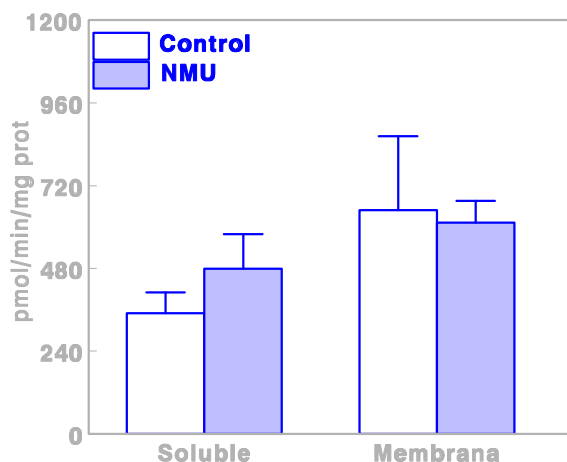


Figura R.45. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de oxitocinasa de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en picomoles de cistina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; n = 10)

Pirrolidón Carboxipeptidasa

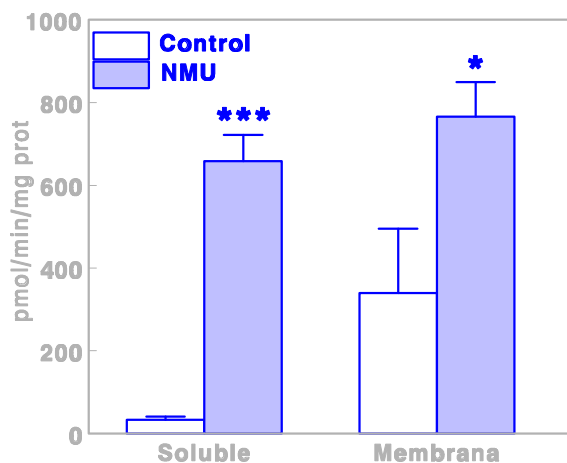


Figura R.46. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de pirrolidón carboxipeptidasa de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en picomoles de piroglutamato- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; * p <0.05; *** p <0.001; n = 10)

Aspartato Aminopeptidasa

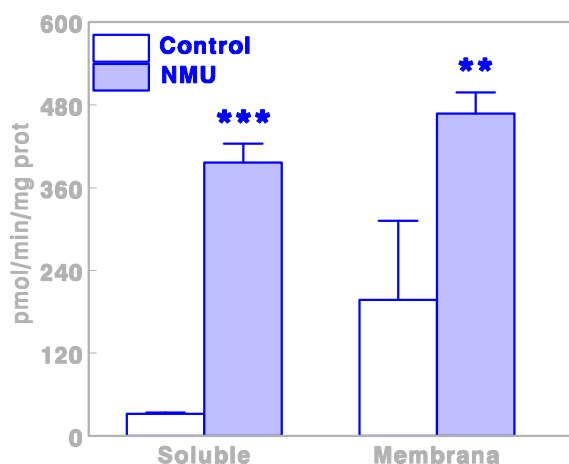


Figura R.47. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de aspartato aminopeptidasa de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en picomoles de aspartato- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; $n = 10$)

Glutamato Aminopeptidasa

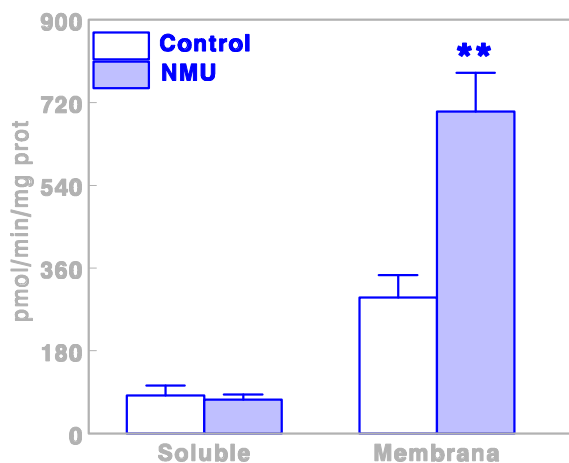


Figura R.48. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de glutamato aminopeptidasa de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en picomoles de glutamato- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; $n = 10$)

Leucina Aminopeptidasa

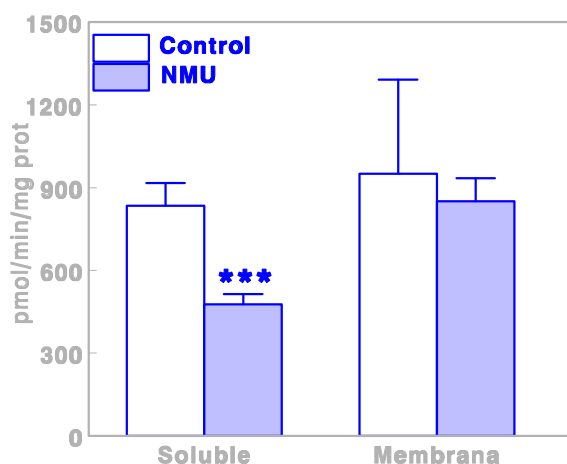


Figura R.49. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de leucina aminopeptidasa de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en picomoles de leucina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; *** p <0.001; n = 10)

Tirosina Aminopeptidasa

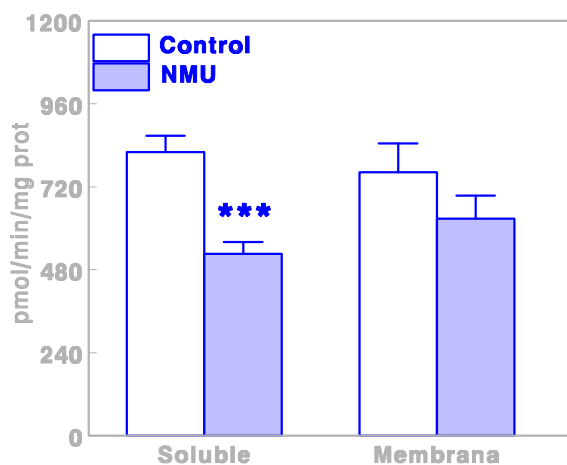


Figura R.50. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de tirosina aminopeptidasa de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en picomoles de tirosina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; *** p <0.001; n = 10)

3.6. Actividad específica de aminopeptidasas solubles y unidas a membrana en el tiroides de animales controles y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea.

El análisis de la actividad específica de aminopeptidasas solubles y unidas a membrana en la glándula mamaria de animales controles y con tumores de mama inducidos por la administración de NMU, muestra los siguientes resultados:

La actividad específica de aminopeptidasa N soluble muestra un descenso significativo ($p < 0.001$) del 39.32 % en los animales con tumores mamarios inducidos por NMU respecto a los controles. Por el contrario, la actividad específica de aminopeptidasa N unida a membrana no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU (*Tabla R.10., Figura R.51.*).

La actividad específica de aminopeptidasa B soluble no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU (*Tabla R.7., Figura R.25.*). Del mismo modo, la actividad específica de aminopeptidasa B unida a membrana no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU (*Tabla R.10., Figura R.52.*).

La actividad específica de oxitocinasa soluble muestra un descenso significativo ($p < 0.01$) del 50.55 % en los animales con tumores de mama inducidos con NMU respecto a los controles (*Tabla R.10., Figura R.53.*). Sin embargo, la actividad específica de oxitocinasa unida a membrana no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU.

La actividad específica de pirrolidón carboxipeptidasa soluble no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU. Del mismo modo, la actividad específica de pirrolidón carboxipeptidasa unida a membrana no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU (*Tabla R.10., Figura R.54.*).

La actividad específica de aspartato aminopeptidasa soluble muestra un incremento significativo ($p < 0.05$) del 65.63 % en los animales con tumores de mama inducidos por NMU respecto a los controles. Sin embargo, la actividad específica de aspartato aminopeptidasa unida a membrana no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU (*Tabla R.10., Figura R.55.*).

La actividad específica de glutamato aminopeptidasa soluble y la actividad específica de glutamato aminopeptidasa unida a membrana no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU (*Tabla R.10., Figura R.56.*).

La actividad específica de leucina aminopeptidasa soluble y la actividad específica de leucina aminopeptidasa unida a membrana no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU (*Tabla R.10., Figura R.57.*).

La actividad específica de tirosina aminopeptidasa soluble muestra un descenso significativo ($p < 0.01$) del 22.81 % en los animales con tumores de mama inducidos por NMU

(Tabla R.7., Figura R.28.) respecto a los controles. Por el contrario la actividad específica de tirosina aminopeptidasa unida a membrana no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU (Tabla R.10., Figura R.58.).

TIROIDES					
SOLUBLE			UNIDA A MEMBRANA		
	Control	NMU		Control	NMU
APN	485.96 ± 27.7	294.87 ± 32.2	APN	246.4 ± 19.9	275.36 ± 37.2
APB	689.28 ± 45.1	76.83 ± 33.0	APB	315.99 ± 35.2	306.17 ± 35.8
Pcp	47.33 ± 5.9	48.38 ± 5.7	Pcp	41.29 ± 6.8	44.40 ± 7.1
OTasa	411.46 ± 41.4	203.46 ± 33.4	OTasa	64.54 ± 10.9	57.21 ± 10.6
AspAP	25.11 ± 4.5	41.59 ± 5.4	AspAP	41.25 ± 7.0	108.90 ± 65.4
GluAP	22.97 ± 3.8	26.99 ± 3.5	GluAP	61.56 ± 7.2	64.83 ± 19.4
LeuAP	740.69 ± 44.1	626.82 ± 45.1	LeuAP	459.79 ± 41.0	533.25 ± 60.5
TyrAP	565.42 ± 29.6	436.43 ± 21.1	TyrAP	229.52 ± 25.2	269.4 ± 38.1

Tabla R.10. Valores de actividades específicas solubles de aminopeptidasa N, aminopeptidasa B, oxitocinasa, pirrolidón carboxipeptidasa, glutamato aminopeptidasa, aspartato aminopeptidasa, leucina aminopeptidasa y tirosina aminopeptidasa del tiroides de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en picomoles de la correspondiente aminoacil-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media ± SEM; n = 10).

Aminopeptidasa N

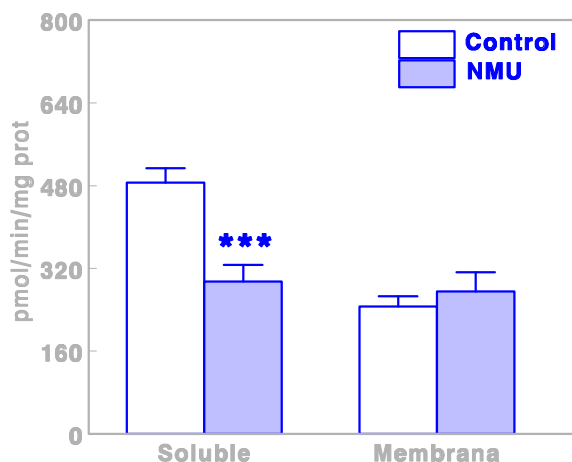


Figura R.51. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de aminopeptidasa N de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en picomoles de alanina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; *** p <0.001; n = 10)

Aminopeptidasa B

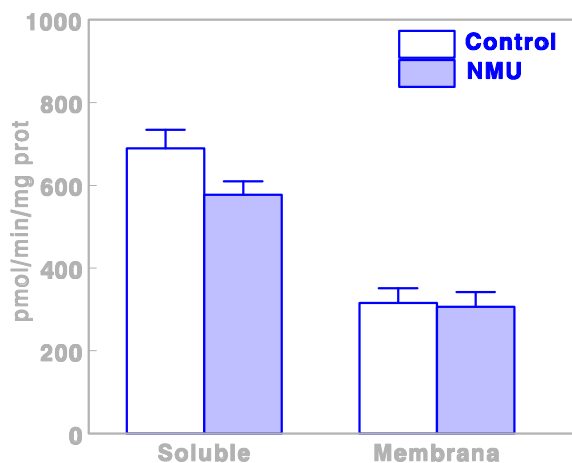


Figura R.52. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de aminopeptidasa B de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en picomoles de arginina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; n = 10)

Oxitocinasa

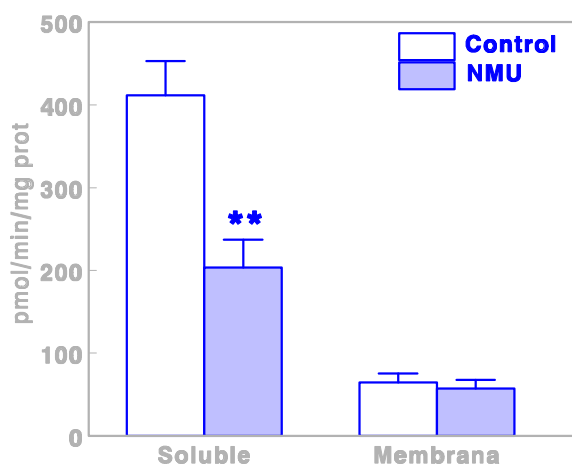


Figura R.53. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de oxitocinasa de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en picomoles de cistina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; ** $p < 0.01$; $n = 10$)

Pirrolidón Carboxipeptidasa

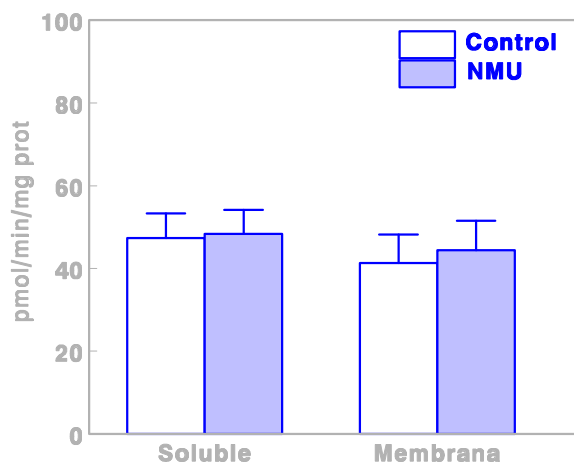


Figura R.54. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de pirrolidón carboxipeptidasa de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en picomoles de piroglutamato- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; $n = 10$)

Aspartato Aminopeptidasa

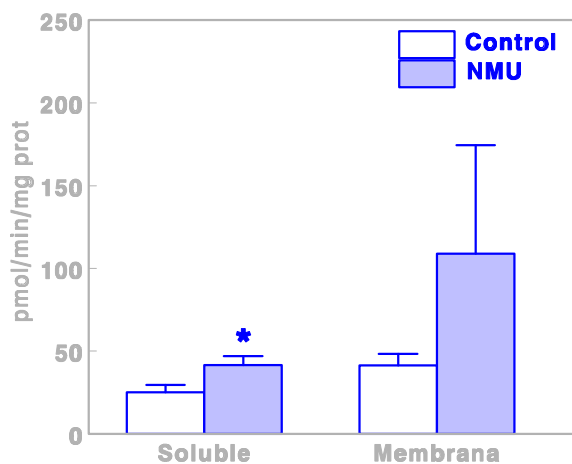


Figura R.55. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de aspartato aminopeptidasa de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en picomoles de aspartato- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; * $p < 0.05$; $n = 10$)

Glutamato Aminopeptidasa

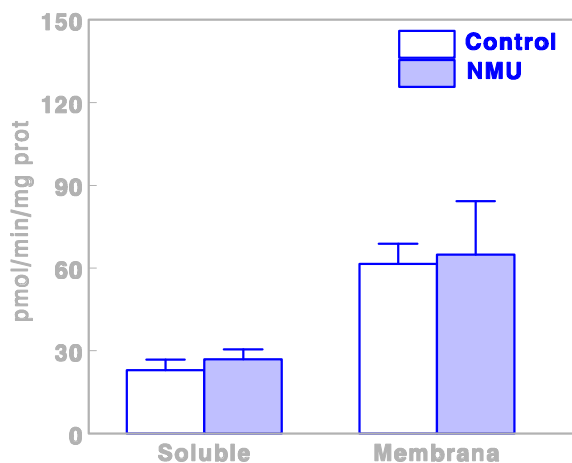


Figura R.56. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de glutamato aminopeptidasa de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en picomoles de glutamato- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; $n = 10$)

Leucina Aminopeptidasa

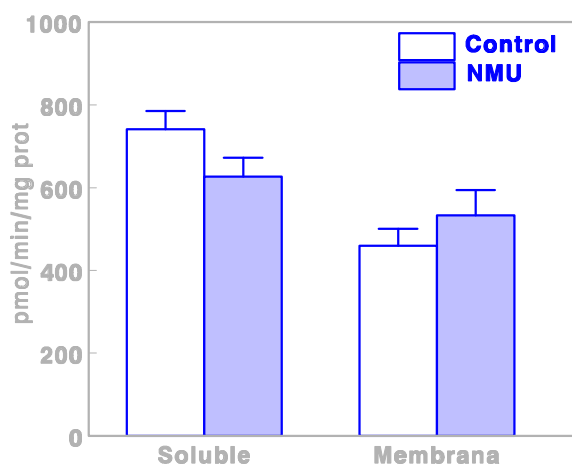


Figura R.57. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de leucina amino peptidasa de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en picomoles de leucina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; n = 10)

Tirosina Aminopeptidasa

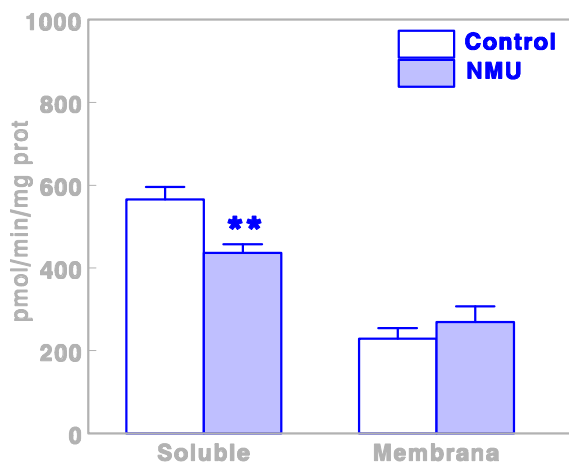


Figura R.58. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de tirosina amino peptidasa de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en picomoles de tirosina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; **p<0.01; n = 10)

3.7. Actividad específica de aminopeptidasas solubles y unidas a membrana en la glándula adrenal (corteza y médula) de animales controles y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea.

El análisis de la actividad específica de aminopeptidasas solubles y unidas a membrana en la corteza adrenal de animales controles y con tumores de mama inducidos por la administración de NMU, muestra los siguientes resultados:

La actividad específica de aminopeptidasa N soluble muestra un descenso significativo ($p < 0.01$) del 26.76 % en los animales con tumores de mama inducidos por NMU respecto a los controles. Sin embargo, la actividad específica de aminopeptidasa N unida a membrana no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU (*Tabla R.11.1., Figura R.59.*).

La actividad específica de aminopeptidasa B soluble muestra un descenso significativo ($p < 0.05$) del 23.16 % en los animales con tumores de mama inducidos por NMU respecto a los controles. Por el contrario, la actividad específica de aminopeptidasa B unida a membrana no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU (*Tabla R.11.1., Figura R.60.*).

La actividad específica de oxitocinasa soluble y de oxitocinasa unida a membrana no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU (*Tabla R.11.1., Figura R.61.*).

La actividad específica de pirrolidón carboxipeptidasa soluble no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU. Del mismo modo, la actividad específica de pirrolidón carboxipeptidasa unida a membrana no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU (*Tabla R.11.1., Figura R.62.*).

La actividad específica de aspartato aminopeptidasa soluble y de aspartato aminopeptidasa unida a membrana no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU (*Tabla R.11.1., Figura R.63.*).

La actividad específica de glutamato aminopeptidasa soluble no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU. Del mismo modo, la actividad específica de glutamato aminopeptidasa unida a membrana no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU (*Tabla R.11.1., Figura R.64.*).

La actividad específica de leucina aminopeptidasa muestra un descenso significativo (*Tabla R.11.1., Figura R.65.*) ($p < 0.05$) del 22.76 % en los animales con tumores mamarios inducidos por NMU respecto a los controles. Por el contrario, la actividad específica de leucina aminopeptidasa unida a membrana no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU.

La actividad específica de tirosina aminopeptidasa soluble no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU. Del mismo modo, la actividad específica de tirosina aminopeptidasa unida a membrana no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU (*Tabla R.11.1., Figura R.66.*).

CORTEZA ADRENAL					
SOLUBLE			UNIDA A MEMBRANA		
	Control	NMU		Control	NMU
APN	792.83 ± 37.6	580.65 ± 50.8	APN	681.43 ± 152.3	519.98 ± 67.0
APB	1177.84 ± 68.3	905.03 ± 68.4	APB	626.22 ± 83.6	594.53 ± 48.3
OTasa	699.84 ± 47.5	626.63 ± 48.5	OTasa	423 ± 49.5	431 ± 43.8
Pcp	158.23 ± 33.5	123.59 ± 38.4	Pcp	173.82 ± 78.7	196.28 ± 64.8
AspAP	144.81 ± 54.0	139.38 ± 72.1	AspAP	228.52 ± 126.0	207.17 ± 58.0
GluAP	124.51 ± 38.6	101.64 ± 37.4	GluAP	167.98 ± 67.2	133.99 ± 37.4
LeuAP	1198.48 ± 86.1	925.69 ± 82.3	LeuAP	801.72 ± 80.5	750 ± 60.2
TyrAP	996.26 ± 51.6	903.16 ± 38.5	TyrAP	601.66 ± 80.3	446.71 ± 36.4

Tabla R.11.1. Valores de actividades específicas solubles de aminopeptidasa N, aminopeptidasa B, oxitocinasa, pirrolidón carboxipeptidasa, glutamato aminopeptidasa, aspartato aminopeptidasa, leucina aminopeptidasa y tirosina aminopeptidasa de la corteza adrenal de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en picomoles de la correspondiente aminoacil-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media ± SEM; n = 10)

Aminopeptidasa N

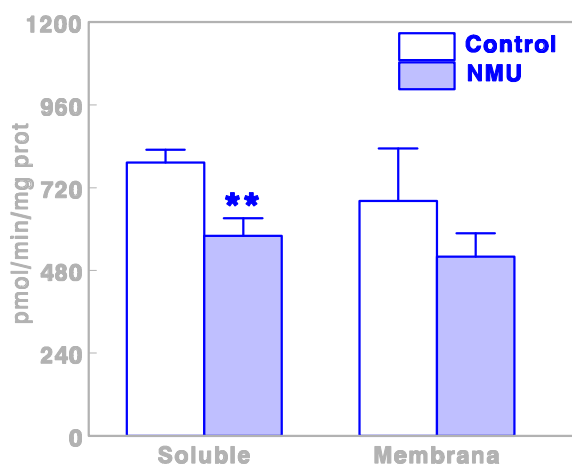


Figura R.59. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de aminopeptidasa N de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en picomoles de alanina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; ** p <0.01; n = 10)

Aminopeptidasa B

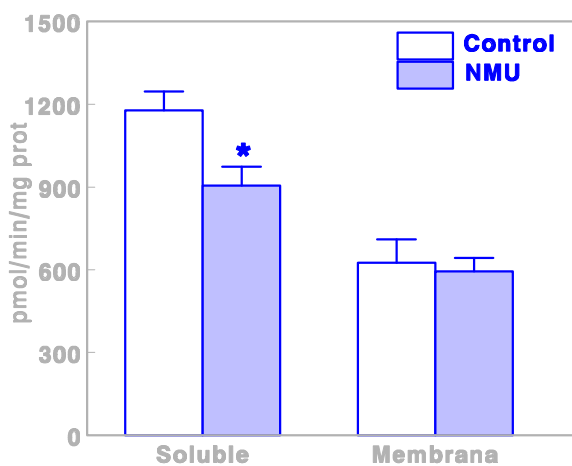


Figura R.60. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de aminopeptidasa B de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en picomoles de arginina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; * p <0.05; n = 10)

Oxitocinasa

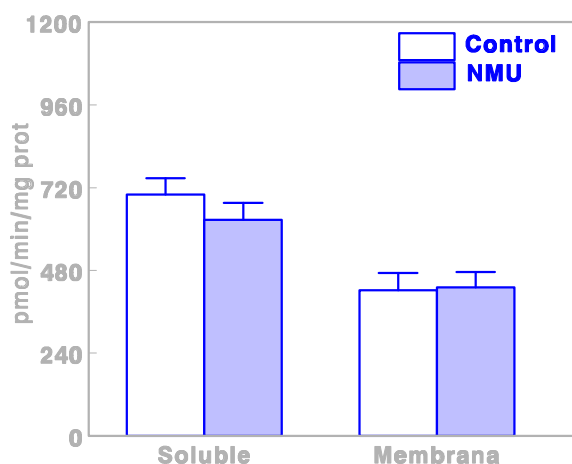


Figura R.61. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de oxitocinasa de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en picomoles de cistina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; n = 10)

Pirrolidón Carboxipeptidasa

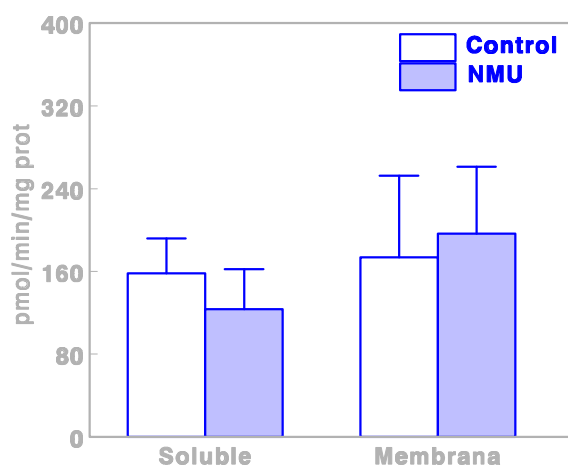


Figura R.62. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de pirrolidón carboxipeptidasa de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en picomoles de piroglutamato- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; n = 10)

Aspartato Aminopeptidasa

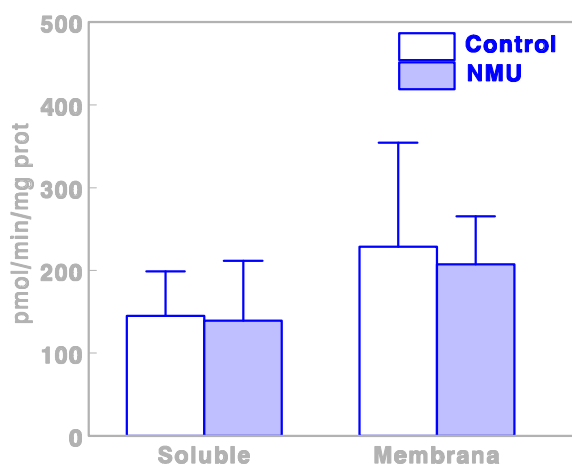


Figura R.63. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de aspartato aminopeptidasa de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en picomoles de aspartato- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; n = 10)

Glutamato Aminopeptidasa

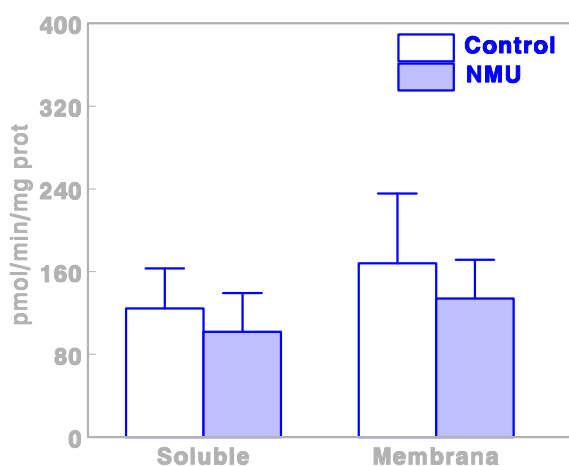


Figura R.64. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de glutamato aminopeptidasa de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en picomoles de glutamato- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; n = 10)

Leucina Aminopectidasa

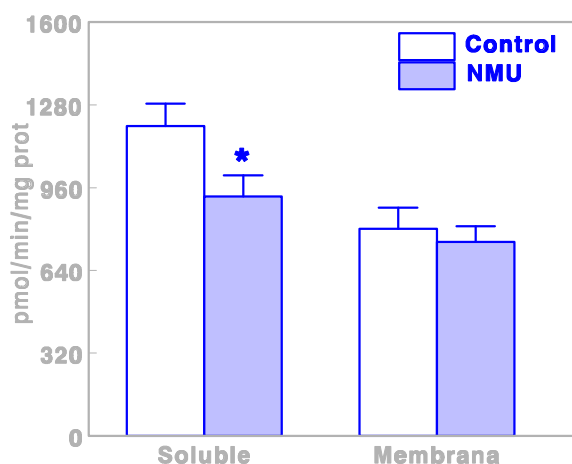


Figura R.65. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de leucina aminopectidasa de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en picomoles de leucina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; * $p < 0.05$; $n = 10$)

Tirosina Aminopectidasa

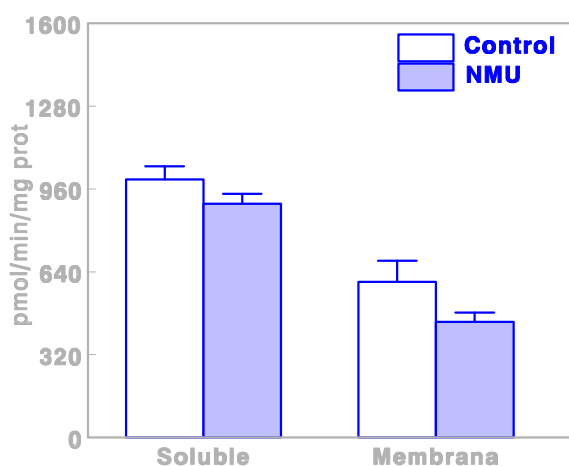


Figura R.66. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de tirosina aminopectidasa de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en picomoles de tirosina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; $n = 10$)

El análisis de la actividad específica de aminopeptidasas solubles y unidas a membrana en la médula adrenal de animales controles y con tumores de mama inducidos por la administración de NMU, muestra los siguientes resultados:

La actividad específica de aminopeptidasa N soluble muestra un descenso significativo ($p < 0.05$) del 30.05 % en los animales con tumores de mama inducidos por NMU (*Tabla R.11.2., Figura R.67.*) respecto a los controles. Del mismo modo, la actividad específica de aminopeptidasa N unida a membrana muestra un descenso significativo ($p < 0.05$) del 32.27 % en los animales con tumores de mama inducidos por NMU respecto a los controles.

La actividad específica de aminopeptidasa B soluble no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU. Sin embargo, la actividad específica de aminopeptidasa B unida a membrana muestra un descenso significativo ($p < 0.05$) del 27.21 % en los animales con tumores de mama inducidos por NMU respecto a los controles (*Tabla R.11.2., Figura R.68.*).

La actividad específica de oxitocinasa soluble muestra un descenso significativo ($p < 0.05$) del 20.41 % en los animales con tumores de mama inducidos por NMU (*Tabla R.11.2., Figura R.69.*) respecto a los controles. Sin embargo, la actividad específica de oxitocinasa unida a membrana no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU.

La actividad específica de leucina aminopeptidasa soluble no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU. Del mismo modo, la actividad específica leucina aminopeptidasa unida a membrana no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU (*Tabla R.11.2., Figura R.70.*).

La actividad específica de tirosina aminopeptidasa soluble muestra un descenso significativo ($p < 0.05$) del 40.35 % en los animales con tumores de mama inducidos por NMU (*Tabla R.11.2., Figura R.71.*) respecto a los controles. Sin embargo, la actividad específica de tirosina aminopeptidasa unida a membrana no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU.

Las actividades específicas de pirrolidón carboxipeptidasa, aspartato aminopeptidasa y glutamato aminopeptidasa, tanto en su fracción soluble como unida a membrana, no fueron detectadas por el método fluorimétrico empleado.

MÉDULA ADRENAL					
SOLUBLE			UNIDA A MEMBRANA		
	Control	NMU		Control	NMU
APN	1.45 ± 0.16	1.01 ± 0.05	APN	0.49 ± 0.05	0.33 ± 0.02
APB	1.6 ± 0.27	1.45 ± 0.12	APB	0.58 ± 0.53	0.42 ± 0.04
OTasa	1.51 ± 0.11	1.2 ± 0.06	OTasa	0.43 ± 0.03	0.32 ± 0.09
Pcp	ND	ND	Pcp	ND	ND
AspAP	ND	ND	AspAP	ND	ND
GluAP	ND	ND	GluAP	ND	ND
LeuAP	1.99 ± 0.26	1.94 ± 0.14	LeuAP	0.86 ± 0.11	0.52 ± 0.13
TyrAP	1.3 ± 0.21	0.77 ± 0.05	TyrAP	0.35 ± 0.04	0.25 ± 0.03

Tabla R.11.2. Valores de actividades específicas solubles de aminopeptidasa N, aminopeptidasa B, oxitocinasa, pirrolidón carboxipeptidasa, glutamato aminopeptidasa, aspartato aminopeptidasa, leucina aminopeptidasa y tirosina aminopeptidasa de la médula adrenal de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en nanomoles de la correspondiente aminoacil-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media ± SEM; n = 10) (ND; actividad No Detectada)

Aminopeptidasa N

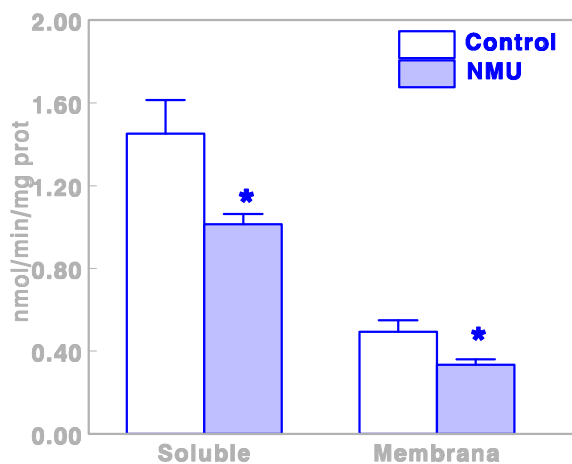


Figura R.67. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de aminopeptidasa N de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en nanomoles de alanina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; * $p < 0.05$; $n = 10$)

Aminopeptidasa B

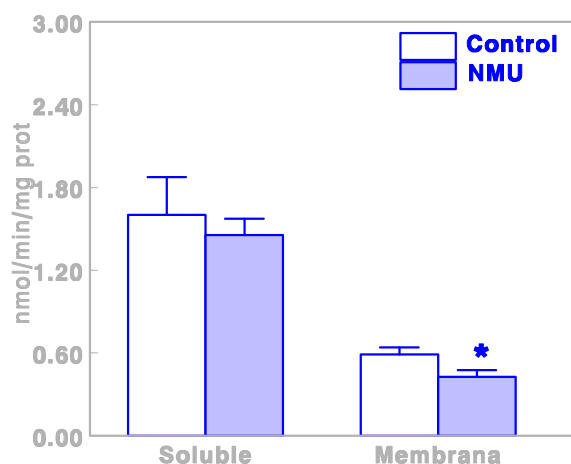


Figura R.68. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de aminopeptidasa B de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en nanomoles de arginina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; * $p < 0.05$; $n = 10$)

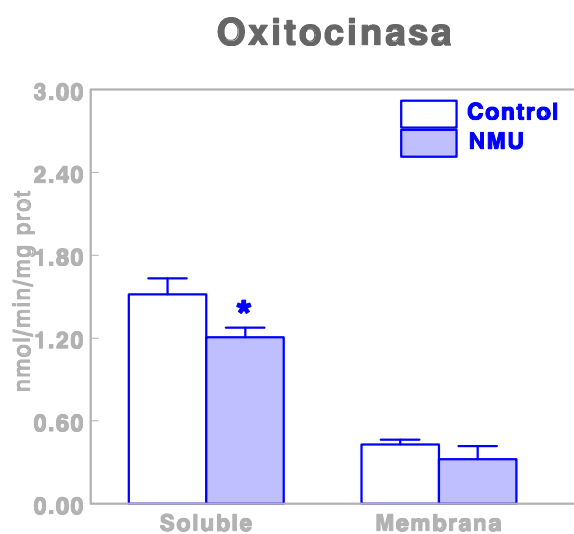


Figura R.69. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de oxitocinasa de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en nanomoles de cistina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; * $p < 0.05$; $n = 10$)

Leucina Aminopeptidasa

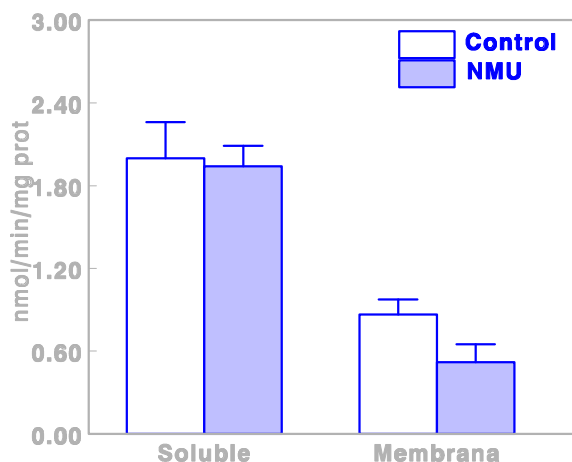


Figura R.70. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de leucina aminopeptidasa de ratas control y con tumores de mama inducidos por *N*-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en nanomoles de leucina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; $n = 10$)

Tirosina Aminopeptidasa

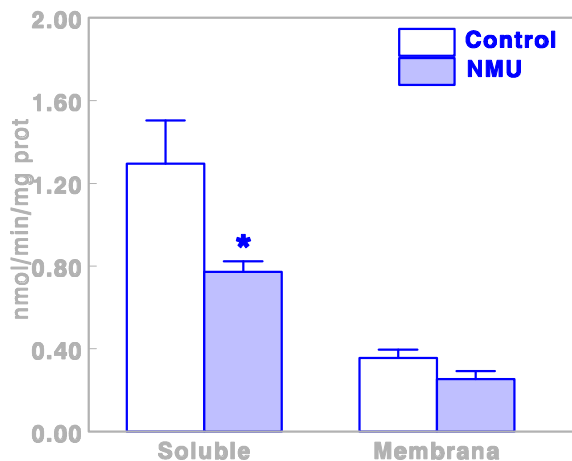


Figura R.71. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de tirosina aminopeptidasa de ratas control y con tumores de mama inducidos por *N*-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en nanomoles de tirosina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; * $p < 0.05$; $n = 10$)

3.8. Actividad específica de aminopeptidasas solubles y unidas a membrana en ovario de animales controles y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea.

El análisis de la actividad específica de aminopeptidasas solubles y unidas a membrana en ovario de animales controles y con tumores de mama inducidos por la administración de NMU, muestra los siguientes resultados:

La actividad específica de aminopeptidasa N soluble no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU. Del mismo modo, la actividad específica de aminopeptidasa N unida a membrana no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU (*Tabla R.12., Figura R.72.*).

La actividad específica de aminopeptidasa B soluble no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU. Del mismo modo, la actividad específica de aminopeptidasa B unida a membrana no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU (*Tabla R.12., Figura R.73.*).

La actividad específica de oxitocinasa soluble muestra un descenso significativo ($p < 0.01$) del 53.37 % en los animales con tumores de mama inducidos por NMU. Sin embargo, la actividad específica de oxitocinasa unida a membrana no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU (*Tabla R.12., Figura R.74.*).

La actividad específica de pirrolidón carboxipeptidasa soluble muestra un incremento significativo ($p < 0.01$) del 117.83 % en los animales con tumores de mama inducidos por NMU respecto a los controles. Por el contrario, la actividad específica de pirrolidón carboxipeptidasa unida a membrana no muestra cambios significativos entre los animales control y los animales con tumores de mama inducidos por NMU (*Tabla R.12., Figura R.75.*).

La actividad específica de aspartato aminopeptidasa soluble muestra un incremento significativo ($p < 0.05$) del 268.51 % en los animales con tumores de mama inducidos por NMU respecto a los controles. Por el contrario, la actividad específica aspartato aminopeptidasa unida a membrana no muestra cambios significativos entre los animales control y los animales con tumores de mama inducidos por NMU (*Tabla R.12., Figura R.76.*).

La actividad específica de glutamato aminopeptidasa soluble muestra un incremento significativo ($P < 0.001$) del 172.54 % en los animales con tumores de mama inducidos por NMU respecto a los controles (*Tabla R.12., Figura R.77.*). Sin embargo, la actividad específica glutamato aminopeptidasa unida a membrana no muestra cambios significativos entre los animales control y los animales con tumores de mama inducidos por NMU.

La actividad específica de leucina aminopeptidasa soluble muestra un descenso significativo ($p < 0.05$) del 17.95 % en los animales con tumores de mama inducidos por NMU respecto a los controles (*Tabla R.12., Figura R.78.*). Por el contrario, la actividad específica

leucina aminopeptidasa unida a membrana no muestra cambios significativos entre los animales control y los animales con tumores de mama inducidos por NMU.

La actividad específica de tirosina aminopeptidasa soluble muestra un descenso significativo ($P < 0.01$) del 22.46 % en los animales con tumores de mama inducidos por NMU respecto a los controles (*Tabla R.12., Figura R.79.*). Por el contrario, la actividad específica tirosina aminopeptidasa unida a membrana no muestra cambios significativos entre los animales control y los animales con tumores de mama inducidos por NMU.

OVARIO					
SOLUBLE			UNIDA A MEMBRANA		
	Control	NMU		Control	NMU
APN	2.75 ± 0.14	2.50 ± 0.22	APN	3.57 ± 0.29	4.36 ± 0.58
APB	3.53 ± 0.34	3.47 ± 0.31	APB	3.14 ± 0.29	3.9 ± 0.58
OTasa	1.40 ± 0.13	0.65 ± 0.2	OTasa	1.41 ± 0.3	1.22 ± 0.5
Pcp	0.16 ± 0.01	0.35 ± 0.67	Pcp	0.7 ± 0.098	0.8 ± 0.11
AspAP	0.24 ± 0.04	0.88 ± 0.21	AspAP	0.61 ± 0.14	1.19 ± 0.39
GluAP	0.42 ± 0.47	1.16 ± 0.14	GluAP	2.61 ± 0.31	3.22 ± 0.51
LeuAP	3.1 ± 0.1	2.54 ± 0.24	LeuAP	2.98 ± 0.3	2.91 ± 0.54
TyrAP	1.82 ± 0.087	1.41 ± 0.08	TyrAP	1.65 ± 0.17	1.78 ± 0.48

Tabla R.12. Valores de actividades específicas solubles de aminopeptidasa N, aminopeptidasa B, oxitocinasa, pirrolidón carboxipeptidasa, glutamato aminopeptidasa, aspartato aminopeptidasa, leucina aminopeptidasa y tirosina aminopeptidasa de ovario de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en nanomoles de la correspondiente aminoacil- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; n = 10)

Aminopeptidasa N

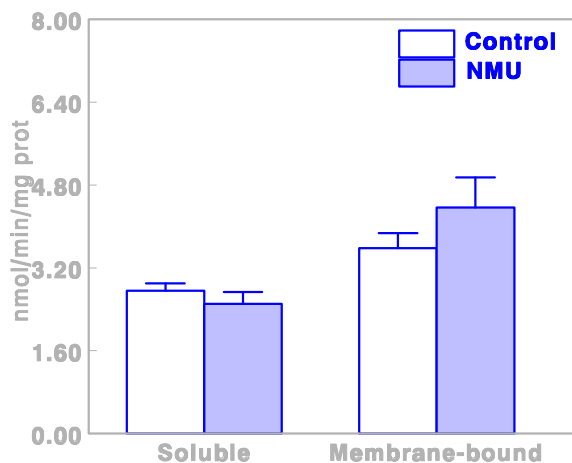


Figura R.72. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de aminopeptidasa N de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en nanomoles de alanina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; n = 10)

Aminopeptidasa B

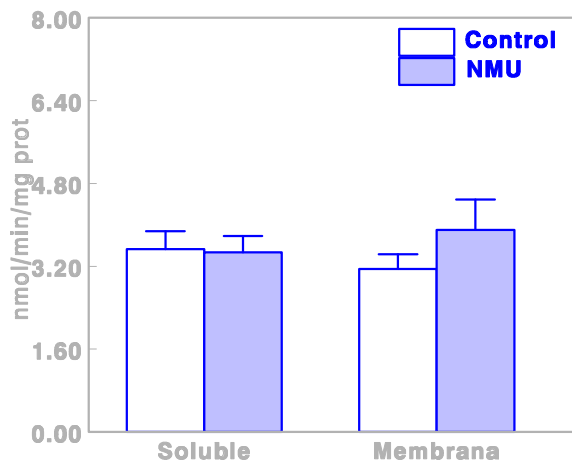


Figura R.73. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de aminopeptidasa B de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en nanomoles de arginina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; n = 10)

Oxitocinasa

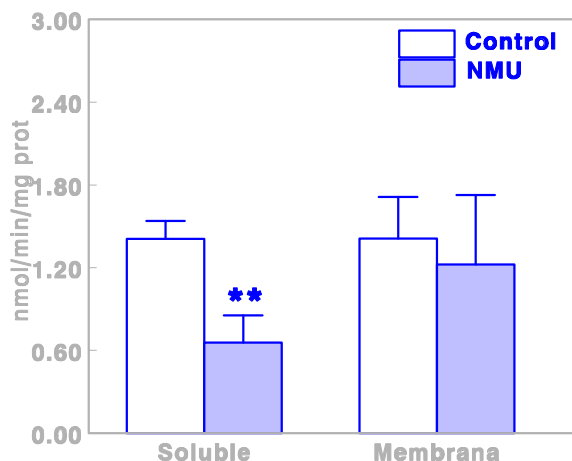


Figura R.74. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de oxitocinasa de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en nanomoles de cistina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; ** $p < 0.01$; $n = 10$)

Pirrolidón Carboxipeptidasa

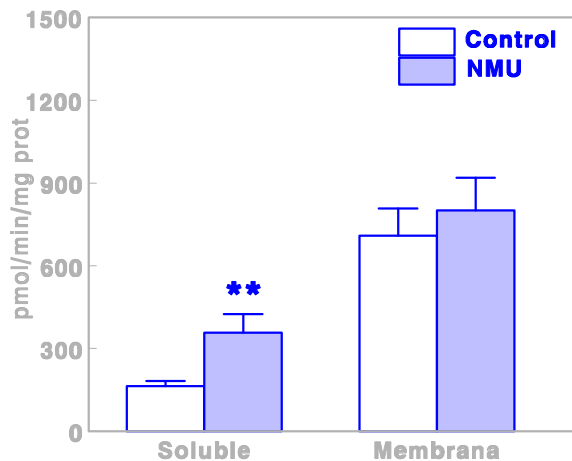


Figura R.75. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de pirrolidón carboxipeptidasa de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en nanomoles de piroglutamato- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; ** $p < 0.01$; $n = 10$)

Aspartato Aminopeptidasa

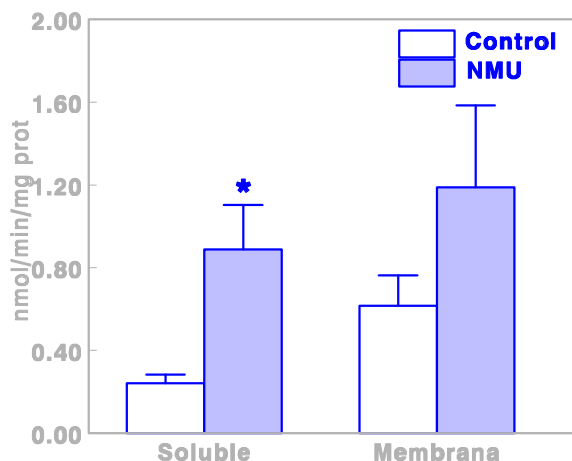


Figura R.76. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de aspartato aminopeptidasa de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en nanomoles de aspartato- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; * $p < 0.05$; $n = 10$)

Glutamato Aminopeptidasa

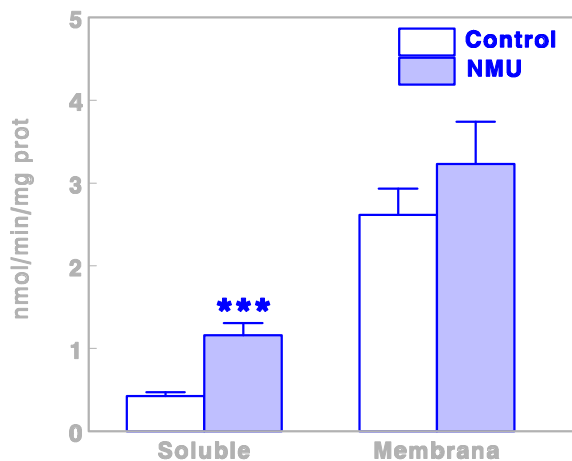


Figura R.77. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de glutamato aminopeptidasa de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en nanomoles de glutamato- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; *** $p < 0.001$; $n = 10$)

Leucina Aminopeptidasa

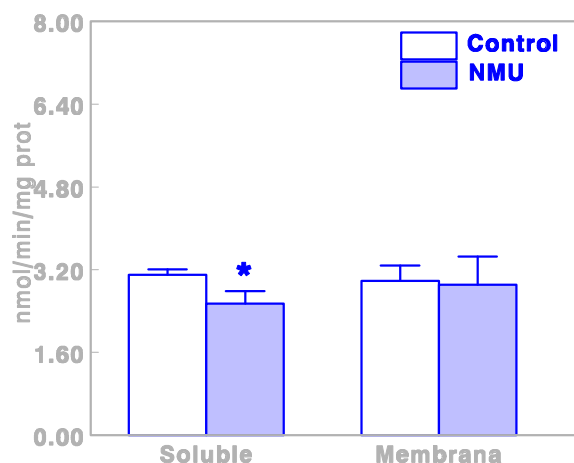


Figura R.78. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de leucina aminopeptidasa de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en nanomoles de leucina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; * $p < 0.05$; $n = 10$)

Tirosina Aminopeptidasa

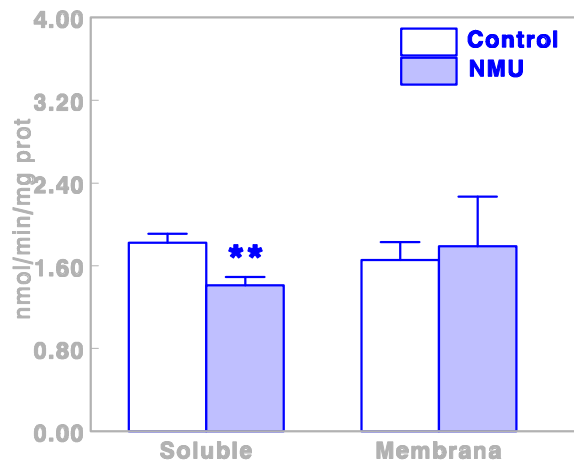


Figura R.79. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de tirosina aminopeptidasa de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en nanomoles de tirosina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; ** $p < 0.01$; $n = 10$)

3.9. Actividad específica de aminopeptidasas solubles y unidas a membrana en útero de animales controles y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea.

El análisis de la actividad específica de aminopeptidasas solubles y unidas a membrana en útero de animales controles y con tumores de mama inducidos por la administración de NMU, muestra los siguientes resultados:

La actividad específica de aminopeptidasa N soluble no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU. Del mismo modo, la actividad específica de aminopeptidasa N unida a membrana no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU (*Tabla R.13., Figura R.80.*).

La actividad específica de aminopeptidasa B soluble no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU. Del mismo modo, la actividad específica de aminopeptidasa B unida a membrana no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU (*Tabla R.13., Figura R.81.*).

La actividad específica de oxitocinasa soluble no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU. Del mismo modo, la actividad específica de oxitocinasa unida a membrana no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU (*Tabla R.13., Figura R.82.*).

La actividad específica de pirrolidón carboxipeptidasa soluble no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU. Del mismo modo, la actividad específica de pirrolidón carboxipeptidasa unida a membrana no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU (*Tabla R.13., Figura R.83.*).

La actividad específica de aspartato aminopeptidasa soluble muestra un incremento significativo ($p < 0.01$) del 250.73 % en los animales con tumores de mama inducidos por NMU respecto a los controles. Por el contrario, la actividad específica de aspartato aminopeptidasa unida a membrana no muestra cambios significativos entre los animales control y los animales con tumores de mama inducidos por NMU (*Tabla R.13., Figura R.84.*).

La actividad específica de glutamato aminopeptidasa soluble no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU. Del mismo modo, la actividad específica de glutamato aminopeptidasa unida a membrana no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU (*Tabla R.13., Figura R.85.*).

La actividad específica de leucina aminopeptidasa soluble no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU. Del mismo modo, la actividad específica de leucina aminopeptidasa unida a membrana

no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU (*Tabla R.13., Figura R.86 .*).

La actividad específica de tirosina aminopeptidasa soluble no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU. Del mismo modo, la actividad específica de tirosina aminopeptidasa unida a membrana no muestra cambios significativos entre los animales controles y los animales con tumores de mama inducidos por NMU (*Tabla R.13., Figura R.87.*).

ÚTERO					
SOLUBLE			UNIDA A MEMBRANA		
	Control	NMU		Control	NMU
APN	10.32 ± 0.48	8.92 ± 1.44	APN	3.28 ± 2.3	2.71 ± 0.54
APB	17.98 ± 1.60	16.38 ± 2.12	APB	2.62 ± 1.05	4.12 ± 0.64
OTasa	7.31 ± 0.51	7.12 ± 1.24	OTasa	1.96 ± 0.66	3.22 ± 0.86
Pcp	1.68 ± 0.37	2.01 ± 0.63	Pcp	1.27 ± 0.51	1.61 ± 0.38
AspAP	0.21 ± 0.04	0.76 ± 0.18	AspAP	1.22 ± 0.47	1.42 ± 0.34
GluAP	1.24 ± 0.35	1.8 ± 0.6	GluAP	1.56 ± 0.50	1.91 ± 0.35
LeuAP	7.17 ± 0.73	6 ± 0.97	LeuAP	1.71 ± 0.69	2.98 ± 0.5
TyrAP	6.77 ± 0.49	6.38 ± 1.10	TyrAP	1.49 ± 0.55	2.5 ± 0.34

Tabla R.13. Valores de actividades específicas solubles de aminopeptidasa N, aminopeptidasa B, oxitocinasa, pirrolidón carboxipeptidasa, glutamato aminopeptidasa, aspartato aminopeptidasa, leucina aminopeptidasa y tirosina aminopeptidasa de útero de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en nanomoles de la correspondiente aminoacil-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media ± SEM; n = 10)

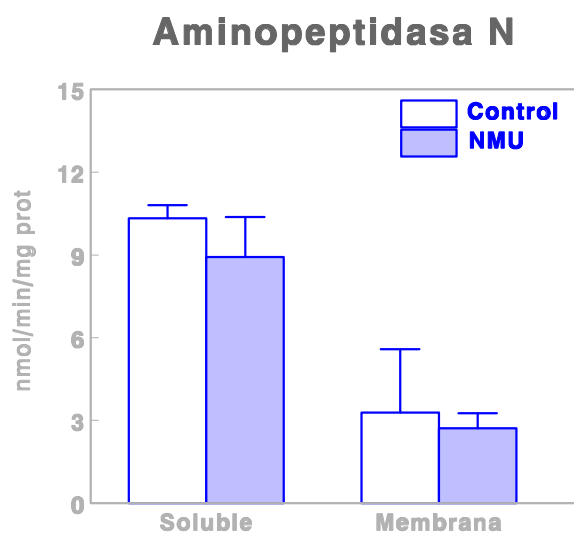


Figura R.80. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de aminopeptidasa N de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en nanomoles de alanina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; n = 10)

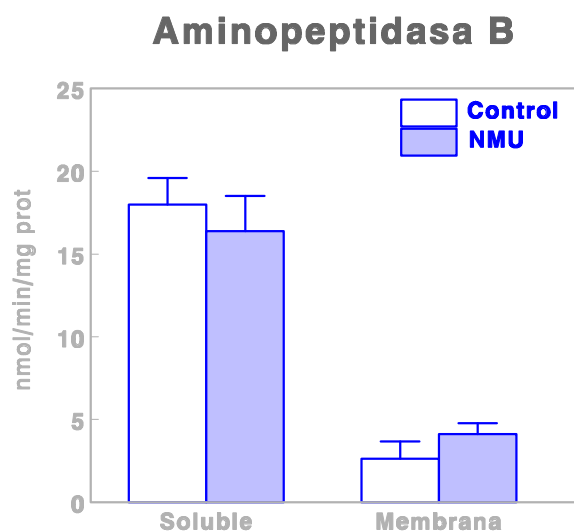


Figura R.81. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de aminopeptidasa B de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en nanomoles de arginina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; n = 10)

Oxitocinasa

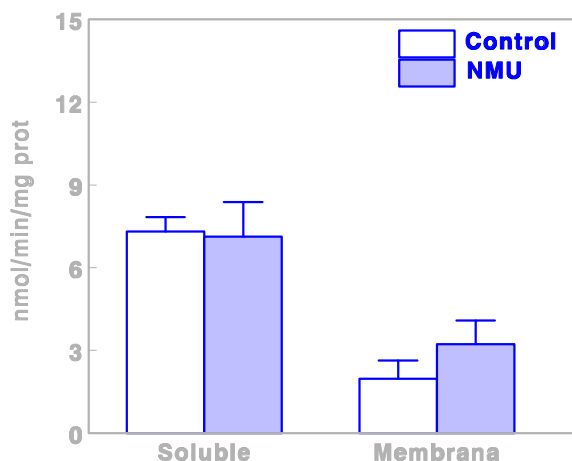


Figura R.82. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de oxitocinasa de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en nanomoles de cistina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; n = 10)

Pirrolidón Carboxipeptidasa

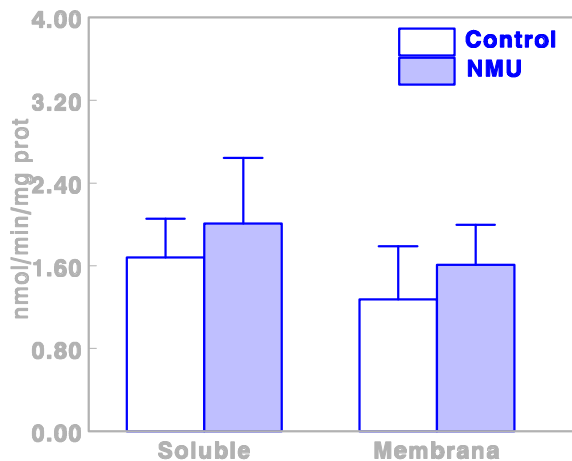


Figura R.83. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de pirrolidón carboxipeptidasa de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en nanomoles de piroglutamato- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; n = 10)

Aspartato Aminopeptidasa

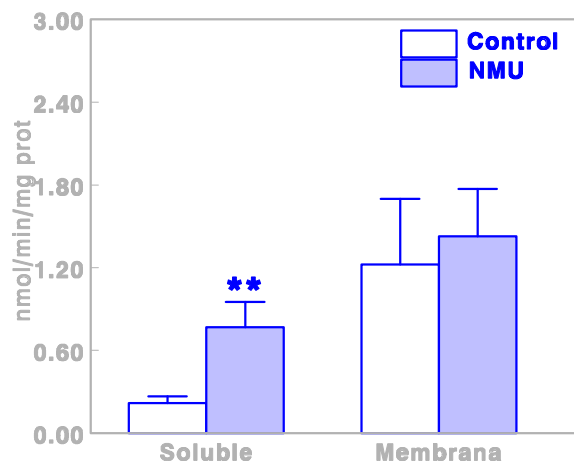


Figura R.84. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de aspartato aminopeptidasa de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en nanomoles de aspartato- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; ** $p < 0.01$; $n = 10$)

Glutamato Aminopeptidasa

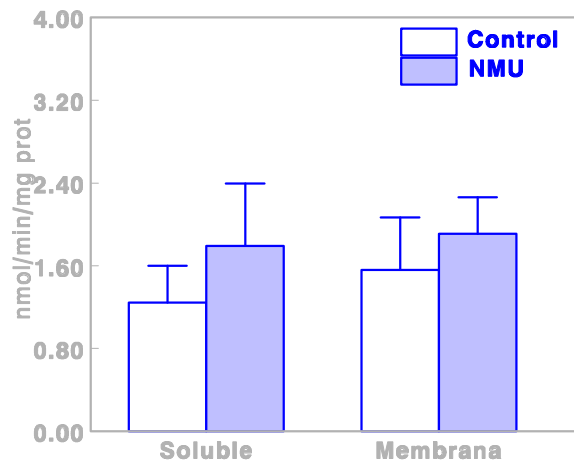


Figura R.85. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de glutamato aminopeptidasa de ratas control y con tumores de mama inducidos por N-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en nanomoles de glutamato- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; $n = 10$)

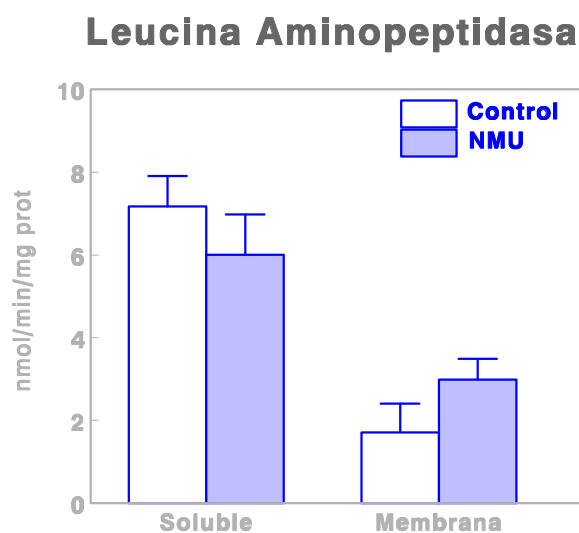


Figura R.86. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de leucina amino peptidasa de ratas control y con tumores de mama inducidos por *N*-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en nanomoles de leucina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; n = 10)

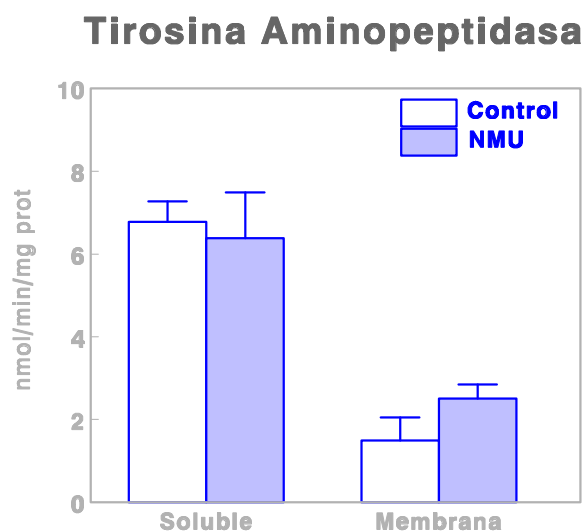


Figura R.87. Representación de los valores de actividad específica soluble y unida a membrana de tirosina amino peptidasa de ratas control y con tumores de mama inducidos por *N*-metil nitrosourea (NMU). Los resultados se expresan en nanomoles de tirosina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína. (Media \pm SEM; n = 10)

VI. DISCUSIÓN

1. SOBRE LOS MODELOS ANIMALES DE CÁNCER DE MAMA

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 dimetilbenzo [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, como hemos comentado anteriormente, 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* (*ras*12) en un 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 oncogén 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 oncogén 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 oncogén 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 animales 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 más 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 Kusmierck, 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 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).

1.1. SOBRE LA SUSCEPTIBILIDAD DE LA GLÁNDULA MAMARIA A LA CARCINOGENESIS

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).

Como hemos comentado 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 mas 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).

2. SOBRE LA DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES AMINOPEPTIDASAS

Para la detección de una aminopeptidasa, con absoluta garantía de su naturaleza, se exigen métodos de determinación que pudieran resultar complejos, ya que se necesitaría la presencia de un péptido sustrato para el enzima de secuencia conocida y en estado prácticamente puro y del manejo de técnicas sofisticadas tales como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o los analizadores de aminoácidos. Menos problemáticas resultarían las técnicas de cromatografía en capa fina o en papel, aunque en estos casos existirían problemas de cuantificación de la actividad enzimática.

Tales técnicas pueden ser utilizadas actualmente, de hecho algunos investigadores las utilizan para demostrar la actividad de una aminopeptidasa purificada sobre un determinado péptido, pero no estaban al alcance de los investigadores de hace cincuenta años. Estos decidieron perfeccionar las primitivas determinaciones de la actividad aminopeptidásica (que se realizaban midiendo el incremento del contenido de aminoácidos de la muestra incubada) utilizando sustratos artificiales hidrolizables por estos enzimas y cuyos productos fuesen fácilmente detectables y medibles.

El primer sustrato artificial utilizado para la determinación de una aminopeptidasa fue la L-leucinamida (Linderstrom-Lang, 1929). Inmediatamente se sugirió el nombre de leucina aminopeptidasa para el enzima, dado que no hidrolizaba los derivados N-acetilados de la L-leucinamida. El enzima no restringe su actividad al aminoácido leucina, sino que puede hidrolizar otras amidas sintéticas y distintos polipéptidos biológicamente activos. Los métodos de determinación de los productos de las hidrólisis de la L-leucinamida (leucina y amoníaco) son muy variados, ya que el pH óptimo de la reacción es de 8-9, y a pH 7.4 el enzima es prácticamente inactivo.

Es dudoso que la actividad de hidrólisis de L-leucinamida sea la misma que la detectada con otros sustratos artificiales. Por tanto, la clásica leucina aminopeptidasa es distinguible de otras aminopeptidasas que funcionan a pH próximo al neutro.

Sin lugar a duda, los sustratos artificiales más usados para la determinación de aminopeptidasas han sido las aminoacil- β -naftilamidas, derivados amídicos de la β -naftilamina. Estos sustratos fueron introducidos por primera vez por Gomori (1954), y desde entonces se han obtenido derivados de todos los aminoácidos, de muchos dipéptidos e, incluso, compuestos que han permitido la detección de diversas

endopeptidasas mediante el bloqueo del grupo amino terminal del aminoácido con diversos grupos químicos. En principio, la β -naftilamina liberada por acción enzimática se acopla a una sal diazólica para producir un color rojo o azul dependiendo de la sal de acoplamiento considerada, y se mide espectrofotométricamente a 520 - 540nm. Este ha sido el método seguido en este trabajo de investigación para la determinación de la actividad aminopeptidasa (véase material y métodos). Este método se ha aplicado también a la determinación histoquímica de aminopeptidasas (Gomori, 1954). Pero existe otro método para medir la β -naftilamida, y este es el método fluorimétrico, sin necesidad del posterior acoplamiento, a 335 nm de excitación y 412 nm de emisión. A los enzimas que hidrolizan las aminoacil- β -naftilamidas (arilamidas), y para diferenciarlos de otras aminopeptidasas que no hidrolizan a estos sustratos, se los ha denominado “arilamidasas”.

Dado que la β -naftilamida es, con toda probabilidad, un agente carcinógeno y no es recomendable su uso rutinario, se han sintetizado otros sustratos de aminopeptidasas en los últimos años que también se utilizan en la actualidad. Nagatsu *et al.* (1976) introdujeron las aminoacil-p-nitroanilidas como sustratos que liberan p-nitroanilina y que se determinan espectrofotométricamente a 380 nm. Finalmente, Prusak *et al.* (1980) e Imai *et al.* (1983), han utilizado las aminoacil-7-amido-4-metil-cumarinas como sustratos de aminopeptidasa. La 4-metil-cumarina liberada por estos enzimas puede medirse fluorimétricamente a 460 nm, con excitación a 380 nm.

3. SOBRE LA ACTIVIDAD DE AMINOPEPTIDASAS SÉRICAS EN RATAS CON CÁNCER DE MAMA INDUCIDO MEDIANTE N-METIL NITROSOUREA

Los niveles de enzimas séricos 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 diferentes aminopeptidasas en ratas con tumor de mama inducido mediante el carcinógeno NMU.

3.1. SOBRE LAS ACTIVIDADES ANGIOTENSINASAS

La APA engloba a las actividades glutamato y aspartato aminopeptidasa. Exopeptidasas independientes de zinc, ambas catalizan la hidrólisis de residuos aspartil y glutamil-N-terminales, aunque cada una es más eficiente hidrolizando su correspondiente derivado aminoacilo. La APA participa en la ruta catabólica del sistema renina angiotensina (www.expasy.ch) y aunque se expresa en múltiples tejidos, su expresión es específica de líneas y estados de diferenciación de células hematopoyéticas (Cooper *et al.*, 1986). El sustrato fisiológico de la APA es la angiotensina II (Ang II), un importante regulador de la presión sanguínea. Por esto, a la APA también se le conoce como angiotensinasa (Nagatsu *et al.*, 1965; Sakura *et al.*, 1983). Concretamente la Ang II es transformada en angiotensina III (AngIII) por la acción de la APA, y la Ang III daría lugar a la Ang IV por la actividad tanto de la APN como de la APB. Por otro lado la Ang III también puede generarse a partir de angiotensina I (Ang I), mediante un compuesto intermediario denominado des-Asp¹-Ang I, por la acción del enzima convertidor de angiotensina.

La actividad AspAP sería la responsable de la degradación de la Ang I a dicho compuesto (Sim *et al.*, 1994) (*Figura D.1.*).

La APN es una proteína dependiente de zinc que libera aminoácidos neutros del extremo N-terminal de diferentes péptidos y proteínas (Sanderink *et al.*, 1988). Como hemos comentamos, esta involucrada en la degradación de neuropéptidos (Mizutani *et al.*, 1993; Ahmad *et al.*, 1992; Shimamura *et al.*, 1988, 1991; Ward *et al.*, 1990) y angiotensinas (Chansel *et al.*, 1998; Palmieri *et al.*, 1985, 1989), por lo que se dice que tiene actividad angiotensinasa, al igual que la APB y APA. Los niveles de CD13/APN en células primarias y líneas celulares están aumentados en respuesta a la hipoxia, factores de crecimiento y señales que regulan la formación de capilares durante la angiogénesis (Bhagwat *et al.*, 2001), expresándose de forma específica en el endotelio vascular angiogénico, pero no en el normal (Pascualini *et al.*, 2000). Algunos autores como Severini *et al.*, (1991) han propuesto a 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 está 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.

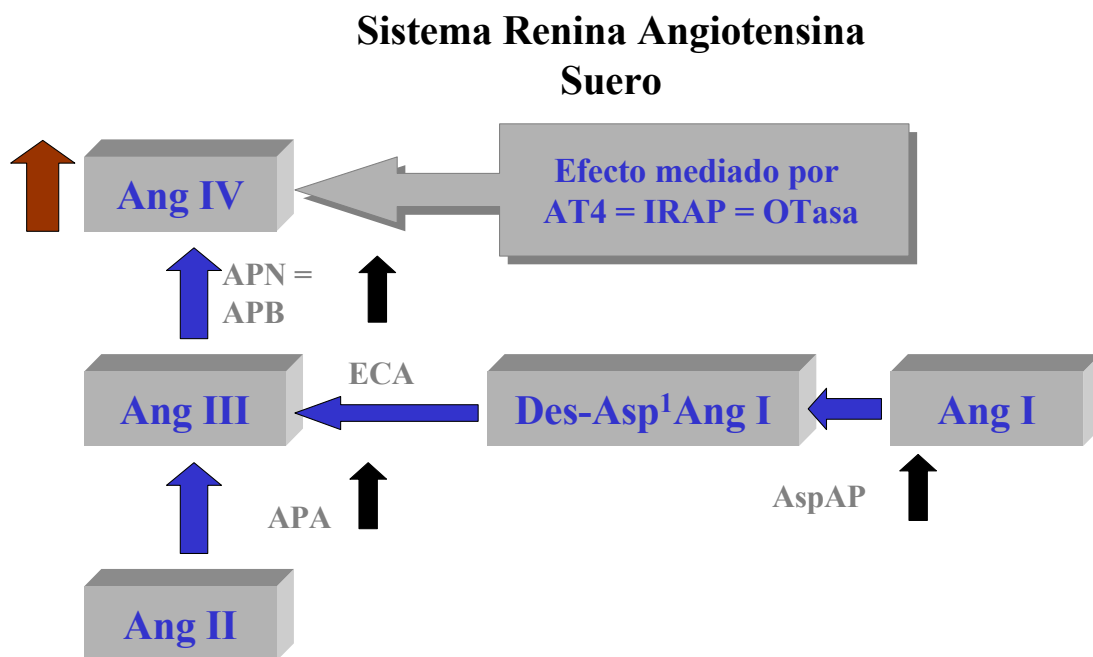


Figura D.1. Actividad aminopeptidasa sérica involucrada en el metabolismo de las angiotensinas.

La APB es una exopeptidasa dependiente de zinc, que considerada en un principio de naturaleza citosoluble, también se ha descrito como un enzima secretado. Comparte con la APN, su sustrato, (Barrett *et al.*, 1998) la Ang III.

Por tanto, los resultados obtenidos en el presente estudio, en los que las actividades GluAP y APB muestran un incremento significativo, indican que en el cáncer de mama inducido por NMU estaría favorecido el metabolismo rápido de la Ang II a Ang III por la APA y de Ang III a Ang IV por la APB. Por tanto los niveles de Ang

II estarían disminuidos frente a los de Ang IV que estaría incrementados. Estos resultados estarían de acuerdo con los obtenidos por otros autores en relación con la sobreexpresión de los receptores de Ang II de tipo I en hiperplasias mamarias (De Paepe *et al.*, 2001), a nivel de la membrana citoplasmática de las células de lesiones hiperplásicas con y sin atipias y en carcinomas ductales *in situ* (DCIS) de mama.

3.2 SOBRE LA ACTIVIDAD OXITOCINASA

En cuanto a la Ang IV, hay que indicar que su acción se lleva a cabo a través de su receptor AT4. Recientemente este receptor se ha identificado en membrana adrenal bovina como la aminopeptidasa regulada por insulina (Insulin-regulated amino peptidase, IRAP) que se corresponde con la actividad oxitocinasa. Albiston *et al.* (2001) postulan que los ligandos del receptor AT4 median sus efectos fisiológicos mediante la inhibición de la actividad oxitocinasa, inhibiendo la hidrólisis de sus sustratos de forma dosis dependiente. La oxitocinasa pertenece también al grupo de las metaloenzimas dependientes de zinc. Es una proteína de membrana tipo II (Rasmussen *et al.*, 2000), que tiene capacidad de actuar sobre sustratos sintéticos como S-benzyl- L-cistina-para-nitroanilida (Hiwada *et al.*, 1978), cys-di-naftilamida (Lampelo y Vaha- Perttula, 1979) así como sobre hormonas peptídicas oxitocina y vasopresina (Tsujimoto *et al.*, 1992). La oxitocina (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). 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). Por otro lado también hemos de tener en cuenta que han sido descritos receptores para la oxitocina (OTRs) en tumores de mama humanos y en células tumorales, y además que estos son funcionales (Copland *et al.*, 1999). 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). Bussolati *et al.* (1996) encontraron receptores para la OT en mama en lesiones intraductales de lesiones hiperplásicas benignas. También se encontraron en carcinomas de mama primarios y metastáticos, lo que sugiere que la interacción entre OT/OTR podría intervenir en el origen y evolución de lesiones no neoplásicas y carcinomas de mama. Los resultados obtenidos en nuestro trabajo reflejan un aumento significativo de la actividad oxitocinasa, por lo que los niveles de OT estarían disminuidos en el suero de las ratas con tumores de mama. Recientemente ha sido descrito un nuevo efecto biológico de la oxitocina: actúa como regulador del crecimiento en patologías neoplásicas, siendo además confirmado el efecto inhibitorio de la OT sobre el crecimiento de carcinomas mamarios en rata y ratón *in vivo*. 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). En resumen podríamos decir que los bajos niveles séricos de Ang II, con la consecuente posible sobreexpresión de sus receptores en tejido mamario, así como el aumento de los niveles de Ang IV como consecuencia de los cambios en la actividad de las aminopeptidasas que intervienen en el metabolismo de las angiotensinas y su posible conexión con el “sistema OT-OTR-oxitocinasa” a través de los receptores AT₄, nos podrían hacer suponer un sistema renina angiotensina local en la glándula mamaria, que estaría modificado por el desarrollo de carcinomas mamarios, favoreciendo una disminución de los niveles de OT, lo que justificaría, al menos en parte, el desarrollo y progresión de esta enfermedad.

3.3 SOBRE LA ACTIVIDAD PIRROLIDÓN CARBOXIPEPTIDASA

Como hemos comentado anteriormente, la participación hormonal tanto en el desarrollo normal como de carcinomas en la mama es fundamental. La inducción de tumores mediante NMU se caracteriza por inducir tumores estrógeno dependientes (Rose *et al.*, 1980), siendo uno de sus principales atributos que la proporción de carcinomas mamarios que son ovario-dependientes es similar a la observada en la enfermedad en humanos (Lu *et al.*, 1998). La dependencia estrogénica de dichos tumores

inducidos mediante NMU podría relacionarse con la disminución observada en la actividad Pcp. Trabajos previos mostraron cambios en la actividad Pcp en cáncer de mama en mujeres, a nivel de tejido tumoral y adyacente, sugiriéndose que cambios en esta enzima o en sus posibles sustratos pueden tener un importante papel en la patogénesis del cáncer de mama (Martínez *et al.*, 1999).

Ya que uno de los sustratos susceptibles de la Pcp es la GnRH, la disminución observada en su actividad indicaría la existencia de altos niveles circulantes de esta hormona peptídica. En este sentido, se han localizado en tejido mamario receptores para GnRH (GnRH-R), sugiriéndose un papel local de la GnRH en la glándula mamaria humana (Kottler *et al.*, 1997).

También han sido inmunolocalizados GnRH-R en el citoplasma de células tumorales e incluso en el citoplasma de células morfológicamente normales del epitelio glandular adyacente al carcinoma. Aunque se han encontrado GnRH-R tanto en tejido normal como en tumoral, la presencia de GnRH-R fue superior en tejido tumoral que en el no tumoral (Paradiso *et al.*, 2000). De cualquier forma el aumento en los niveles de GnRH conduce a un incremento en los niveles de hormonas esteroideas gonadales (Huirne y Lambalk, 2001) como el estradiol, que estimula tanto la actividad mitótica como el crecimiento del tejido epitelial mamario, conduciendo a un aumento de la sensibilidad al carcinógeno. Por tanto la disminución de la actividad Pcp, nos podría hacer suponer un aumento de los niveles de GnRH, lo que se traduce en un aumento en la producción de hormonas esteroideas gonadales, responsables, al menos en parte del inicio y desarrollo de esta enfermedad.

3.4 SOBRE LA ACTIVIDAD ENCEFALINASA

Por lo que respecta a la actividad TyrAP sérica, ha sido descrita como la actividad responsable de la degradación de encefalinas (Hui y Lajtha, 1986). Los péptidos opiáceos, desde que fueron descubiertos por Hughes *et al.* (1975) se han considerado potentes reguladores del crecimiento (Zagon y McLaughlin, 1983, 1984) además de su función como neurotransmisores y neuromoduladores (Akil *et al.*, 1984). La modificación del crecimiento celular por los opiáceos podría deberse a la parada en un punto específico del ciclo celular (Panagiotou *et al.*, 1999). Por otro lado,

recientemente ha sido identificado un péptido opioide, [Met⁵] encefalina, como un regulador negativo del crecimiento, el factor de crecimiento opioide, OGF. Este factor ha sido implicado en procesos como el cáncer, angiogénesis o cicatrización de heridas (Blebea et al., 2000; Bisignani et al., 1999; Dávila- García y Azmitia, 1990).

A la vista de los resultado observados en este estudio, donde encontramos un incremento en la actividad TyrAP sérica, los niveles de encefalinas estarían disminuidos, promoviendo el crecimiento neoplásico, si bien no podemos olvidar un posible papel de éstos péptidos en funciones tan importantes como el control de la analgesia y el control del dolor.

Como discutiremos posteriormente, la actividad TyrAP en la mayor parte de los tejidos analizados sufre un descenso lo que supondría unos mayores niveles de encefalinas a nivel local, que podrían estar relacionadas con estas otras funciones. Podríamos sugerir que el comportamiento de la actividad TyrAP a nivel sérico es el resultado de la afluencia de encefalinas séricas.

A modo de resumen, podemos concluir que las alteraciones de las actividades aminopeptidasas APN, APA, OTasa, Pcp y TyrAP encontradas en el suero de ratas con cáncer de mama inducido por NMU, sugieren una disminución de los niveles de angiotensina II, oxitocina y encefalinas, y un aumento de los niveles de Ang IV y GnRH con la enfermedad. Además, el hecho de que el receptor AT4 para la Ang IV muestre actividad oxitocinasa, sugiere la existencia de una conexión entre un SRA local a nivel de mama y el sistema OT-OTR-OTasa, que estaría implicado en el desarrollo y progresión del cáncer de mama, de forma, además, dependiente de estrógenos.

4.SOBRE LA ACTIVIDAD DE AMINOPEPTIDASAS TISULARES EN RATAS CON CÁNCER DE MAMA INDUCIDO MEDIANTE N-METIL NITROSOUREA

4.1. GLÁNDULA MAMARIA

En este modelo de inducción de carcinogénesis mamaria, es necesaria la interacción del carcinógeno con un epitelio mamario indiferenciado y altamente proliferativo, para desencadenar el inicio del cáncer de mama.

4.1.1. Sobre las actividades angiotensinasas

Resultados obtenidos a partir de modelos animales sugieren que la Ang II estimula la neovascularización (Le Noble *et al.*, 1991; Fernández *et al.*, 1985) por promover la proliferación celular del músculo liso arteriolar (Le Noble *et al.*, 1996), lo cual a llevado a un creciente interés en el papel promotor de la Ang II en la angiogénesis y en el crecimiento neoplásico.

Además, la Ang II puede actuar como un factor mitótico mediante la inducción o regulación de la expresión de genes implicados en la progresión del ciclo celular (Lyll *et al.*, 1992; Sadoshima *et al.*, 1997). De hecho, el bloqueo del receptor AT1 de la Ang II reduce de forma efectiva la progresión tumoral dependiente del factor de crecimiento transformante $\beta 1$ *in vivo* (Maluccio *et al.*, 2001). En este sentido, la estimulación del receptor AT1 ha sido implicada en la hiperplasia e hipertrófia de diferentes tejidos, e igualmente su ligando la Ang II. De hecho, el receptor AT1 se ha localizado a nivel citoplasmático de tejido tumoral de carcinomas ductales *in situ* y en carcinomas ductales infiltrantes (Tahmasebi *et al.*, 1998). Sin embargo, el receptor AT2 a diferencia del AT1, esta implicado en procesos de apoptosis (Yamada *et al.*, 1996).

Trabajos desarrollados por De Paepe *et al.*, (2001) muestran una correlación positiva importante entre la expresión a nivel de membrana del receptor AT1 y la presencia de lesiones hiperplásicas y carcinomas ductales *in situ* en mama. Más concretamente, la localización específica de receptores AT1 en la membrana de lesiones hiperplásicas y carcinomas ductales *in situ*, podría ser importante desde el punto de vista de la patogénesis de las hiperplasias con y sin atipia (Dupont y Page, 1985). Como hemos comentado, la hiperplasia con atipia se ha definido como la lesión precursora del cáncer de mama. Los resultados obtenidos por De Paepe *et al.* (2001), concluyen que existe una fuerte tinción inmunohistoquímica a nivel de membrana, para el receptor AT1, y es específica de lesiones no invasivas, como las hiperplasias con y sin atipia y el carcinoma ductal *in situ*. La localización de los receptores determinaría la zona de actuación de la Ang II en la mama. En este sentido, la prevención del paso de hiperplasia y carcinoma ductal *in situ* a carcinoma ductal invasivo es uno de los puntos fundamentales de multitud de estudios. La expresión diferencial del receptor AT1 podría limitar ambos estados.

Por otro lado, el receptor AT₂, aunque relacionado con procesos apoptóticos, también induce la estimulación de la liberación de bradiquinina y óxido nítrico (NO, del inglés Nitric Oxide), generado por un incremento en la producción de NO sintasa inducible (iNOS, del inglés Inducible Nitric Oxide Synthase) (Tsutsumi *et al.*, 1999). El NO tiene un efecto positivo sobre la progresión tumoral aunque por otro lado, altos niveles de NO conducen a apoptosis y citólisis (De Paepe *et al.*, 2002).

En el modelo de carcinogénesis empleado en este estudio, observamos un incremento en la actividad aminopeptidasa A de membrana y en la actividad específica GluAP soluble, a diferencia de las actividades específicas APB y APN solubles, que muestran un descenso significativo. La modificación de las diferentes actividades angiotensinas a nivel de la mama, conduciría a un incremento de los niveles de Ang III y una disminución de los niveles de Ang II. Por tanto, es posible que el SRA de la mama y sus efectores sean importantes reguladores de la acción pro-proliferativa de la Ang II, manteniendo las funciones propias de las angiotensinas a través de la Ang III (Figura D.2.). Así el SRA mamario podría ser considerado una nueva diana terapéutica en el tratamiento del cáncer de mama.

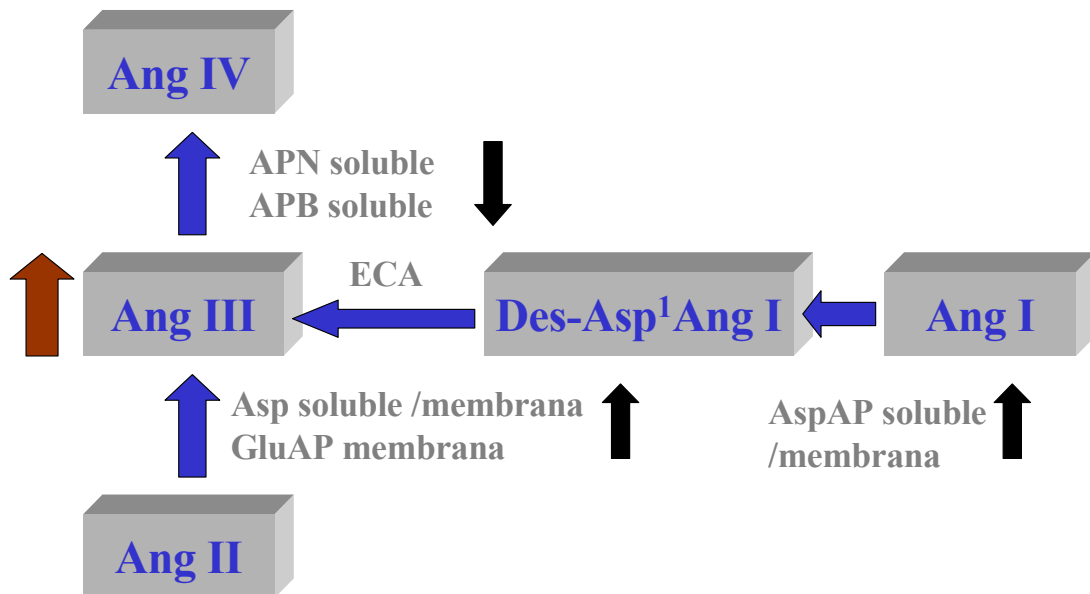


Figura D.2. Sistema renina angiotensina en glándula mamaria.

4.1.2. Sobre la actividad pirrolidón carboxipeptidasa

Como hemos comentado, el riesgo de cáncer de mama, esta fuertemente influenciado por parámetros endocrinos y reproductivos (Russo *et al.*, 2001).

También, como discutimos para el suero, en este modelo tenemos evidencias de un incremento en los niveles circulantes de GnRH debido al descenso en la actividad específica tiroliberinasa.

El aumento en los niveles de GnRH supondría un aumento en los niveles de esteroides sexuales. De hecho, se han localizado receptores, tanto para estradiol y progesterona como para prolactina y el factor de crecimiento epitelial (EGF, del inglés Epithelial Growth Factor) en tumores desarrollados en rata siguiendo este mismo modelo. La localización de receptores para estrógenos en el total de los tumores, sugiere una sensibilidad uniforme a la manipulación hormonal, es decir, hormono dependencia. En humanos, el hecho de que las células proliferantes sean distintas de aquellas que son positivas para ER y PgR, apoyan los datos que indican que los estrógenos controlan la proliferación celular por mecanismos indirectos.

En este sentido, la actividad proliferativa y el mayor porcentaje de células positivas para ER y PgR se encuentra en las estructuras lobulares tipo1. Hecho que justifica el que estas estructuras sean las que tienen un mayor grado de susceptibilidad para ser transformadas por carcinógenos *in vitro* (Russo *et al.*, 1998; Russo *et al.*, 1993), apoyando igualmente las observaciones de que las estructuras Lob 1 son el origen de carcinomas ductales (Russo *et al.*, 1990).

Sin embargo, también se ha descrito que tanto en la glándula mamaria de rata, como en humanos ARNm tanto para GnRH como para receptores de GnRH. Este péptido puede actuar de forma autocrina o paracrina, aunque, en el caso de la rata esta expresión solo ha sido detectada en ratas gestantes o lactantes, pero no en ratas vírgenes (Levi *et al.*, 1996).

En nuestro modelo de cáncer de mama, la actividad específica Pcp en la mama mostró un incremento significativo en su actividad soluble (Pcp I) y unida a membrana (Pcp II) que podría ser consecuencia de los altos niveles circulantes de GnRH, regulando de este modo su función autocrina / paracrina a nivel de la mama. En este sentido, estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio muestran un descenso notable de la

actividad Pcp II en tejido adyacente y neoplásico de pacientes con cáncer de mama, si bien la actividad Pcp soluble no muestra ningún cambio. Las diferencias en el comportamiento de dicha actividad en glándula mamaria, sugiere que modificaciones en esta enzima o en su sustrato juegan un importante papel en el cáncer de mama aunque queda por delimitar exactamente el mecanismo de acción (Martínez *et al.*, 1999).

En este sentido, el hecho de que no existan diferencias en la expresión del ARNm del receptor de GnRH entre ratas vírgenes, gestantes y lactantes, implica que la activación de los receptores de GnRH en glándula mamaria está regulada por la disponibilidad de GnRH (Levi *et al.*, 1996). Estos datos apoyarían los resultados obtenidos para la actividad Pcp en este modelo. Como veremos más adelante, la actividad Pcp hipotalámica que está, no sujeta a una regulación por estrógenos u otras hormonas, disminuye significativamente, favoreciendo el incremento de los niveles circulantes de GnRH. A modo de resumen podemos indicar que los cambios en la actividad Pcp en el tejido tumoral supone una respuesta a niveles potencialmente elevados de GnRH, que pueden modificar la función autocrina / paracrina de esta hormona a nivel de la mama (Figura D.3.).



Figura D. 3. Posible relación de las actividades Pcp hipotalámica, sérica y mamaria en la determinación de los niveles de GnRH en glándula mamaria.

4.1.3. Sobre la actividad encefalinasa

Muchos estudios han intentado definir el posible papel de los péptidos opiáceos en los procesos neoplásicos. Los primeros estudios en carcinomas mamarios inducidos químicamente mostraron que bloqueantes de los receptores de opiáceos inhiben el crecimiento tumoral (Aylsworth *et al.*, 1979). Además, estudios en ratas transplantadas con carcinomas mamarios han revelado que la liberación de péptidos opiáceos inducidos por estrés disminuyen el tiempo de supervivencia y la actividad de las células “natural killer” del hospedador. Posteriores trabajos indican que estos efectos de los péptidos opiáceos sobre las ratas con tumores son determinados a través del sistema nervioso central (Shavit *et al.*, 1986). Estudios desarrollados por Scopsi *et al.* (1989) demostraron que un alto porcentaje de carcinomas ductales primarios de mama contenían células tumorales dispersas inmunoreactivas para péptidos opiáceos con la secuencia Tyr-Gly-Gly-Phe. Por otro lado, no se ha descrito ninguna correlación entre los tumores mamarios positivos para péptidos opiáceos y los receptores de estrógenos, aunque la expresión de receptores de opiáceos en el cerebro y en el útero esta fuertemente regulada por estrógenos (Vertés *et al.*, 1986).

Otros estudios de la década de los ochenta mostraban que en neoplasmas humanos existía una alteración de la actividad de los péptidos opiáceos (Barni *et al.*, 1988). La hipótesis de que los péptidos opiáceos endógenos participaban en la regulación del crecimiento de células normales y neoplásicas, se postuló en base a una serie de observaciones experimentales, como fueron las alteraciones en el crecimiento corporal / tisular y celular y en la síntesis *in vivo* e *in vitro* de ADN, inducidos bien por antagonistas de opioides o bien por análogos sintéticos de la encefalina (Zagon y McLaughlin, 1984).

Del mismo modo, se observó que el efecto de los antagonistas opioides sobre el crecimiento estaba relacionado con, la duración del bloqueo del receptor más que con la dosis de la droga, desencadenado un crecimiento acelerado derivado de la ausencia de uniones receptor-opiáceo. Se sugiere así que los péptidos opiáceos endógenos son moléculas inhibitoras. Igual ocurre con la deceleración en el crecimiento que tiene lugar por el bloqueo de los receptores de opioides de forma intermitente (Zagon y McLaughlin, 1984). Aunque el clásico mecanismo de acción de los receptores de

péptidos opioides se conoce bien, se sabe poco acerca de los fenómenos posteriores responsables de la inhibición del crecimiento celular. La modificación de la proliferación celular por opiáceos podría deberse a una parada específica de las células en una fase determinada del ciclo celular. Esto implica la interacción de los opiáceos con un gran número de productos intermediarios de la maquinaria de señalización celular. Un análisis del ciclo celular en células de cáncer mamario, mostró que las células, en presencia de agonistas opiáceos, se bloquean en la interfase G₂ / M, debido a una interacción opiáceos / tubulina y actina. La modificación del citoesqueleto, involucrado directamente con la división celular, podría suponer un obstáculo “mecánico”, siendo esta la razón del efecto antiproliferativo de estos agonistas (Panagiotou *et al.*, 1999).

Estudios mas recientes, acerca del posible papel que pudieran desempeñar los opiáceos en la glándula mamaria sugieren un papel antiproliferativo para estos en el cáncer de mama, donde se han localizado receptores para péptidos opiáceos endógenos, tanto en tumores primarios como en líneas celulares de cáncer de mama (Hatzoglou *et al.*, 2000). En concreto, el OGF, ha sido implicado en neoplasias, controlando el ciclo celular, regulando la fase G₀ / G₁ (Zagon *et al.*, 2000).

Los resultados obtenidos para la actividad responsable de la degradación de encefalinas, en este modelo de cáncer inducido mediante N-metil nitrosourea, conduce a un aumento en los niveles de opiáceos. Como hemos visto, su papel sobre la proliferación tumoral es contradictorio, aunque el hecho de que se hayan localizado en glándula mamaria, tanto péptidos como receptores, nos hace suponer un papel para estos en dicho órgano. Aunque, y a la vista de que en casi todos los tejidos objeto de estudio de este trabajo, la actividad específica de la TyrAP da lugar a un incremento en los niveles de opiáceos endógenos, es probable que el papel primordial de las encefalinas en este modelo, se centre en el control del dolor, la analgesia y el estrés.

La LeuAP es una enzima de significativa importancia biológica y médica, ya que su actividad se ha visto alterada en algunas enfermedades como el cáncer (Umezaka, 1980). La leucina amino peptidasa humana juega un importante papel en el procesamiento de péptidos antigénicos (Beninga *et al.*, 1998), siendo la actividad sérica de dicha enzima útil como un posible marcador de respuesta a la quimioterapia (Pulido-Cejudo *et al.*, 1997).

Su implicación en el cáncer se centra en su valor pronóstico, siendo un factor de mal pronóstico de evolución de un cáncer mamario en humanos el aumento en la actividad leucina aminopeptidasa en tejido mamario neoplásico, a diferencia de su ausencia que se correlaciona con un buen pronóstico (Tsavaris *et al.*, 1988). Igualmente, trabajos desarrollados por Partanen y Syrjanen (1982) demostraron la presencia de actividad LeuAP en muestras de carcinoma ductal infiltrante, variando su actividad dentro de un mismo carcinoma, y la ausencia de correlación de esta con los valores de receptores de estrógenos y progesterona y con el grado histológico de malignidad del tumor. La actividad específica soluble LeuAP mostro un descenso en su actividad a nivel mamario.

A pesar de su posible valor pronóstico, dependiendo de su presencia en tejido mamario tumoral, su papel concreto en la glándula mamaria se desconoce y por tanto, su implicación con el cáncer de mama debe ser objeto de sucesivos estudios.

4.2. HIPOTÁLAMO

4.2.1. Sobre las actividades angiotensinas

EL cerebro de mamíferos posee un SRA, independiente del SRA periférico. Este sistema cerebral comprende todos los precursores y enzimas necesarios para la formación y metabolismo de las formas biológicamente activas de angiotensinas, así como sus receptores (Wright y Harding, 1994). Dentro de este SRA cerebral, son la Ang II y Ang III los péptidos considerados biológicamente activos, los cuales exhiben la misma afinidad por los receptores AT1 y AT2.

A pesar de que los fragmentos metabólicos de la Ang III siempre se han considerado fisiológicamente inactivos, estudios recientes han demostrado que un fragmento de dicha angiotensina posee actividades fisiológicas únicas. Este fragmento, que se une a receptores diferentes a los clásicos AT1 y AT2, se conoce como angiotensina IV (Ang IV). Esta angiotensina presenta poca afinidad por los receptores AT1 y AT2, al igual que la Ang II presenta baja afinidad por el lugar de unión de la Ang IV, el receptor AT4 (Allen *et al.*, 1998). Como ya se mencionó anteriormente, ha sido descrito recientemente una proteína que características típicas de receptor de unión AT4 y que se corresponde con la aminopeptidasa regulada por insulina (IRAP). Además,

Chansel *et al.* (1998), han demostrado que la Ang IV es degradada por la aminopeptidasa N y la dipeptidil aminopeptidasa.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran una disminución en la actividad de los enzimas implicados en la cascada proteolítica del SRA hipotalámico, es decir, tanto las actividades APN, APB y AspAP, disminuyen en el hipotálamo de los animales que desarrollaron tumores de mama tras la administración de NMU. Esto implica aumento en los niveles de Ang II hipotalámicos.

No obstante, también hemos observado un incremento significativo en esta actividad en la fracción membrana. Este comportamiento diferencial nos lleva a pensar en dos isoenzimas de diferente localización, lo que sugiere la participación de ambas formas en procesos celulares diferentes y con distintas implicaciones. Este aspecto necesita un estudio más profundo.

A pesar de que autores como Reaux *et al.* (2000), consideran que la Ang III es el principal péptido efector del SRA cerebral, se considera a la Ang II como un factor de crecimiento y con propiedades promotoras de la angiogénesis (Dostal y Baker, 1999; Opie, 1994)

Estudios inmunohistoquímicos desarrollados en cerebro de rata han proporcionado evidencias de la existencia de neuronas que contienen Ang II, especialmente en el núcleo paraventricular hipotalámico, la región periventricular y el núcleo del tracto solitario, así como en extensas rutas de fibras que contienen angiotensina (McKinley *et al.*, 2001). En varias entidades funcionales del cerebro, tales como la región preóptica o el hipotálamo, la colocalización de ARNm de receptores, lugares de unión, y terminales nerviosas inmunoreactivas para Ang II, sugiere una síntesis y expresión local de receptores de Ang II.

La Ang II juega un importante papel en la secreción hormonal. Si inyectamos en los ventrículos cerebrales, Ang II y Ang III se produce una estimulación de la liberación de hormonas hipofisarias (Wright y Harding, 1992). Así, numerosas observaciones indican que la Ang II puede contribuir a la regulación fisiológica de la secreción de prolactina, a nivel hipotalámico (Steele *et al.*, 1982) e hipofisario (Becu- Villalobos *et al.*, 1994). Así, el papel central de la Ang II es activar al sistema dopaminérgico y por tanto disminuir los niveles de PRL (Mounzih *et al.*, 1994).

A pesar del crítico papel de la PRL en el crecimiento de la glándula mamaria, su papel en el desarrollo del cáncer de mama humano aun no ha sido totalmente elucidado. Russo y Russo (1996a), definen a la PRL como la principal hormona hipofisaria en la oncogénesis mamaria espontánea cuyo desequilibrio endocrino puede ser tumorigénico en rata y ratón.

A la vista de estos resultados, es posible que frente a la progresión del cáncer de mama, favorecido por un incremento en los niveles de PRL extrahipofisarios (Ben-Jonathan *et al.*, 1996), el hipotálamo actúe frente a este estímulo disminuyendo la liberación de dicha hormona por la hipófisis, a través del SRA hipotalámico, mediante el aumento de los niveles de Ang II, por un mecanismo de retroalimentación negativo.

También es posible que la función primordial de la Ang II no resida en la modulación de la liberación de PRL, si no en aumentar la sensibilidad al efecto de los estrógenos.

EL SRA cerebral también está involucrado en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis- adrenal (HPA). La presencia de receptores de Ang II, AT1 en puntos críticos para la activación del eje HPA, tales como las neuronas CRH parvocelulares en el núcleo paraventricular hipotalámico, el núcleo cerebral con conexiones hacia el núcleo paraventricular (PVN), y células corticotropas hipofisarias, proporcionan evidencias del efecto regulador directo de la Ang II sobre la actividad de dicho eje (*Figura D.4.*).

Esto indica que la Ang II tiene, además, un papel modulador en la adaptación al estrés (Leong *et al.*, 2002), aunque no se considera que la Ang II central este involucrada en la activación aguda del eje HPA durante el estrés (Aguilera, 2003), ya que de la misma forma que la Ang II esta involucrada en la expresión de CRH en respuesta al estrés, el aumento en el número de receptores de CRH en respuesta al estrés, no se produce a través del receptor AT1 (Jezova *et al.*, 1998).

En este sentido, autores como Spinedi y Rodríguez (1986) han descrito que la Ang II hipotalámica aumenta la liberación de CRH por el hipotálamo, favoreciendo la activación del eje HPA. Además, diferentes trabajos evidencian una hiperactividad de la glándula adrenal con el cáncer de mama, pudiendo ser debido al estrés fisiológico asociado a la presencia de micrometástasis o células tumorales en la circulación (van der Pompe *et al.*, 1996).

En este sentido, no podemos dejar de citar que también es posible que el incremento en los niveles de Ang II hipotalámica en respuesta al estrés provocado por el desarrollo de la enfermedad, pudiera desencadenar, bien de forma paralela o bien de forma independiente, la activación de múltiples rutas que impliquen a otros factores hipotalámicos, modulándolos de tal modo que fueran responsables de procesos tales como el control del dolor, la respuesta inflamatoria y el efecto carcinogénico de la PRL, sino tanto por la estimulación de su liberación sí por aumentar la sensibilidad de la glándula mamaria a los estrógenos.

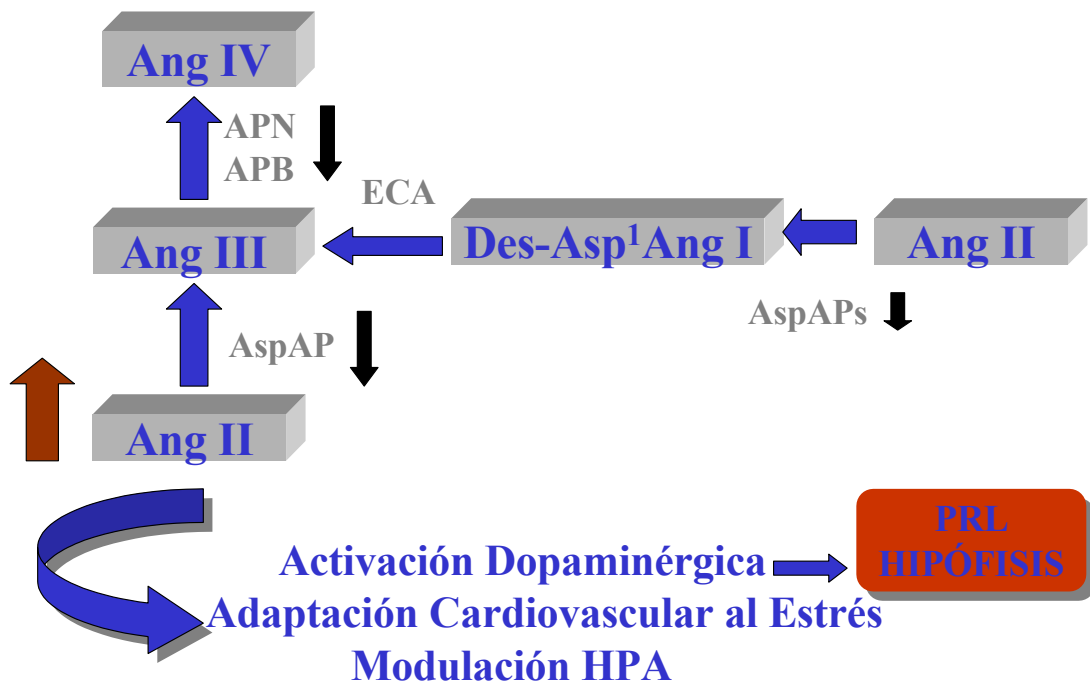


Figura D.4. Implicación del sistema renina-angiotensina hipotalámico en la modulación del eje hipotálamo-hipófisis adrenal, de la liberación de prolactina y de la respuesta al estrés.

Por otro lado, la aminopeptidasa B cuenta entre sus sustratos a nivel hipotalámico a la somatostatina (Foulon *et al.*, 1999). Este tetrapéptido está implicado de forma directa en la activación del eje GH-IGF-I. Recientes trabajos justifican un papel determinante de dicho eje en el cáncer de mama (Laban *et al.*, 2003). Hay que

tener en cuenta que autores como Yamamoto *et al.* (2003), confirman que algunos enzimas que procesan neuropéptidos contribuyen así al control de sus niveles. Por tanto, sería posible sugerir que la disminución en la actividad de la APB hipotalámica provocaría un aumento en los niveles de somatostatina y por tanto una mayor inhibición de la secreción de GH hipofisaria. Estudios desarrollados en este mismo modelo de inducción de cáncer de mama mediante NMU han puesto de manifiesto la implicación de los niveles de IGF-I en el proceso de carcinogénesis mamaria. Es conocido que la insulina, IGFs y sus correspondientes receptores, juegan un importante papel en la estimulación del crecimiento y proliferación de células mamarias normales y neoplásicas (Werner y Roith, 2000; Baserga, 1995; Rasmussen y Cullen, 1998; Yee, 1994).

Los niveles plasmáticos de IGF y de sus correspondientes proteínas de unión están modificados en pacientes diabéticos (Håring *et al.*, 1994; Clauson *et al.*, 1998), mostrando anormalidades en la regulación del sistema IGF (Gibson *et al.*, 1996; Shinada *et al.*, 2000). Cuando este modelo experimental de cáncer fue inducido en ratas diabéticas (a las que se les había inyectado estreptozotocina), estas desarrollaron tumores pero con unas características particulares; el periodo de latencia fué superior a las controles, al igual que el número de tumores desarrollados por rata y el número de tumores totales por grupo fue inferior a los controles. Se demuestra así que ratas con desordenes diabéticos muestran una supresión en el proceso de carcinogénesis mamaria, probablemente apoyado por unos niveles bajos de insulina plasmática durante dicho proceso (Cocca *et al.*, 2003).

También existen evidencias para sugerir que existe una interacción importante a varios niveles entre el eje GH-IGF -I y los estrógenos en el desarrollo mamario normal y neoplásico. Estos efectos son el resultado de la supresión de la secreción de GH, en parte por el aumento de la acción de la somatostatina (Tannenbaum *et al.*, 1992).

Pero este aumento de la somatostatina afectaría solo a la secreción de GH,. Por tanto, sería lógico pensar que la inhibición de dicho eje por aumento de somatostatina conllevaría un mayor número de tumores de naturaleza benigna y una inhibición del crecimiento de dichos tumores. Este efecto no ha sido observado en nuestro estudio, por tanto hemos de pensar en un sistema más complicado de regulación del crecimiento, cuya base deben ser los niveles de estrógenos, ya que estos actúan sobre dicho eje

durante el proceso neoplásico, favoreciéndolo (Laban *et al.*, 2003). Por tanto, la inhibición de la liberación de GH por la somatostatina puede representar sólo un mecanismo local que no afecte al desarrollo de la enfermedad o también puede ser considerado como un mecanismo de respuesta del organismo en un intento de controlar la progresión tumoral en este modelo. Lo que si parece claro es que tanto la promoción como la progresión de la enfermedad son determinadas no sólo por alteraciones sistémicas de diferentes tipos, sino también por mecanismos paracrinos / autocrinos locales en la glándula mamaria. Esta hipótesis se vería apoyada por el hecho de que aparecen tanto en mama sana como neoplásica ARNm de GH, su receptor, IGF-I y su receptor pero en niveles muy superiores en el caso de cáncer de mama (Mol *et al.*, 1995; Mertani *et al.*, 1998; Surmacz *et al.*, 1998; Ng *et al.*, 1997). Además, la expresión de IGF-I en mama neoplásica correlaciona positivamente con el grado de diferenciación del tumor (Eppler *et al.*, 2002), si bien dicha expresión es inversamente proporcional a la vascularización (Heffelfinger *et al.*, 1999). Por último, también hay que mencionar que las proteínas de unión a IGF-I las cuales tienen efectos independientes sobre el crecimiento de las células mamarias por modular la disponibilidad local y bioactividad de IGF-I (Fowler *et al.*, 2000), también se expresan en tumores de mama.

Podemos resumir, por tanto, diciendo que la Ang II hipotalámica también puede jugar un importante papel en el control de la actividad del sistema simpático-adrenomedular durante el estrés provocado por la enfermedad.

4.2.2. Sobre la actividad oxitocinasa

Una de las principales respuestas cerebrales frente al estrés, es la liberación de péptidos opiáceos. En este sentido, la influencia de los opiáceos sobre la actividad secretora de neuronas oxitocinérgicas en el núcleo supraóptico del hipotálamo ha sido estudiada en detalle en ratas.

Los opiáceos endógenos activan a sus receptores, localizados en neuronas oxitocinérgicas o en sus fibras aferentes, participando en el control de la actividad secretora de éstas células (Russell *et al.*, 1995). En este sentido y como veremos más adelante, el aumento en los niveles de opiáceos hipotalámicos por la disminución en la actividad responsable de su degradación, modulará la secreción de OT.

Los resultados mostrados en este estudio, donde la actividad oxitocinasa hipotalámica se encuentra disminuida, sugieren un aumento de los niveles de OT. El hecho de que la OT inhiba los efectos del estrés, estaría de acuerdo con un teórico efecto antiestresante.

No obstante, recientes estudios de Nakamura *et al.* (2000) demuestran que la estimulación del receptor de la OT y mediante un ruta de transducción de la señal da lugar a una translocación de la oxitocinasa intracelular a la membrana plasmática provocando un incremento en la degradación de OT en respuesta a la propia OT (Herbst *et al.*, 1997). Estos datos apoyan la existencia de un mecanismo de retroalimentación negativo de las hormonas peptídicas a nivel celular en el que el propio péptido bioactivo estimula la actividad proteasa en la membrana celular (Nakamura *et al.*, 2000) siendo el resultado final la disminución de la actividad OTasa por la propia inhibición de los niveles de OT.

En el contexto del cáncer de mama, es importante tener en cuenta que la regulación de los niveles de OT y sus receptores en hipotálamo esta influenciada por los esteroides sexuales, especialmente con el estradiol, ya que estas hormonas tienen un efecto indirecto sobre su expresión génica, posiblemente participando como factores de transcripción o como cofactores (Homeida, 1986). Así podríamos sugerir que el aumento en los niveles circulantes de estrógenos, característico del cáncer de mama, daría lugar a una disminución de la expresión de OT y por tanto de sus niveles, conduciendo de este modo también a una disminución en la actividad oxitocinasa.

La alteración en los niveles de oxitocina también pueden modificar la fisiología del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (HPT) ya que las neuronas parvocelulares oxitocinérgicas del núcleo PVN se proyectan hacia diferentes áreas dentro del hipotálamo y también hacia la eminencia media, haciendo posible que la oxitocina modifique la liberación de TRH y TSH (Petersson, 2002). En este sentido, estudios desarrollados por Petersson (2002) ponen de manifiesto que la administración intracerebroventricular de oxitocina en ratas, disminuye los niveles plasmáticos de TSH y hormonas tiroideas. No obstante otros autores como Ciosek y Stempniak (1997), en trabajos desarrollados en ratas eutiroides, no observan ningún efecto de la OT exógena

sobre la liberación de TSH y hormonas tiroideas. Este aspecto necesitaría por tanto un análisis posterior más detallado.

Por tanto, las alteraciones encontradas en la regulación de los niveles hipotalámicos de OT, por medio de su enzima degradativo la OTasa, también pueden estar implicados en los mecanismos de promoción y / o progresión del tumor de mama inducido por la administración de NMU, aunque queda sin dilucidar el mecanismo exacto de su actuación.

4.2.3. Sobre la actividad pirrolidón carboxipeptidasa

La dependencia hormonal de los tumores desarrollados por administración de NMU, indica, que la actividad Pcp puede tener un papel muy importante en la tumorigénesis a diferentes niveles, incluyendo el sistema nervioso.

Como ya hemos citado, está ampliamente descrito que una parte de la actividad Pcp cerebral de mamíferos está asociada a la membrana y se ha denominado Pcp II (Greaney *et al.*, 1980; Hayes *et al.*, 1979; Joseph-Bravo, 1979; Griffiths *et al.*, 1979, 180). La Pcp II muestra un alto grado de especificidad lo que ha llevado a los investigadores a postular que la Pcp II es responsable de la inactivación neuronal selectiva de la TRH, y que debe ser considerada la primera peptidasa específica de neuropéptido (Wilk, 1986) en contraste con la actividad Pcp I, de distribución citosólica y capaz de liberar residuos piroglutámicos N-terminales de un espectro más amplio de péptidos biológicamente activos, como la TRH, GnRH, neurotensina y bombesina (Cummins y O'Connor, 1996).

Los resultados obtenidos para el hipotálamo que muestran una disminución en la actividad Pcp junto con la disminución previamente descrita en la actividad tiroliberinasa, en este modelo de cáncer de mama, suponen un incremento en los niveles de sus sustratos endógenos; TRH y GnRH. El aumento de los niveles de GnRH, supone una mayor actividad del eje hipotálamo-hipofisario- gonadal y mamario como ya hemos descrito, al igual que en el eje HPT, mediado por la TRH.

Durante muchos años, la coincidencia entre desordenes tiroideos y el cáncer de mama, ha sido continuo objeto de estudio, buscándose un posible factor causal entre ambos procesos. La actividad del enzima Pcp podría ser un punto de unión.

Como es bien sabido, la TRH secretada por el hipotálamo estimula la liberación de TSH por la hipófisis que actúa ya en el tiroides regulando la producción de hormonas tiroideas (Reichlin *et al.*, 1978). Como veremos más adelante, el cáncer de mama inducido por NMU no provoca cambios en la actividad Pcp ni en la hipófisis ni en el tiroides. El hecho de que la actividad Pcp en tiroides no este modificada, podría indicar que es la GnRH más que la TRH el principal sustrato de la Pcp en hipotálamo, o al menos, que la Pcp esta principalmente implicada en la regulación local de los niveles de GnRH en ratas con cáncer de mama inducido por NMU.

En cualquier caso, un posible incremento en los niveles de TRH induciría mayores niveles de TSH, que podrían ser responsables de un aumento en la susceptibilidad al hipotiroidismo (Vanderpump *et al.*, 1995). De hecho, existe una tendencia a la disminución de las funciones tiroideas en pacientes con cáncer de mama debido a un incremento en los niveles de TSH y el hipotiroidismo es una de las enfermedades más observada (Stoll, 1965; Takatani *et al.*, 1989). De hecho, en la presente Tesis se describe un incremento importante del peso corporal de las ratas de forma concomitante a la aparición de los tumores, aunque el peso corporal vuelve a los niveles control tras poco tiempo, lo que podría ser consecuencia de un hipotiroidismo “transitorio”. Por lo tanto, la relación entre ambos factores de liberación hipotalámicos y la conexión entre enfermedades tiroideas y cáncer de mama puede ser consecuencia de un efecto indirecto de la actividad Pcp. Es más, se ha descrito que la Pcp representa un importante elemento regulador en la estimulación de las células dianas de la TRH (Schomburg y Bauer, 1995). Los receptores de TRH y GnRH son ambos de la familia de receptores acoplados a proteínas G del tipo $G_{q/11}$ (Hsieh y Martin, 1992; Aragay *et al.*, 1992). Así, los efectos de la TRH y la GnRH parecen estar mediados por mecanismos de transducción intracelular similares, que pueden inducir procesos de expresión génica paralelos. Cabe por tanto esperar que la inducción de la expresión génica por una hormona a su concentración máxima efectiva prevenga la posterior estimulación por otra hormona. A modo de resumen, podemos decir, que las alteraciones en la actividad Pcp a nivel local del hipotálamo, pero también a nivel sistémico, pueden ser responsables de los procesos de iniciación, promoción y / o progresión del cáncer de mama inducido por NMU a través del incremento de GnRH, y que de forma indirecta los cambios en la

actividad enzimática alteran las funciones del eje HPT por alteración de los niveles de TRH, siendo éste el mecanismo de unión entre el cáncer de mama y los desórdenes tiroideos.

4.2.4. Sobre la actividad encefalinasa

En cuanto a la enzima responsable de la degradación de encefalinas, nuestros resultados muestran un descenso significativo de su actividad en el hipotálamo de los animales que desarrollaron tumores de mama. Ésto indicaría la existencia de unos niveles elevados de encefalinas. La relevancia del papel jugado por los opiáceos, en concreto las encefalinas, en la adaptación al estrés, puede ser considerada crítica en la etiología y patología de ciertos desórdenes fisiológicos asociados con prolongadas o repetidas situaciones de estrés (Drolet, 2001), como podría ser un proceso neoplásico.

El reciente descubrimiento de la capacidad de degradación de las encefalinas por la actividad encefalinasa en el cerebro (Le Guen *et al.*, 2003) así como su localización en altas concentraciones en el núcleo paraventricular hipotalámico, sugiere que esta peptidasa puede tener un importante papel en la regulación del eje HPA (Noble *et al.*, 2001), con importantes funciones en el control del dolor, la analgesia y el estrés relacionados con el proceso tumoral como se ha discutido en apartados anteriores

Finalmente indicar, que se conoce muy poco de la actividad LeuAP, ya sea soluble o unida a membrana, a nivel hipotalámico y su posible conexión con el cáncer de mama. En este trabajo se ha observado un comportamiento opuesto en la actividad LeuAP soluble y unida a membrana que nos lleva a pensar en la existencia de dos isoenzimas con diferente localización y funciones diferentes con distintas implicaciones. El estudio de este enzima necesita una investigación más profunda.

4.3. HIPÓFISIS

Recordemos que la hipófisis anterior alberga a una población bastante heterogénea de células secretoras bien diferenciadas, agrupadas en somatotropas, que secretan GH; lactotropas, que secretan PRL, corticotropas, las cuales secretan ACTH así como otras hormonas derivadas del precursor peptídico POMC, incluyendo MSH,

lipotropinas, endorfinas y encefalinas; tiotropas, las cuales secretan TSH; y gonadotropas, que secretan LH y FSH (Daughaday, 1985; Marshall y Barkan, 1992).

4.3.1. Sobre las actividades angiotensinas

Todos los componentes del SRA están presentes en la hipófisis, existiendo una producción local de Ang II (Deschepper *et al.*, 1991). La Ang II es sintetizada fundamentalmente en las células gonadotropas (Deschepper *et al.*, 1985).

En el modelo de cáncer de mama desarrollado en este trabajo, las actividades solubles de APN y APB muestran un descenso significativo, a diferencia de la actividad APA que no se modificó. El hecho de que la actividad responsable de la degradación de la Ang II no manifieste modificación alguna en su actividad puede ser bastante significativo.

Como hemos descrito previamente a nivel hipotalámico, y como consecuencia de los cambios en las actividades angiotensinasas, se espera un aumento en los niveles de Ang II. Esta Ang II actúa a nivel hipofisario, modulando la liberación hormonal adenohipofisaria. Dicha liberación hormonal favorecería el desarrollo de la enfermedad como consecuencia de la sobreactividad de los diferentes ejes hipotálamo-hipofisarios implicados.

Como hemos comentado, los efectos de la Ang II en la hipófisis son mediados por el receptor AT_I (Saavedra *et al.*, 1992). En rata, éstos receptores sufren una marcada inhibición tras la administración de estrógenos (Krishnamurthi *et al.*, 1999), que estarían elevados en nuestro modelo, pudiendo ser esta una forma de regulación de la actividad de Ang II. Además, en ratas, existe un síntesis local hipofisaria de Ang II que también puede ser responsable de manera paracrina de la regulación de la secreción hormonal (Ganong y Murakami, 1987).

El descenso de las actividades APN y APB podría implicar unos niveles elevados de Ang III a nivel local de la hipófisis, pues hay que tener en cuenta que los SRAs hipotalámico e hipofisario participan en funciones diferentes, algunas de las cuales están relacionadas. Por tanto, el SRA adenohipofisario podría actuar de forma independiente al hipotalámico, favoreciéndose algunas funciones no conocidas mediadas por Ang III.

De hecho, Reaux *et al.* (2000) apoyan la idea de que la Ang III es el principal efector del SRA cerebral.

En este sentido, se ha sugerido, utilizando cultivos de células hipofisarias, que la inhibición de la actividad APN potencia la liberación de ACTH estimulada por CRH (Ritchie *et al.*, 2003). Nuestros resultados apoyarían la hipótesis de que las aminopeptidasas APN y APB juegan un importante papel en el metabolismo de la CRH y su función biológica y por tanto en el aumento de la actividad del eje HPA (Ritchie *et al.*, 2003). Estos resultados estaría además de acuerdo con los presentados por van der Pompe *et al.*, (1996) anteriormente mencionados, en los que los niveles de cortisol basales están elevados en mujeres con cáncer de mama debido al estrés asociado con la presencia de micrometástasis o por las células tumorales presentes en la circulación.

4.3.2. Sobre la actividad encefalinasa

Como ya hemos citado, la disminución observada en la actividad responsable de la degradación de la encefalinas supondría un aumento en los niveles de éstas, que pudiera deberse a un mecanismo adaptativo de respuesta al estrés físico derivado de la enfermedad o a un mecanismo de respuesta en un intento de controlar el crecimiento tumoral.

4.4. GLÁNDULA PINEAL

La melatonina, principal hormona producida en la glándula pineal, se considera un regulador fisiológico y neuroendocrino de un amplio espectro de procesos carcinogénicos. Así, se ha demostrado que la melatonina, y algunos de sus análogos, son eficaces en la inhibición del crecimiento de un amplio rango de neoplasmas sólidos, concretamente los tumores hormono-dependientes. Esto es debido fundamentalmente a la acción citostática de la melatonina, aunque bajo ciertas condiciones experimentales, la melatonina también puede tener efectos citotóxicos. En este sentido, numerosos estudios *in vivo* e *in vitro* han proporcionado suficientes indicios sobre los posibles mecanismos que envuelven a la acción de la melatonina como una hormona oncostática. Algunos de estos mecanismos incluyen la modulación de la expresión y

regulación de su receptor, fenómenos de señalización, procesos de transducción, control transcripcional, interacciones genómicas y procesos redox (Blask, 2001).

4.4.1. Sobre las actividades angiotensinasas.

Estudios recientes han proporcionado la primera evidencia de que el SRA local de la glándula pineal es un importante modulador del metabolismo indol pineal. Como hemos comentado anteriormente los dos principales péptidos bioactivos del SRA son la Ang II y su metabolito directo, la Ang III, que presentan la misma afinidad por los receptores de angiotensina AT1 y AT2 (Saavedra, 1992; Ganong, 1993). Tratamientos *in vivo* con antagonistas del receptor AT1 inhiben significativamente la síntesis de melatonina en la glándula pineal. En este sentido, tratamientos con Losartan en cultivos pineales, disminuyen significativamente los niveles de 5-hidroxitriptofano, serotonina, ácido acético 5-hidroxiindol, N-acetil-serotonina y melatonina. Los receptores AT1 han sido localizados en pinealocitos mediante hibridación *in situ* (Baltatu *et al.*, 1998b), sugiriendo un papel de la Ang II en el metabolismo de la melatonina. Así, el SRA local de la glándula pineal modula la síntesis de indoles a través de la actividad de la triptófano hidroxilasa (TPH) vía los receptores AT1, y por otro lado, se ha demostrado la presencia de receptores / lugares de unión melatoninérgicos vasculares; estos receptores están funcionalmente conectados con el efecto vasoconstrictor / vasodilatador de la melatonina.

Ensayos de unión al receptor y estudios de autorradiografía, indican que en la glándula pineal de mamíferos existen dos (Baltatu *et al.*, 1997) subtipos de receptores AT1; AT1a y AT1b.

Mediante estudios de hibridación *in situ* e inmunohistoquímicos se ha descrito una asociación entre la inmunorreactividad para TPH y la presencia de ARNm de AT1b en pinealocitos. Esto apoya también el papel de las angiotensinas en las funciones neurosecretoras de la glándula (Baltatu *et al.*, 1998). Además, la predominancia de AT1b sobre AT1a, indica que la estimulación del receptor subtipo AT1b participa de forma específica en procesos neuroendocrinos.

Por otro lado, la síntesis de angiotensinógeno, el único precursor de todas las angiotensinas, también se ha descrito en diferentes regiones cerebrales (Morgan *et al.*,

1996; Baltatu *et al.*, 1998a) incluyendo la glándula pineal (Baltatu *et al.*, 1998b). Además, la glándula pineal cuenta con grandes cantidades de actividad semejante a renina y de enzima convertidor de angiotensina (ACE) (Mizuno *et al.*, 1985; Haulica *et al.*, 1975; de Agostini *et al.*, 1982; Baltatu *et al.*, 1998b, Nahmod *et al.*, 1982). Las herramientas para evaluar la influencia de la glándula pineal sobre la carcinogénesis mamaria se ha basado en la administración de carcinógenos químicos a ratas, en las cuales la función pineal, y consecuentemente los niveles de melatonina, han sido modificados por exposición a diferentes fotoperíodos, o suprimidos por exposición a iluminación constante o por ablación mediante cirugía de la glándula (Cos y Sánchez-Barceló, 2000). La pinealectomía realizada varios días antes de la administración de NMU, resulta en un aumento de la tumorigénesis sobre los controles intactos (Blask y Hill, 1988).

Estos estudios demuestran que animales con la función pineal aumentada o tratados con melatonina, en contraste con aquellos pinealectomizados, sufren un incremento en el periodo de latencia, una disminución significativa en la incidencia tumoral, una reducción en el número y tamaño de los tumores, una mayor incidencia de fibroadenomas que adenocarcinomas, un menor grado de crecimiento tumoral y una mayor frecuencia de regresiones tumorales espontáneas.

El posible papel de la glándula pineal en el crecimiento y propagación de diferentes clases de tumores ha sido objeto de estudio para numerosos investigadores desde finales del siglo XX (Bartsch *et al.*, 1992; Blask, 1993; Reiter, 1988). Cohen *et al.*, (1978) fueron los primeros en sugerir que una disminución en la actividad pineal podría contribuir a la etiología del cáncer de mama, por conducir a un estado de relativo hiperestrogenismo. La base de esta hipótesis sobre el papel de la melatonina en el desarrollo del cáncer de mama, es la evidencia de que esta inhibe algunas de las hormonas gonadotropas de la hipófisis que controlan el desarrollo de la glándula mamaria y las cuales son también responsables del crecimiento de tumores. Es decir, tiene un efecto antigonadotrófico.

Por tanto, procesos que conlleven la disminución de la función de la glándula pineal y de la síntesis de melatonina deberían ser consideradas como factores que aumentan el riesgo de cáncer de mama.

El efecto oncostático de la melatonina depende de su interacción con rutas sensibles a estrógenos. En este sentido, se ha observado que la melatonina inhibe la expresión de ER α y la unión del complejo E-ER a los elementos de respuesta a estrógenos (ERE) en el ADN (Lawson *et al.*, 1992; Molis *et al.*, 1994; García -Rato *et al.*, 1999). Estudios *in vitro* han puesto de manifiesto que los efectos antiproliferativos de la melatonina están relacionados con su efecto modulador sobre el ciclo celular, ya que retarda o bloquea la progresión de las células de fase G0-G1 a fase S. Este efecto modulador de la melatonina sobre el ciclo celular podría ser explicado por el efecto de esta indolamina sobre la expresión de algunas de las proteínas que participan en el control de la transición de la fase G1-S (Sánchez-Barceló *et al.*, 2003).

Por otro lado, se han descrito múltiples papeles de la glándula a través de la producción de melatonina. Recientemente, estudios realizados tanto *in vivo* como *in vitro*, han demostrado que la melatonina es un potente aceptor de radicales hidroxilo y otros radicales libres dadores de oxígeno, protegiendo a las células de daños oxidativos (Reiter, 1995).

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran un descenso en la actividad AspAP en animales con cáncer de mama inducido por NMU que sería responsable de la modificación del SRA a través del incremento en los niveles de Ang I y Ang II.

La producción local, fundamentalmente de Ang II regula la síntesis de melatonina, de tal forma que la modificación en los niveles de Ang II supone un cambio en la producción de melatonina. En este sentido, altos niveles de Ang II podría facilitar la unión a AT1 favoreciendo la biosíntesis de melatonina.

Por tanto nuestros resultados nos conducen a un aumento en los niveles de melatonina. Pero esto supondría una inhibición o regresión del crecimiento, hecho que no hemos observado a lo largo de este estudio.

Un factor a tener en cuenta es que concentraciones superiores o inferiores de melatonina a las fisiológicas, pueden tener diferentes efectos sobre el crecimiento tumoral, es decir, su actividad antiproliferativa depende de su concentración (Sánchez-Barcelo, 2003)

Por otro lado, se ha postulado sobre un mecanismo adicional de regulación que consiste en la degradación de la melatonina vía indolamina 2,3-dioxigenasa, un enzima extrahepático que ha sido detectado en tejido tumoral y esta relacionado con la triptófano 2,3 dioxigenasa (TDO). Esta, es sintetizada sólo en el hígado, es altamente específica para L-triptófano y es inducida por glucocorticoides, lo cual podría explicar la reducción observada del triptófano plasmático resultado de la activación asociada al tumor del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (Bartsch *et al.*, 1999).

Resultados clínicos muestran que la melatonina circulante tiende a estar disminuida en pacientes con tumores primarios de diferentes tipos histológicos incluyendo tanto endocrinodependientes, como el cáncer de mama, endometrial y de próstata así como endocrino independientes, como cáncer de pulmón, gástrico, y colorectal. La eliminación quirúrgica de los tumores primarios no conduce a una normalización, indicando que un complejo sistema de cambios parece estar involucrado en la disminución de la melatonina. El descenso de los niveles circulantes de melatonina puede ser debido a una disminución en su producción o a los ciertos procesos metabólicos periféricos anteriormente descritos.

La reducción de los niveles circulantes de melatonina esta acompañada por cambios neuroendocrinos que afectan a la secreción circadiana de hormonas adenohipofisarias como la PRL, somatotropina y TSH. Estudios con animales con tumores, demostraron que la melatonina circulante nocturna esta modulada por el crecimiento del tumor. Investigaciones detalladas con tumores mamarios inducidos químicamente en ratas, mostraron que tumores de crecimiento lento y bien diferenciados que contenían células epiteliales (adenocarcinomas y carcinosarcomas) dan lugar a un aumento en la producción de melatonina por la activación del enzima que limita el paso en la biosíntesis de melatonina, serotonina N-acetiltransferasa, probablemente debido a una elevación del tono simpático en respuesta a la estimulación del sistema celular inmune por el crecimiento tumoral.

Por el contrario, la melatonina nocturna está reducida en animales con transplantes de tumores mamarios de crecimiento rápido cuando la conversión de células mioepiteliales a mesenquimales conduce a sarcomas puros. La reducción de la melatonina parece ser debida, por tanto, a una disminución en la disponibilidad del

precursor aminoácido triptófano debido a la activación inducida por glucocorticoides del enzima hepático triptófano 2,3-dioxigenasa o a una directa degradación periférica de la melatonina vía indolamina 2,3 dioxigenasa expresada en tumores y otros tejidos (Bartsch y Bartsch, 1999; Bartsch *et al.*, 1999)

Es posible así, que en este modelo de cáncer de mama exista una elevación en la síntesis de melatonina determinada por los niveles de Ang II, pero la regresión del crecimiento que debería acompañar a dicho aumento, no se observa, siendo probable una regulación de los niveles de melatonina por glucocorticoides, cuyos niveles podrían estar incrementados en este modelo como consecuencia de la estimulación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal observada en los animales que desarrollan cáncer de mama (Figura D.5.).

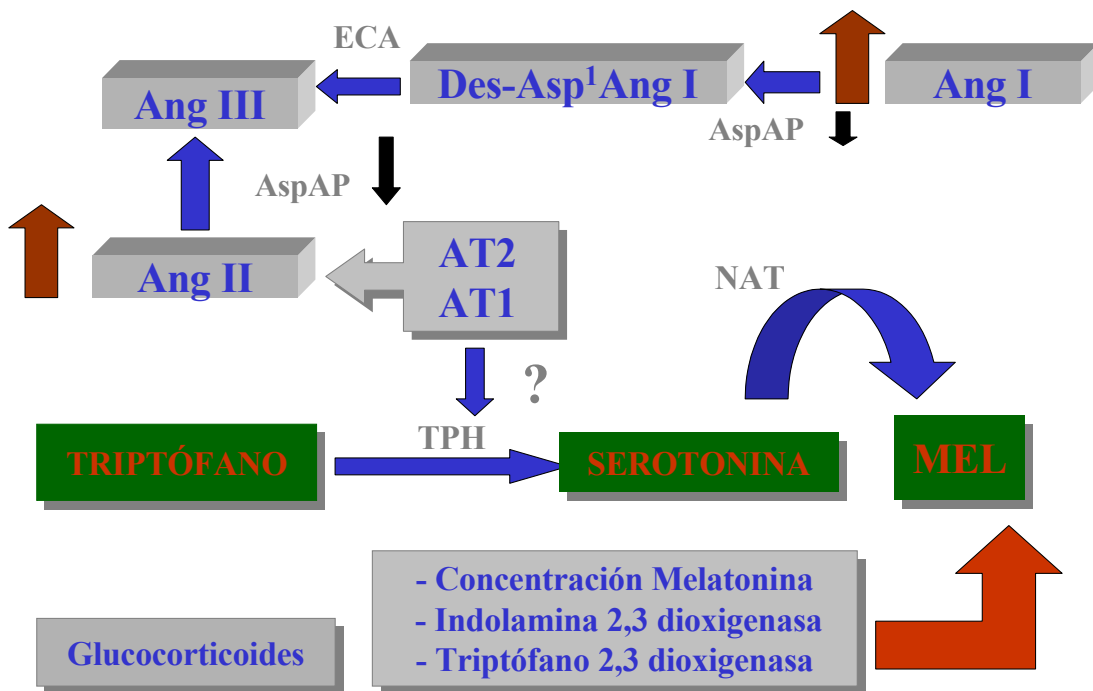


Figura D.5. Implicación del sistema renina angiotensina pineal en el metabolismo de la melatonina.

4.4.2. Sobre la actividad oxitocinasa

En los últimos años se han detectado en la glándula pineal un elevado número de péptidos, algunos de los cuales se han considerado que podrían modular la secreción de melatonina (Ebadi *et al.*, 1989; Simoneaux, 1995). Entre estos péptidos destaca la oxitocina y la vasopresina (Fisher y Fernstrom, 1981; Liu y Burbach, 1987; Liu *et al.*, 1988; Noteborn *et al.*, 1987, 1988; Gauquelin *et al.*, 1988).

Está bien documentado que la melatonina modifica la liberación de vasopresina y oxitocina desde el sistema hipotálamo-neurohipofisario en condiciones tanto *in vivo* (Juszczak, 1998; Juszczak *et al.*, 1986; Juszczak y Stempniak, 1997; Bojanowska y Forsling, 1997) como *in vitro* (Juszczak *et al.*, 1992, 1995; Yasin *et al.*, 1993). La acción de la melatonina depende de su cantidad así como, del momento del día (Yasin *et al.*, 1996). Sin embargo, el posible mecanismo responsable de la modulación de la producción de hormonas neurohipofisarias y/o secreción mediada por melatonina, no se conoce.

En el modelo de cáncer de mama propuesto para este estudio, hemos observado un descenso significativo en la actividad oxitocinasa a nivel de la glándula pineal.

Sin embargo, aunque la OT ha sido descrita en glándula pineal, poco se sabe acerca de su papel en esta localización, ni mediante qué mecanismo modularía la síntesis de melatonina (Barassin *et al.*, 2000). Por tanto, son necesarios un mayor número de estudios para esclarecer el papel de la OT en la glándula pineal y de su posible implicación con el desarrollo del cáncer de mama.

4.5. TIROIDES

El tiroides es una glándula endocrina que secreta hormonas vitales para el crecimiento y el metabolismo celular. Además de la conocida acción de la TSH en el control de la actividad del tiroides, otros factores como la hormona del crecimiento (Grunfeld *et al.*, 1988), insulina e IGF1 (Santiesteban *et al.*, 1987), juegan un importante papel regulador en la función tiroidea.

Como citábamos en la introducción, el desarrollo normal de la glándula mamaria es un proceso complejo, objeto de la influencia de múltiples hormonas como la insulina, hormona del crecimiento, esteroides, prolactina y hormonas tiroideas. A su vez, cada

una de estas hormonas está también implicada en la tumorigénesis mamaria. Debido a estas múltiples interacciones hormonales y a la ubiquidad del papel de las hormonas tiroideas en el metabolismo corporal, no es sorprendente que haya cierta confusión acerca del papel de las hormonas tiroideas en el inicio y mantenimiento del cáncer de mama (Vonderhaar, 1982b).

El papel de las hormonas tiroideas ha sido postulado desde 1896, cuando Beatson describió el uso de extractos de tiroides para el tratamiento de la metástasis del cáncer de mama. Desde entonces las alteraciones de la función tiroidea han estado asociadas a una gran incidencia de cáncer de mama (Vonderhaar, 1987, 1982a, 1982b). Sin embargo, el número de estudios es insuficiente para llegar a conclusiones definitivas sobre la relación entre ambas enfermedades, y no todos los estudios apoyan dicha relación (Vonderhaar, 1982a, 1982b).

En modelos animales, se ha observado que las hormonas tiroideas tienen un efecto directo sobre el crecimiento y diferenciación de la glándula mamaria (Lissitzky, 1990; Vonderhaar, 1987, 1984, 1982a, 1982b). Este efecto es atribuido en parte a la inducción de un incremento en la sensibilidad de los tejidos al estradiol y prolactina a través de la modulación de sus respectivos receptores.

El hecho de que la función tiroidea también afecte a la función ovárica y a la hipófisis hace difícil determinar el efecto específico de un exceso o defecto de las hormonas del tiroides sobre la promoción y progresión del cáncer de mama. Es más, aún no está claro si las hormonas tiroideas tienen una influencia positiva o negativa sobre el desarrollo normal de la glándula mamaria y aún menos en los carcinomas mamarios inducidos mediante un carcinógeno en rata (Vonderhaar, 1982b). Por otro lado, las hormonas tiroideas actúan directamente sobre la hipófisis incrementando la secreción de PRL (Meites, 1972), una hormona muy implicada en la tumorigénesis mamaria, como ya hemos citado.

4.5.1. Sobre las actividades angiotensinasas

Como hemos mencionado también anteriormente, es muy posible que en este modelo de cáncer de mama nos encontremos ante una situación de hipotiroidismo, hecho que se ve apoyado por el repentino aumento de peso corporal del grupo de

animales administrados con NMU en el momento de aparición del primer tumor. Existen algunos trabajos que confirman la relación de las hormonas tiroideas con SRA-aldosterona sistémico, de modo que el hipotiroidismo, tanto en animales como en humanos, está asociado a una disminución en la actividad de dicho sistema (Park *et al.*, 2001)

En esta disfunción tiroidea, está descrita una disminución en la concentración de angiotensinógeno plasmático, al igual que una marcada disminución en la concentración de angiotensinógeno en hígado. Como se sabe, la concentración de angiotensinógeno plasmático depende de la producción de este por el hígado y de su degradación por la renina (Ruíz *et al.*, 1987).

Sin embargo, es escasa la bibliografía referente a la existencia de un SRA local en el tiroides. Este sistema local podría estar implicado en la síntesis y / o liberación de hormonas tiroideas, participando de esta forma en el metabolismo del tiroides. Fueron Montiel y Jiménez, (1998) quienes proporcionaron la primera evidencia de receptores específicos para Ang II en la glándula tiroidea de rata. Posteriormente, Marsigliante *et al.* (2003), han confirmado que el receptor AT1 de la Ang II se expresa en el tiroides de rata. Estos autores han sido los primeros en establecer una relación entre la función del tiroides y los componentes del SRA, aunque los efectos celulares de la Ang II en los tirocitos y su señal de transducción aún no ha sido esclarecida (Marsigliante *et al.* 2003). En nuestro modelo de cáncer de mama, la actividad APN sufre una disminución, mientras que la actividad AspAP se incrementa. Por tanto, los niveles de Ang III estarían incrementados. Nuevamente se sugiere que es el paso de Ang II a Ang III el mecanismo de acción más probable para las angiotensinas, también a nivel del tiroides. No obstante, la disminución de los niveles de Ang II también puede ser un mecanismo regulador de la función biológica de la Ang II vascular, a nivel del tiroides, ya que las propias hormonas tiroideas inhiben la expresión de los receptores vasculares AT1 de la Ang II, tanto a nivel transcripcional como postranscripcional (Fukuyama *et al.*, 2003) (*Figura D.6*).

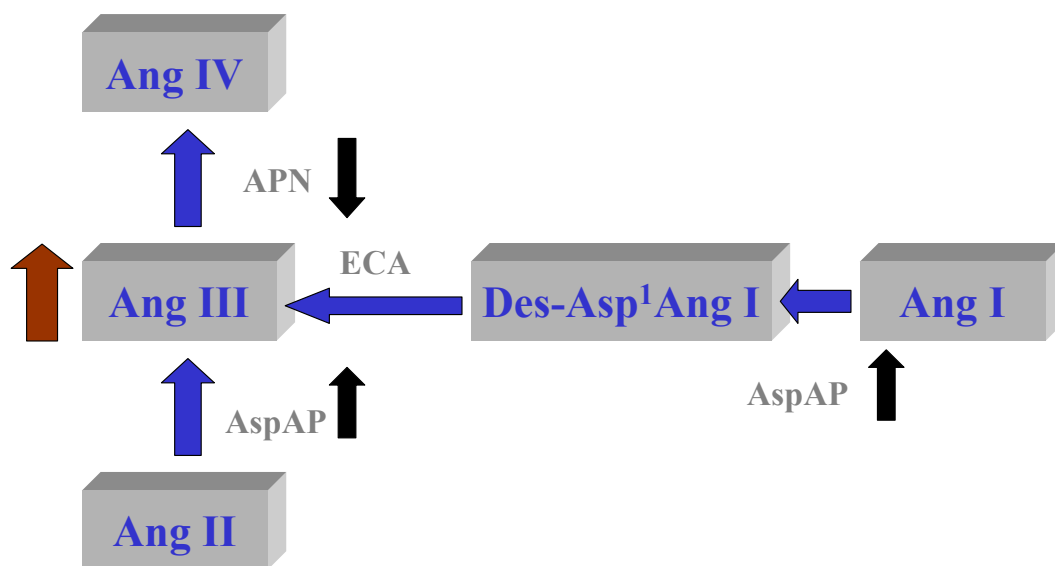


Figura D.6. Sistema renina angiotensina en glándula tiroidea en un modelo de carcinogénesis mamaria inducida mediante NMU.

4.5.2. Sobre las actividades oxitocinasa y encefalinasa

En cuanto a las actividades oxitocinasa y encefalinasa del tiroides nuestros resultados han mostrado que ambas sufren un descenso significativo en su actividad. Para nuestro conocimiento, no existe bibliografía que describa la presencia de oxitocina en el tiroides, y aún menos de su enzima reguladora, la oxitocinasa. Sí se conoce que la oxitocina está implicada en la liberación de TRH y TSH, y por tanto en la síntesis de hormonas tiroideas (Petersson, 2002). Como ya hemos comentado, Albiston *et al.*, (2001) han descrito que la aminopeptidasa regulada por insulina, conocida como IRAP, presenta características típicas de receptor de unión AT₄ y además que éste posee actividad oxitocinasa. Como los cambios con el cáncer del SRA local del tiroides, inducen a un incremento en los niveles de Ang III, (por disminución en la actividad de APN), podríamos hipotetizar que los niveles de Ang IV serían bajos, disminuyendo las uniones con su receptor y por tanto, la actividad oxitocinasa. Sin embargo, aún no se ha descrito la presencia de receptores AT₄ en la glándula tiroidea, por lo que los mecanismos que alteran la actividad OTasa a nivel del tiroides en este modelo de cáncer de mama quedan sin dilucidar.

Por otro lado, trabajos desarrollados por Josko *et al.*, 1996 han puesto de manifiesto que, en una situación de estrés, se produce una inhibición en la liberación de hormonas tiroideas, T₄ y T₃. Por tanto, es evidente que los opiáceos están involucrados en el sistema TRH-TSH-T₄/T₃, regulando la respuesta de dicho eje en una situación de estrés. En este sentido, la actividad encefalínica, sufre un descenso significativo en tiroides, conduciendo a un aumento de los niveles de encefalinas, probablemente en respuesta al estrés. No obstante, es posible que los opiáceos estén también implicados en el metabolismo de las hormonas tiroideas a nivel de dicha glándula, ya que se han descrito receptores para estos en tiroides (Freire-Garabal *et al.*, 1992). Por tanto, un posible factor que contribuya a una situación de hipotiroidismo en este modelo de carcinogénesis, sería la presencia de altos niveles de opiáceos que inhibirían la secreción de hormonas tiroideas.

4.6. GLÁNDULA ADRENAL

La glándula adrenal ha sido tradicionalmente dividida en dos entidades separadas, según estuvieran reguladas por factores humorales o neuronales: la liberación de glucocorticoides y aldosterona estaría regulada por ACTH y el sistema renina angiotensina aldosterona respectivamente (Jones, 1979), mientras que el clásico regulador de la secreción de catecolaminas de la médula adrenal es la inervación simpática colinérgica vía el nervio esplénico (Holgert *et al.*, 1998; Parker *et al.*, 1993).

4.6.1. Corteza Adrenal

El sistema circadiano, controlado por el núcleo supraquiasmático del hipotálamo, regula el ritmo diario de secreción adrenocortical. Una alteración en este ritmo está asociado a una pobre supervivencia de pacientes con cáncer de mama (Filipski *et al.*, 2002).

Así la corteza adrenal secreta fundamentalmente dos tipos principales de hormonas, glucocorticoides (cortisol y corticosterona) regulados por la ACTH hipofisaria y los mineralocorticoides (aldosterona) regulados fundamentalmente por el sistema renina angiotensina aldosterona. Además, también genera pequeñas cantidades de andrógenos.

Como consecuencia del estrés físico, se intensifica la liberación de corticosterona, así como de los péptidos opiáceos, que pueden influenciar la corteza adrenal estimulando la esteroidogénesis (Lewis *et al.*, 1985). Así, distintos trabajos han descrito que el estrés fisiológico asociado a la presencia de micrometástasis o células tumorales en la circulación (van der Pompe *et al.*, 1996) durante el cáncer de mama, es un motivo de hiperactividad de la glándula adrenal. Esta afirmación se basa en que los niveles basales de cortisol en pacientes con cáncer de mama, tanto en un estado temprano como metastásico son significativamente superiores a los niveles de mujeres sanas. Esta elevación no pareció deberse a un aumento en los niveles de ACTH plasmáticos que no mostraron diferencias entre ambos grupos.

En nuestro modelo de cáncer de mama, los cambios observados en las actividades aminopeptidasas hipotalámicas e hipofisarias, nos indican un aumento en los niveles plasmáticos de ACTH, con la consecuente estimulación de la corteza adrenal y por tanto, de la síntesis de glucocorticoides. Este efecto estaría además potenciado por la situación de estrés resultante del desarrollo de esta enfermedad, ya que prácticamente cualquier tipo de enfermedad que cause debilidad intensa genera un aumento en la liberación de glucocorticoides y en consecuencia de corticosterona.

4.6.1.1. Sobre las actividades angiotensinasas

En el presente estudio hemos mostrado que las actividades aminopeptidasas modificadas en la glándula adrenal, han sido las angiotensinasas responsables de la transformación de Ang III a Ang IV. Ambas actividades sufrieron un descenso significativo. La modificación de ambas actividades supone, por tanto, un metabolismo lento hacia Ang IV, y un aumento en los niveles de Ang III.

Aunque siempre se ha considerado que el principal inductor de la liberación de aldosterona es la Ang II, se ha observado en rata que la Ang III induce niveles de secreción de aldosterona similares a los que produce la Ang II, pero que posee escasa actividad vasopresora. Se ha sugerido por tanto, que la Ang III sea la hormona específica de la secreción de aldosterona (Hadley, 1997).

Además, y como venimos citando, el modelo de cáncer de mama inducido por NMU se caracterizaría por niveles elevados de esteroides sexuales. En glándula adrenal

se han localizado receptores de estrógenos que podrían regular la densidad de receptores AT1 y con ello la liberación de aldosterona inducida por Ang II / Ang III mediante un mecanismo postranscripcional (Zheng *et al.*, 2003). En este sentido, algunos autores describen un efecto proliferativo tanto de la Ang II como de la Ang IV sobre las células adrenocorticales de rata (Pawlikowski *et al.*, 2002) (Figura D.7.).

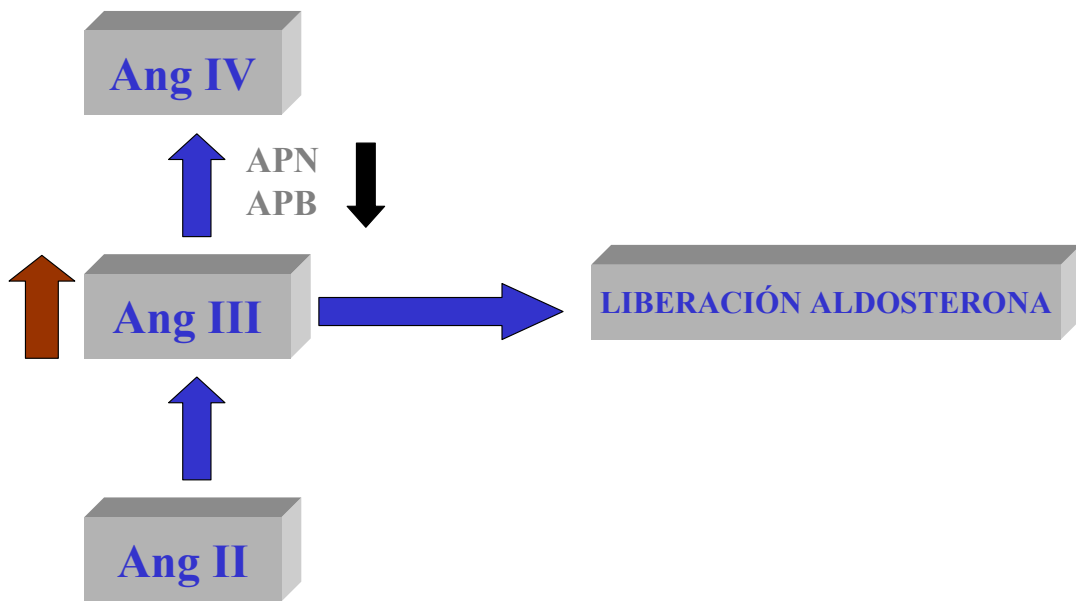


Figura D.7. Sistema renina angiotensina en corteza adrenal.

Estudios clínicos recientes han demostrado que los inhibidores de la ECA reducen, no solo el índice de mortalidad debido a enfermedades cardiovasculares, sino también el índice de muertes relacionadas con tumores (Lever *et al.*, 1998). Ya que el crecimiento tumoral depende de la angiogénesis, inhibidores de esta enzima podrían inhibir la angiogénesis y de esta forma retardar el crecimiento tumoral. Aunque existen resultados contradictorios a este respecto, ya que la inhibición de ECA no solo inhibiría la síntesis de Ang II, sino que también provocaría un descenso en los niveles de bradikinina (Warren y Loi, 1995). Esto a su vez, podría estimular la liberación de óxido nítrico endotelial (Warren y Loi, 1995), lo cual podría promocionar la angiogénesis (Fabre *et al.*, 1999; Emanuelli *et al.*, 2001; Murohara *et al.*, 1998). Hemos de tener en

cuenta que un sustrato potencial de la aminopeptidasa N es la bradikinina y en este modelo de cáncer de mama su actividad está reducida significativamente.

En cuanto a la Ang IV, su acción está mediada por el receptor AT4 o IRAP. Este receptor se identificó por primera vez en glándula adrenal bovina, aunque se encuentra ampliamente distribuido en el cerebro y órganos periféricos (Wright *et al.*, 1995). En el ensayo llevado a cabo por estos autores para determinar la actividad enzimática OTasa del receptor AT4, se utilizó como sustrato leucina- β naftilamida. Nuestros resultados en este modelo experimental de cáncer de mama muestran que la leucina aminopeptidasa sufre un descenso significativo en su actividad. Es posible que esta disminución esté relacionada con el descenso en los niveles de Ang IV. Por otro lado, el receptor AT4 presenta afinidad por otras angiotensinas, pero en menor grado, de tal forma, que además de su sustrato específico la Ang IV, la Ang III es sobre la que muestra mayor afinidad (Harding *et al.*, 1994). Así, se abre la posibilidad de que la Ang III se uniera al receptor AT4.

Por otro lado, también han sido descritos receptores para mineralocorticoides en mama sana y neoplásica, sugiriendo que podrían estar relacionados con la diferenciación ductal de carcinomas de mama (Sasano *et al.*, 1997).

Otro de los productos de la corteza adrenal son los andrógenos. Desde la última década del pasado siglo se estudia el papel de los andrógenos adrenales en la etiología del cáncer de mama. Mujeres que desarrollaron cáncer mamario en años anteriores al inicio de la menopausia, tienden a mostrar niveles plasmáticos de andrógenos adrenales inferiores a los normales, mientras que aquellas que desarrollaron esta enfermedad durante la menopausia muestran niveles superiores a los normales. Los andrógenos, a través de sus receptores, se oponen al crecimiento celular estimulado por estrógenos en mujeres premenopáusicas, mientras que en mujeres menopáusicas los andrógenos adrenales estimulan el crecimiento (Adam *et al.*, 1998).

Como sabemos, la inhibición en la producción de estrógenos proporciona una terapia efectiva para pacientes con cáncer de mama hormono dependiente. En pacientes posmenopáusicas, la aromatización de los andrógenos adrenales a estrógenos proporciona el mantenimiento de los niveles de estradiol del tumor mamario (Masamura *et al.*, 1995).

Autores como Breidert *et al.* (1996) afirman que la secreción, tanto de esteroides adrenocorticales como de catecolaminas adrenomedulares, puede ser estimulada por la Ang II. Esta angiotensina parece influenciar, no solo la función de la zona glomerulosa sino la función de la glándula adrenal completa. En contraste, ningún aumento en los glucocorticoides circulantes está asociado con condiciones patológicas o experimentales que supongan la activación del SRA (Aguilera, 2003).

4.6.2. Médula Adrenal

Fue en la década de los 80 cuando Ang y Jenkins (1984) identificaron oxitocina en la glándula adrenal de rata y humanos. Trabajos desarrollados por Gibbs *et al.* (1986) demostraron que las catecolaminas periféricas pueden estar involucradas en el control de la secreción de ACTH y, también sugiere, que la oxitocina puede tener importantes funciones paracrinas en la regulación de la secreción de catecolaminas adrenales.

4.6.2.1. Sobre la actividad oxitocinasa

Posteriormente, estudios inmunohistoquímicos llevados a cabo en la glándula adrenal de rata, hamster y vaca, han mostrado la presencia de OT tanto en la corteza como en la médula adrenal. En la corteza la inmunoreactividad fue más intensa en la zona de la glomerulosa que la zona fasciculada o reticular. En médula, sin embargo, la tinción de OT fue superior (Hawthorn *et al.*, 1987).

Se sabe que los péptidos neurohipofisarios pueden tener una función reguladora en la secreción de catecolaminas adrenales (Ang y Jenkins, 1984). Así, en rata se han descrito grupos de células medulares positivas para OT y AVP, aunque no ha sido posible asociar estos grupos celulares a grupos concretos de células cromafines. La posibilidad de que la OT tenga un papel paracrino o autocrino en el funcionamiento de la glándula adrenal es discutido (Hawthorn *et al.*, 1987). Por otro lado, ha sido sugerido un efecto proliferativo para la OT, ya que el número de células cromafines en la médula adrenal incrementa en respuesta a la OT (Popovic *et al.*, 1996).

Actualmente, debido a la poca literatura existente respecto al papel de la OT en la médula adrenal, no podemos hablar de una función concreta, ya que tampoco se han descrito puntos de unión para este nonapéptido en médula adrenal. En este sentido, se

ha descrito que la administración repetida de OT disminuye la liberación de cortisol e induce analgesia, aunque el lugar de actuación de la OT no esta claro (Legros *et al.*, 2001).



Figura D.8. Efecto de un estímulo estresante y de las hormonas esteroideas y tiroideas sobre la liberación de catecolaminas adrenales.

Nuestros resultados muestran que la actividad oxitocinasa esta disminuida de forma significativa, lo que reflejaría altos niveles de OT. Podríamos sugerir, por tanto, que la OT y su enzima reguladora en la médula adrenal, están involucradas en la liberación de catecolaminas, probablemente en respuesta a una situación de estrés (*Figura D.8.*). De hecho, se ha descrito que tras la administración de OT en médula adrenal, el contenido en adrenalina, noradrenalina y dopamina se incrementa, al igual que el número de células cromafines y de su volumen total. El paralelismo entre los cambios en el número de células cromafines y el contenido en catecolaminas sugiere un efecto mitótico de la OT (Plecas *et al.*, 1989).

4.6.2.2. *Sobre la actividad encefalinasa*

Las encefalinas también pueden localizarse en la médula adrenal. Sirva de ejemplo como los trasplantes de médula adrenal en el sistema nervioso central, sirven como potenciales reservorios de péptidos opiáceos y catecolaminas, ya que sus efectos analgésicos son útiles para el control del dolor crónico (Duplan *et al.*, 2000). Estos trasplantes de médula adrenal reducen el dolor por síntesis y secreción tanto de catecolaminas como de encefalinas (Wang *et al.*, 2000).

Así, los estímulos estresantes producen frecuentemente una estimulación neurogénica de la médula adrenal (Szalay y Stark, 1981). Las encefalinas se encuentran almacenadas en los gránulos de tejido adrenal cromafín, y resultan co-secretados en respuesta a estímulos que inducen la liberación de catecolaminas. En este sentido, la denervación de la glándula adrenal de rata, supone un aumento en las cantidades de encefalinas presentes en la glándula (Hadley, 1997). Por otro lado, se ha sugerido que las encefalinas libres podrían no ser los productos finales fisiológicamente importantes derivados de las proencefalinas, sino que serían otros péptidos derivados los que servirían como sustancias únicas de regulación fisiológica (Hadley, 1997). Así, se ha sugerido, específicamente, que las encefalinas adrenomedulares contribuyen a la disminución del dolor en situaciones graves de estrés con peligro de muerte del individuo.

Por tanto, a la vista de la importancia de la médula adrenal en relación al control del dolor y la actividad del sistema inmune, la actividad de los enzimas proteolíticos responsables de la degradación de las encefalinas son de gran importancia. Estas observaciones estarían de acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo respecto a la enzima responsable de la degradación de encefalinas. Dicha actividad se encuentra disminuida en este modelo de cáncer de mama, favoreciendo altos niveles de encefalinas, las cuales podrían estar implicadas en el control de dolor en este modelo de cáncer de mama.

4.7. OVÁRIO

El desarrollo de la glándula mamaria depende de la presencia de esteroides ováricos. Los estrógenos son críticos en el desarrollo de la glándula mamaria y también son esenciales para determinar la respuesta tumorigénica con carcinógenos químicos o físicos (Zwieten, 1984; Leclercq y Heuson, 1979).

La administración de dosis superiores a las fisiológicas de estrógenos, inducen un alto porcentaje de tumores mamarios en ratas, los cuales son predominantemente adenocarcinomas (Young y Hallowes, 1973) mientras que bajas dosis administradas durante periodos largos de tiempo inducen fibroadenomas (Geschickter, 1945).

4.7.1. Sobre las actividades angiotensinasas

El ovario es uno de los órganos en el que se ha descrito un SRA local. Entre los receptores de angiotensinas, el receptor AT2 de la Ang II, se cree que puede jugar un importante papel en la mediación o modulación de diferentes procesos intraováricos (Obermüller *et al.*, 1998), aunque también se han descrito receptores AT1.

Aunque el papel exacto de los receptores AT2 no ha sido totalmente elucidado, investigaciones de otros grupos han relacionado al receptor AT2 con efectos que conducen a acciones antiproliferativas (Stoll *et al.*, 1995) y apoptosis (Yamada *et al.*, 1996).

En este sentido, los receptores AT2 unen Ang II y Ang III con alta afinidad (Pucell *et al.*, 1991).

La unión de la Ang II puede desencadenar la neovascularización y secreción de progesterona característica del proceso de formación del cuerpo luteo (Stirling *et al.*, 1990), mientras que la acción de la Ang III actuaría, en el proceso de atrésia folicular.

Por otro lado, el aumento en las actividades angiotensinasas GluAP y AspAP, se podría considerar un mecanismo de disminución de la Ang II local. Recordemos que la Ang II es un factor promotor de la angiogénesis y estimula factores proangiogénicos (Abali *et al.*, 2002). La Ang II, como hemos mencionada antes, induce la estimulación

de sus receptores AT1, por tanto, es posible que altos niveles de Ang II induzcan la expresión de dichos receptores, a través de los cuales media su efecto angiogénico. Por tanto, podríamos plantear la hipótesis de que el SRA ovárico reacciona acelerando el metabolismo hacia Ang III, evitando un exceso en la expresión de receptores AT1 a los que pueda unirse la Ang II y Ang III, lo que facilitaría el desarrollo de la enfermedad.

4.7.2. Sobre la actividad oxitocinasa

El ovario ha sido descrito como órgano que contiene OT y puede ser un punto local de producción de OT (Ivell y Richter, 1984). En concreto, las células luteas producen OT, aunque también pueden ser dianas de la acción de dicho nonapéptido. La liberación de progesterona y OT lutea ocurre en pulsos rigurosamente acoplados. *In vivo*, la OT y la prostaglandina PGF_{2 α} estimulan la liberación de progesterona y estradiol, y el estradiol así mismo, estimula la rápida liberación de progesterona. Por tanto, podríamos hablar de un circuito intraluteal que relaciona los efectos paracrinós del estradiol, la OT y la PGF_{2 α} (Gimpl y Fahrenholz, 2001). Nuestros resultados muestran un descenso de la actividad OTasa que implicaría un aumento de los niveles de OT, que serían responsables de potenciar el efecto carcinogénico de los estrógenos ovárico. No obstante, la producción de OT en la fase lutea de mujeres premenopáusicas y mujeres no lactantes pueden proteger contra altos índices de división celular mamaria mediante el posible bloqueo de los efectos de los estrógenos. Por tanto el delicado equilibrio entre las propiedades protectoras / tumorigénicas de la OT debe estar alterado como consecuencia de la enfermedad.

4.7.3. Sobre la actividad pirrolidón carboxipeptidasa

En ovario, hemos observado un aumento en la actividad específica Pcp soluble.

El descenso de la actividad Pcp hipotalámica y sérica que hemos sugerido anteriormente supondría un aumento en los niveles de GnRH y con ello, de hormonas esteroideas circulantes, lo que favorecería a su vez el desarrollo de la enfermedad. De este modo, el aumento en la actividad Pcp ovárica implicaría niveles locales inferiores

de GnRH, probablemente como un mecanismo de regulación de las funciones locales de la GnRH a nivel del ovario.

4.7.4. Sobre la actividad encefalinasa

En el modelo de cáncer de mama presentado en el presente trabajo, postulamos que los niveles de opiáceos se encuentran, en general aumentados porque la actividad responsable de su degradación muestra una actividad disminuida. Igual ocurre en ovario. Como hemos descrito anteriormente, el aumento en los niveles de opiáceos es un mecanismo de respuesta al estrés. No obstante, los niveles de opiáceos sufren modificaciones dependiendo de la fase del ciclo estral, ya que las fluctuaciones de las hormonas ováricas pueden modular sus niveles (Hulse *et al.*, 1984). Por tanto, el cáncer de mama también provoca una alteración de las funciones de las encefalinas en la regulación de la fisiología del ovario.

4.8. ÚTERO

4.8.1. Sobre las actividades angiotensinasas

A nivel uterino se ha descrito la presencia de un SRA local en ratas (Squires *et al.*, 1992). Estudios desarrollados por Pawlikowski *et al.*, 1999, han intentado determinar el papel del SRA en la proliferación celular del epitelio uterino. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que la Ang IV induce un incremento en la proliferación celular del epitelio, y este efecto no es bloqueado por Losartan. Igualmente, la Ang II también induce un incremento en la proliferación celular uterina. Por otro lado, la mayor proporción de angiotensina existente en tejido uterino es Ang III, pudiendo igualmente estar involucrada en el metabolismo uterino (Naruse *et al.*, 1985).

En este sentido, han sido localizados receptores AT1 y AT2 en tejido vascular uterino (Zwart *et al.*, 1998). Autores como Abdalla *et al.* (2001) afirman que el receptor AT2 se une directamente al receptor AT1, antagonizando la función vasopresora de la Ang II. Es decir, modula las funciones de la Ang II a través de la unión al receptor AT1, a través del cual ejerce la mayoría de sus funciones, como es bien sabido.

Los resultados de nuestro estudio muestran solamente cambios en la actividad AspAP, que incrementa en la fracción soluble, favoreciendo unos niveles aumentados de Ang III. El cáncer de mama provoca, también en útero, la potenciación de las funciones de la Ang III, relacionadas, probablemente, con los procesos de vascularización y / o proliferación celular del epitelio uterino.

.oOo.

VII. CONCLUSIONES

Primera: El cáncer de mama en ratas inducido por N-metil nitrosourea provoca la modificación de la actividad específica de diversas enzimas proteolíticas reguladoras de hormonas peptídicas con importantes funciones autocrinas/paracrinas. Estas modificaciones se manifiestan no solo a nivel de la mama, sino también en el suero y a nivel de diferentes sistemas endocrinos.

Segunda: En el suero, las modificaciones de las actividades angiotensinasas, oxitocinasa, pirrolidón carboxipeptidasa y encefalinasa, en ratas con cáncer de mama inducido por N-metil nitrosourea, sugieren una disminución de los niveles de angiotensina II, oxitocina y encefalinas, y un aumento de los niveles de Ang IV y GnRH con la enfermedad. Además, el hecho de que el receptor AT4 para la Ang IV muestre actividad oxitocinasa, sugiere la existencia de una conexión entre un sistema renina-angiotensina local a nivel de mama y el sistema oxitocina-receptores de oxitocina-oxitocinasa, que estaría implicado en el desarrollo y progresión del cáncer de mama, de forma, además, dependiente de estrógenos.

Tercera: A nivel local de la mama, las modificaciones de las actividades angiotensinasas, pirrolidón carboxipeptidasa y encefalinasa, en ratas con cáncer de mama inducido por N-metil-nitrosourea, sugieren un aumento de los niveles de angiotensina III y encefalinas, y la rápida degradación de los elevados niveles de GnRH circulante, que estarían implicados en los procesos de promoción y/o progresión de la enfermedad.

Cuarta: A nivel del eje hipotálamo-hipófisis, las modificaciones de las actividades angiotensinasas, oxitocinasa, pirrolidón carboxipeptidasa y encefalinasa en ratas con cáncer de mama inducido por N-metil

nitrosourea, sugieren la existencia de alteraciones en distinta dirección de los niveles de angiotensinas, oxitocina, GnRH y encefalinas, que pueden ser responsables de alterar los mecanismos de regulación de la secreción hipofisaria de distintas hormonas con importantes funciones en los procesos de promoción y/o progresión del cáncer de mama, encontrándose alterada la función de las glándulas endocrinas a las que regulan, como son el tiroides, las glándulas adrenales o las gónadas.

Quinta: A nivel de la glándula pineal, las modificaciones de las actividades angiotensinasas y oxitocinasa en ratas con cáncer de mama inducido por N-metil nitrosourea, sugieren un aumento en los niveles de angiotensina II y una disminución de los niveles de oxitocina, que podrían ser responsables de una mayor producción de melatonina, lo que soportaría un mecanismo de defensa para evitar la promoción y/o progresión del cáncer de mama.

Sexta: La patogénesis del cáncer de mama en rata, estudiada utilizando un modelo de inducción de tumores por la administración de N-metil-nitrosourea, implica a un gran número de sistemas hormonales tanto endocrinos como autocrinos y paracrinos, que modifican la fisiología del organismo en distinta dirección, siendo sus efectos más visibles la aparición de los tumores de mama.

Séptima: La inducción de tumores de mama en rata mediante la administración de N-metil nitrosourea es un método adecuado para el estudio del papel de los enzimas proteolíticos reguladores como marcadores biológicos de la enfermedad, y del papel de las hormonas peptídicas a las que regulan, en la promoción y progresión del cáncer de mama.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFIA

Abali H, Gullu IH, Engin H, Haznedaroglu IC, Erman M, Tekuzman G 2002 Old antihypertensives as novel antineoplastics: angiotensin-I-converting enzyme inhibitors and angiotensin II type 1 receptor antagonists. *Med Hypotheses* 59:344-8

AbdAlla S, Lothar H, Abdel-tawab AM, Quitterer U 2001 The angiotensin II AT2 receptor is an AT1 receptor antagonist. *J Biol Chem* 276:39721-6

Adamopoulos DA, Vassilaros S, Kapolla N, Papadiamantis J, Georgiakodis F, Michalakis A 1986 Thyroid disease in patients with benign and malignant mastopathy. *Cancer* 57:125-8

Adams JB 1998 Adrenal androgens and human breast cancer: a new appraisal. *Breast Cancer Res Treat* 51:183-8

Adrian LH 1997 Antiangiogenesis for cancer therapy *Lancet* 349:13-15

Adlercreutz H, Gorbach SL, Goldin BR, Woods MN, Dwyer JT, Hamalainen E 1994 Estrogen metabolism and excretion in Oriental and Caucasian women. *J Natl Cancer Inst* 86:1076-82

Aguilera G 2003 *Handbook of Experimental Pharmacology. Vol II Angiotensin*

Ahmad S, Wang L, Ward PE 1992 Dipeptidyl(amino)peptidase IV and aminopeptidase M metabolize circulating substance P in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 260:1257-61

Akil H, Watson SJ, Young E, Lewis ME, Khachaturian H, Walker JM 1984 Endogenous opioids: biology and function. *Annu Rev Neurosci* 7:223-55

Albiston AL, McDowall SG, Matsacos D, Sim P, Clune E, Mustafa T, Lee J, Mendelsohn FA, Simpson RJ, Connolly LM, Chai SY 2001 Evidence that the angiotensin IV (AT(4)) receptor is the enzyme insulin-regulated aminopeptidase. *J Biol Chem* 276:48623-6

Allegra M, Reiter RJ, Tan DX, Gentile C, Tesoriere L, Livrea MA 2003 The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. *J Pineal Res* 34:1-10

Allen AM, Moeller I, Jenkins TA, Zhuo J, Aldred GP, Chai SY, Mendelsohn FA 1998 Angiotensin receptors in the nervous system. *Brain Res Bull* 47:17-28

Allred DC, Mohsin SK, Fuqua SA 2001 Histological and biological evolution of human premalignant breast disease. *Endocr Relat Cancer* 8:47-61

Amaral SL, Roman RJ, Greene AS 2001 Renin gene transfer restores angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in Dahl S rats. *Hypertension* 37:386-90

Anderson E 2002 The role of oestrogen and progesterone receptors in human mammary development and tumorigenesis. *Breast Cancer Res* 4:197-201

Anderson TJ, Ferguson DJ, Raab GM 1982 Cell turnover in the "resting" human breast: influence of parity, contraceptive pill, age and laterality. *Br J Cancer* 46:376-82

Andrade SP, Cardoso CC, Machado RD, Beraldo WT 1996 Angiotensin-II-induced angiogenesis in sponge implants in mice. *Int J Microcirc Clin Exp* 16:302-7

Ang VT, Jenkins JS 1984 Neurohypophysial hormones in the adrenal medulla. *J Clin Endocrinol Metab* 58:688-91

Anson ML 1938 The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J Gen Physiol* 22: 79-89

Aragay AM, Katz A, Simon MI 1992 The G alpha q and G alpha 11 proteins couple the thyrotropin-releasing hormone receptor to phospholipase C in GH3 rat pituitary cells. *J Biol Chem* 267:24983-8

Arnauld E, Wattiaux JP, Arsaut J, Rostene W, Vincent JD 1993 Alterations in vasopressin and oxytocin messenger RNA in the rat supraoptic nucleus during dehydration-rehydration evaluated by in situ hybridization and northern blotting. *Neurosci Lett* 149:177-81

Aylsworth CF, Hodson CA, Meites J 1979 Opiate antagonists can inhibit mammary tumor growth in rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 161:18-20

Azad N, Emanuele NV, Halloran MM, Tentler J, Kelley MR 1991 Presence of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) mRNA in rat spleen lymphocytes. *Endocrinology* 128:1679-81

Azad N, Uddin S, La Paglia N, Kirsteins L, Emanuele NV, Lawrence AM, Kelley MR 1993 Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) in rat prostate: characterization of LHRH peptide, messenger ribonucleic acid expression, and molecular processing of LHRH in intact and castrated male rats. *Endocrinology* 133:1252-7

Backwinkel K, Jackson AS 1964 Some features of breast cancer and thyroid deficiency. Report of 280 cases. *Cancer* 17:1174-6

Balog T, Marotti T, Sverko V, Marotti M, Krolo I, Rocic B, Karapanda N 2003 Enkephalin degrading enzymes in pheochromocytoma patients. *Oncol Rep* 10:253-8

Baltatu O, Bader M, Ganten D (a) 1998 Brain and renin angiotensin system. In: 100 years of renin angiotensin system (Nicholls, MG Ikram H, Brunner H, Walker F, Sweet C eds.) Hughes Associates, Oxford, 167-170

Baltatu O, Lippoldt A, Hansson A, Ganten D, Bader M (b)1998 Local renin-angiotensin system in the pineal gland. *Brain Res Mol Brain Res* 54:237-42

Baltatu O, Nishimura H, Hoffmann S, Stoltenburg G, Haulica ID, Lippoldt A, Ganten D, Urata H 1997 High levels of human chymase expression in the pineal and pituitary glands. *Brain Res* 752:269-78

Baram T, Koch Y, Hazum E, Fridkin M 1977 Gonadotropin-releasing hormone in milk. *Science* 198:300-2

Barassin S, Kalsbeek A, Saboureau M, Bothorel B, Vivien-Roels B, Malan A, Buijs RM, Pevet P 2000 Potentiation effect of vasopressin on melatonin secretion as determined by trans-pineal microdialysis in the Rat. *J Neuroendocrinol* 12:61-8

Barni S, Lissoni P, Rovelli F, Crispino S, Paolorossi F, Esposti D, Esposti G, Fraschini F, Tancini G 1988 Alteration of opioid peptide circadian rhythm in cancer patients. *Tumori* 74:357-60

Barrett AJ, McDonald JK 1986 Nomenclature: protease, proteinase and peptidase. *Biochem J* 237:935

Barrett AJ, Rawlings ND 1995 Families and clans of serine peptidases. *Arch Biochem Biophys* 318:247-50

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

Bartsch C, Bartsch H 1999 Melatonin in cancer patients and in tumor-bearing animals. *Adv Exp Med Biol* 467:247-64

Bartsch C, Bartsch H, Buchberger A, Stieglitz A, Effenberger-Klein A, Kruse-Jarres JD, Besenthal I, Rokos H, Mecke D 1999 Serial transplants of DMBA-induced mammary tumors in Fischer rats as a model system for human breast cancer. VI. The role of different forms of tumor-associated stress for the regulation of pineal melatonin secretion. *Oncology* 56:169-76

Bartsch C, Bartsch H, Schmidt A, Ilg S, Bichler KH, Fluchter SH 1992 Melatonin and 6-sulfatoxymelatonin circadian rhythms in serum and urine of primary prostate cancer patients: evidence for reduced pineal activity and relevance of urinary determinations. *Clin Chim Acta* 209:153-67

Baserga R 1995 The insulin-like growth factor I receptor: a key to tumor growth? *Cancer Res* 55:249-52

Bauer K 1987 Adenohypophyseal degradation of thyrotropin releasing hormone regulated by thyroid hormones. *Nature* 330:375-7

Bauer K 1988 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

Baulieu E-E, Kelly PA 1990 eds. *Hormones: from molecules to disease*. New York, Chapman and Hall

Becu-Villalobos D, Lacau-Mengido IM, Thyssen SM, Diaz-Torga GS, Libertun C 1994 Effects of LHRH and ANG II on prolactin stimulation are mediated by hypophysial AT1 receptor subtype. *Am J Physiol* 266:E274-8

Behal FJ, Klein RA, Dawson FB 1966 Separation and characterization of aminopeptidase and arylamidase components of human liver. *Arch Biochem Biophys* 115: 545-554

Belchetz PE, Plant TM, Nakai Y, Keogh EJ, Knobil E 1978 Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypophthalamic gonadotropin-releasing hormone. *Science* 202:631-3

Bell L, Madri JA 1990 Influence of the angiotensin system on endothelial and smooth muscle cell migration. *Am J Pathol* 137:7-12

Ben-Jonathan N, Mershon JL, Allen DL, Steinmetz RW 1996 Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocr Rev* 17:639-69

Beninga J, Rock KL, Goldberg AL 1998 Interferon-gamma can stimulate post-proteasomal trimming of the N terminus of an antigenic peptide by inducing leucine aminopeptidase. *J Biol Chem* 273:18734-42

Bernstein L, Ross RK 1993 Endogenous hormones and breast cancer risk. *Epidemiol Rev* 15:48-65

Berseth CL, Michener SR, Nordyke CK, Go VL 1990 Postpartum changes in pattern of gastrointestinal regulatory peptides in human milk. *Am J Clin Nutr* 51:985-90

Bhagwat SV, Lahdenranta J, Giordano R, Arap W, Pasqualini R, Shapiro LH 2001 CD13/APN is activated by angiogenic signals and is essential for capillary tube formation. *Blood* 97:652-9

Bisignani GJ, McLaughlin PJ, Ordille SD, Beltz MS, Jarowenko MV, Zagon IS 1999 Human renal cell cancer proliferation in tissue culture is tonically inhibited by opioid growth factor. *J Urol* 162:2186-91

Blalock JE, Costa O 1989 Immune neuroendocrine interactions: implications for reproductive physiology. *Ann N Y Acad Sci* 564:261-6

Blask DE 2001 An overview of the neuroendocrine regulation of experimental tumor growth by melatonin and its analogues and the therapeutic use of melatonin in oncology In: *The Pineal Gland and Cancer* (Bartsch C, Bartsch H, Blask DE, Cardinali DP, Hrushesky WJM, Mecke D eds). Springer, 309-342

Blebea J, Mazo JE, Kihara TK, Vu JH, McLaughlin PJ, Atnip RG, Zagon IS 2000 Opioid growth factor modulates angiogenesis. *J Vasc Surg* 32:364-73

Bojanowska E, Forsling ML 1997 The effects of melatonin on vasopressin secretion in vivo: interactions with acetylcholine and prostaglandins. *Brain Res Bull* 42:457-61

Bradford MM 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-54

- Breidert M, Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, Scherbaum WA, Holst JJ** 1996 Angiotensin II regulates both adrenocortical and adrenomedullary function in isolated perfused pig adrenals. *Peptides* 17:287-92
- Brem SS, Jensen HM, Gullino PM** 1978 Angiogenesis as a marker of preneoplastic lesions of the human breast. *Cancer* 41:239-44
- Brooks CM, Koizumi K** 1980 The hypothalamus and control of integrative processes. In: *Medical Physiology* (Mountcastle VB, ed). St. Louis, MO, C.V.Mosby 1, 923-947
- Brzezinski A** 1997 Melatonin in humans. *N Engl J Med* 336:186-95
- Bussolati G, Cassoni P, Ghisolfi G, Negro F, Sapino A** 1996 Immunolocalization and gene expression of oxytocin receptors in carcinomas and non-neoplastic tissues of the breast. *Am J Pathol* 148:1895-903
- Bussolati G, Cassoni P, Negro F, Stella A, Sapino A** 1995 Effect of oxytocin on breast carcinoma cell growth. *Adv Exp Med Biol* 395:553-4
- Calaf G, Alvarado ME, Bonney GE, Amfoh KK, Russo J** 1995 Influence of lobular development on breast epithelial cell proliferation and steroid hormone receptor content *Int J Oncol* 7: 1285-1288
- Cassoni P, Marrocco T, Deaglio S, Sapino A, Bussolati G** 2001 Biological relevance of oxytocin and oxytocin receptors in cancer cells and primary tumors. *Ann Oncol* 12 Suppl 2:S37-9
- Cassoni P, Sapino A, Negro F, Bussolati G** 1994 Oxytocin inhibits proliferation of human breast cancer cell lines. *Virchows Arch* 425:467-72
- Chansel D, Czekalski S, Vandermeersch S, Ruffet E, Fournie-Zaluski MC, Ardaillou R** 1998 Characterization of angiotensin IV-degrading enzymes and receptors on rat mesangial cells. *Am J Physiol* 275:F535-42
- Chatterton RT** 1971 Progesterone and mammary gland development. In: *The sex steroids* (McKerns KW, ed). New York, Appleton-Century-Crofts

Chen A, Laskar-Levy O, Koch Y 1999 Selective expression of neuropeptides in the rat mammary gland: somatostatin gene is expressed during lactation. *Endocrinology* 140:5915-21

Chen WY, Ramamoorthy P, Chen N, Sticca R, Wagner TE 1999 A human prolactin antagonist, hPRL-G129R, inhibits breast cancer cell proliferation through induction of apoptosis. *Clin Cancer Res* 5:3583-93

Cheung HS, Cushman DW 1971 A soluble aspartate aminopeptidase from dog kidney. *Biochim Biophys Acta* 242:190-3

Cidlowski JA, Muldoon TG 1975 Modulation by thyroid hormones of cytoplasmic estrogen receptor concentrations in reproductive tissues of the rat. *Endocrinology* 97:59-67

Ciosek J, Stempniak B 1997 The influence of vasopressin or oxytocin on thyroid-stimulating hormone and thyroid hormones' concentrations in blood plasma of euthyroid rats. *J Physiol Pharmacol* 48:813-23

Clarke RB, Howell A, Anderson E 1997 Estrogen sensitivity of normal human breast tissue in vivo and implanted into athymic nude mice: analysis of the relationship between estrogen-induced proliferation and progesterone receptor expression. *Breast Cancer Res Treat* 45:121-33

Clarke RB, Howell A, Potten CS, Anderson E 1997 Dissociation between steroid receptor expression and cell proliferation in the human breast. *Cancer Res* 57:4987-91

Clauson PG, Brismar K, Hall K, Linnarsson R, Grill V 1998 Insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-1 in a representative population of type 2 diabetic patients in Sweden. *Scand J Clin Lab Invest* 58:353-60

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

Coffey JW, De Duve C 1968 Digestive activity of lysosomes. I. The digestion of proteins by extracts of rat liver lysosomes. *J Biol Chem* 243:3255-63

Cohen M, Lippman M, Chabner B 1978 Role of pineal gland in aetiology and treatment of breast cancer. *Lancet* 2:814-6

- Coleman MP, Reiter RJ** 1992 Breast cancer, blindness and melatonin. *Eur J Cancer* 28:501-3
- Cooper MD, Mulvaney D, Coutinho A, Cazenave PA** 1986 A novel cell surface molecule on early B-lineage cells. *Nature* 321:616-8
- Copland JA, Jeng YJ, Strakova Z, Ives KL, Hellmich MR, Soloff MS** 1999 Demonstration of functional oxytocin receptors in human breast Hs578T cells and their up-regulation through a protein kinase C-dependent pathway. *Endocrinology* 140:2258-67
- Cos S, Blask DE, Lemus-Wilson A, Hill AB** 1991 Effects of melatonin on the cell cycle kinetics and "estrogen-rescue" of MCF-7 human breast cancer cells in culture. *J Pineal Res* 10:36-42
- Cos S, Fernandez R** 2000 Melatonin effects on intercellular junctional communication in MCF-7 human breast cancer cells. *J Pineal Res* 29:166-71
- Cos S, Fernandez R, Guezmes A, Sanchez-Barcelo EJ** 1998 Influence of melatonin on invasive and metastatic properties of MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res* 58:4383-90
- Cos S, Mediavilla MD, Fernandez R, Gonzalez-Lamuno D, Sanchez-Barcelo EJ** 2002 Does melatonin induce apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells in vitro? *J Pineal Res* 32:90-6
- Cos S, Sanchez-Barcelo EJ (a)** 2000 Melatonin and mammary pathological growth. *Front Neuroendocrinol* 21:133-70
- Cos S, Sanchez-Barcelo EJ (b)** 2000 Melatonin, experimental basis for a possible application in breast cancer prevention and treatment. *Histol Histopathol* 15:637-47
- Coto-Montes A, Tomas-Zapico C, Escames G, Leon J, Rodriguez-Colunga MJ, Tolivia D, Acuna-Castroviejo D** 2003 Specific binding of melatonin to purified cell nuclei from mammary gland of swiss mice: day-night variations and effect of continuous light. *J Pineal Res* 34:297-301
- Cummins PM, O'Connor B** 1996 Bovine brain pyroglutamyl aminopeptidase (type-1): purification and characterisation of a neuropeptide-inactivating peptidase. *Int J Biochem Cell Biol* 28:883-93

Cummins PM, O'Connor B 1998 Pyroglutamyl peptidase: an overview of the three known enzymatic forms. *Biochim Biophys Acta* 1429:1-17

Daniel CW, Silberstein GB 1987 Postnatal development of the rodent mammary gland. In: *The mammary gland* (Neville MC, Daniel CW, eds). New York, Plenum Press, 3-36

Daniel CW, Silberstein GB, Strickland P 1987 Direct action of 17 beta-estradiol on mouse mammary ducts analyzed by sustained release implants and steroid autoradiography. *Cancer Res* 47:6052-7

Daughaday WH 1985 A new treatment for an old disease. *N Engl J Med* 313:1604-5

Davies TF 1994 The thyrotropin receptors spread themselves around. *J Clin Endocrinol Metab* 79:1232-3

Dávila-García MI, Azmitia EC 1990 Neuropeptides as positive or negative neuronal growth regulatory factors: effects of ACTH and leu-enkephalin on cultured serotonergic neurons. *Adv Exp Med Biol* 265:75-92

De Agostini A, Reinharz A, Vallotton MB 1982 Renin-like and cathepsin D activities in bovine pineal glands. *Neuroendocrinology* 35:457-63

Dembinski TC, Shiu RPC 1987 Growth factors in mammary gland development and function. In: *The mammary gland* (Neville MC, Danile CW, eds). New York: Plenum Press 355-382

De Paepe B, Verstraeten VL, De Potter CR, Vakaet LA, Bullock GR 2001 Growth stimulatory angiotensin II type-1 receptor is upregulated in breast hyperplasia and in situ carcinoma but not in invasive carcinoma. *Histochem Cell Biol* 116:247-54

De Paepe B, Verstraeten VM, De Potter CR, Bullock GR 2002 Increased angiotensin II type-2 receptor density in hyperplasia, DCIS and invasive carcinoma of the breast is paralleled with increased iNOS expression. *Histochem Cell Biol* 117:13-9

Delmas B, Gelfi J, L'Haridon R, Vogel LK, Sjostrom H, Noren O, Laude H 1992 Amino peptidase N is a major receptor for the entero-pathogenic coronavirus TGEV. *Nature* 357:417-20

Deschepper CF, Ganong WF 1991 Distribution of angiotensinogen immunoreactivity in rat anterior pituitary glands. *Proc Soc Exp Biol Med* 197:304-9

Deschepper CF, Seidler CD, Steele MK, Ganong WF 1985 Further studies on the localization of angiotensin-II-like immunoreactivity in the anterior pituitary gland of the male rat, comparing various antisera to pituitary hormones and their specificity. *Neuroendocrinology* 40:471-5

Dickson RB, Bano M, Johnson MD, Shi YE, Martínez-Lacaci I, Amundadottir LT, Ziff B, Kurebayashi J 1994 Steroid regulation of growth factors and protooncogenes in the normal and malignant mammary gland. In: *Protooncogenes and growth factors in steroid hormone induced growth and differentiation* (Khan SA, Stancel GM, eds). Boca Raton, FL, CRC Press, 143-174

Dickson RB, Huff KK, Spencer EM, Lippman ME 1986 Induction of epidermal growth factor-related polypeptides by 17 beta-estradiol in MCF-7 human breast cancer cells. *Endocrinology* 118:138-42

Dorland's illustrated medical dictionary 1974 25th ed. Philadelphia, PA, W.B. Saunders

Dostal DE, Baker KM 1999 The cardiac renin-angiotensin system: conceptual, or a regulator of cardiac function? *Circ Res* 85:643-50

Dreifuss JJ, Tribollet E, Dubois-Dauphin M, Raggenbass M 1992 Receptors and neural effects of oxytocin in the rodent hypothalamus and preoptic region. *Ciba Found Symp* 168:187-99; discussion 200-8

Drexhage HA 1996 Autoimmunity and thyroid growth. Where do we stand? *Eur J Endocrinol* 135:39-45

Drolet G, Dumont EC, Gosselin I, Kinkead R, Laforest S, Trottier JF 2001 Role of endogenous opioid system in the regulation of the stress response. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 25:729-41

Du J, Keegan BP, North WG 2001 Key peptide processing enzymes are expressed by breast cancer cells. *Cancer Lett* 165:211-8

Du Vigneaud V, Ressler C, Trippett S 1953 The sequence of amino acids in oxytocin, with a proposal for the structure of oxytocin. *J Biol Chem* 205:949-57

Dumont JE, Maenhaut C, Pirson I, Baptist M, Roger PP 1991 Growth factors controlling the thyroid gland. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 5:727-54

Duplan H, Bes JC, Tafani M, Sallerin B, Sagen J, Ohayon E, Lazorthes Y, Tkaczuk J 2000 Adrenal medullary explants as an efficient tool for pain control: adhesive biomolecular components are involved in graft function ex vivo. *Exp Neurol* 163:331-47

Dupont WD, Page DL 1985 Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease. *N Engl J Med* 312:146-51

Dzau VJ, Herrmann HC 1982 Hormonal control of angiotensinogen production. *Life Sci* 30:577-84

Ebadi M, Hexum TD, Pfeiffer RF, Govitrapong P 1989 Pineal and retinal peptides and their receptors In: Reiter RJ eds. *Pineal Research reviews*, Alan R. Liss, New York vol 7, 1-56

Elmore MA, Griffiths EC, O'Connor B, O'Cuinn G 1990 Further characterization of the substrate specificity of a TRH hydrolysing pyroglutamate aminopeptidase from guinea-pig brain. *Neuropeptides* 15:31-6

Emanuelli C, Salis MB, Stacca T, Gaspa L, Chao J, Chao L, Piana A, Madeddu P 2001 Rescue of impaired angiogenesis in spontaneously hypertensive rats by intramuscular human tissue kallikrein gene transfer. *Hypertension* 38:136-41

Emons G, Schally AV 1994 The use of luteinizing hormone releasing hormone agonists and antagonists in gynaecological cancers. *Hum Reprod* 9:1364-79

Endo T, Onaya T 1994 Thyrotropin receptor is expressed in non-thyroid tissues. *Nippon Rinsho* 52:969-73

Eppler E, Zapf J, Bailer N, Falkmer UG, Falkmer S, Reinecke M 2002 IGF-I in human breast cancer: low differentiation stage is associated with decreased IGF-I content. *Eur J Endocrinol* 146:813-21

Fabre JE, Rivard A, Magner M, Silver M, Isner JM 1999 Tissue inhibition of angiotensin-converting enzyme activity stimulates angiogenesis in vivo. *Circulation* 99:3043-9

Favy DA, Rio P, Maurizis JC, Hizel C, Bignon YJ, Bernard-Gallon DJ 1999 Prolactin-dependent up-regulation of BRCA1 expression in human breast cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 258:284-91

Feldman M, Ruan W, Cunningham BC, Wells JA, Kleinberg DL 1993 Evidence that the growth hormone receptor mediates differentiation and development of the mammary gland. *Endocrinology* 133:1602-8

Felgenhauer K, Glenner GG 1966 The enzymatic hydrolysis of amino acid beta-naphthylamides. II. Partial purification and properties of a particle-bound cobalt-activated rat kidney aminopeptidase. *J Histochem Cytochem* 14:401-13

Feracci H, Maroux S 1980 Rabbit intestinal aminopeptidase N. Purification and molecular properties. *Biochim Biophys Acta* 599:448-63

Fernández LA, Twickler J, Mead A 1985 Neovascularization produced by angiotensin II. *J Lab Clin Med* 105:141-5

Feychting M, Osterlund B, Ahlbom A 1998 Reduced cancer incidence among the blind. *Epidemiology* 9:490-4

Filipski E, King VM, Li X, Granda TG, Mormont MC, Liu X, Claustrat B, Hastings MH, Levi F 2002 Host circadian clock as a control point in tumor progression. *J Natl Cancer Inst* 94:690-7

Fisher LA, Fernstrom JD 1981 Measurement of nonapeptides in pineal and pituitary using reversed-phase, ion-pair liquid chromatography with post-column detection by radioimmunoassay. *Life Sci* 28:1471-81

Flux DS 1954 Growth of the mammary duct system in intact and ovariectomized mice of the CHI strain. *J Endocrinol* 11:223-37

- Folk JE** 1956 The influence of the lysineglucose reaction on enzymatic digestion. Arch Biochem Biophys 64:6-18
- Folkman J, Watson K, Ingber D, Hanahan D** 1989 Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. Nature 339:58-61
- Forbes JF** 1997 The control of breast cancer: the role of tamoxifen. Semin Oncol 24:S1-5-S1-19
- Forrest D, Vennstrom B** 2000 Functions of thyroid hormone receptors in mice. Thyroid 10:41-52
- Foulon T, Cadel S, Cohen P** 1999 Aminopeptidase B (EC 3.4.11.6). Int J Biochem Cell Biol 31:747-50
- Fowler CA, Perks CM, Newcomb PV, Savage PB, Farndon JR, Holly JM** 2000 Insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) potentiates paclitaxel-induced apoptosis in human breast cancer cells. Int J Cancer 88:448-53
- Franzke A, Peest D, Probst-Kepper M, Buer J, Kirchner GI, Brabant G, Kirchner H, Ganser A, Atzpodien J** 1999 Autoimmunity resulting from cytokine treatment predicts long-term survival in patients with metastatic renal cell cancer. J Clin Oncol 17:529-33
- Frasor J, Gibori G** 2003 Prolactin regulation of estrogen receptor expression. Trends Endocrinol Metab 14:118-23
- Freire-Garabal M, Balboa JL, Nunez MJ, Castano MT, Belmonte A** 1992 Autoradiographic evidence of opioid binding sites in the thyroid gland. Horm Metab Res 24:494-5
- Friedman TC, Yanovski JA, Jayasvasti V, Yanovski SZ, Koenig RJ, Wilk S** 1995 Pyroglutamyl peptidase-II ("thyroliberinase") activity in human serum: influence of weight and thyroid status. J Clin Endocrinol Metab 80:1086-9
- Fruton JS, Irving GW, Bergmann M (a)** 1941 On the proteolytic enzymes of animal tissues. II. The composite nature of beef spleen cathepsin. J Biol Chem 138: 249-262.

Fruton JS, Irving GW, Bergmann M (b)1941 On the proteolytic enzymes of animal tissues. III. The proteolytic enzymes of beef spleen, beef kidney and swine kidney calssification of the cathepsins. *J Biol Chem* 141: 763-774.

Fujii H, Nakajima M, Saiki I, Yoneda J, Azuma I, Tsuruo T 1995 Human melanoma invasion and metastasis enhancement by high expression of aminopeptidase N/CD13. *Clin Exp Metastasis* 13:337-44

Fukuyama K, Ichiki T, Takeda K, Tokunou T, Iino N, Masuda S, Ishibashi M, Egashira K, Shimokawa H, Hirano K, Kanaide H, Takeshita A 2003 Downregulation of vascular angiotensin II type 1 receptor by thyroid hormone. *Hypertension* 41:598-603

Gainer H, Russell JT, Loh YP 1984 An aminopeptidase activity in bovine pituitary secretory vesicles that cleaves the N-terminal arginine from beta-lipotropin60-65. *FEBS Lett* 175:135-9

Gallagher SP, O'Leary RM, O'Connor B 1997 The development of two fluorimetric assays for the determination of pyroglutamyl aminopeptidase type-II activity. *Anal Biochem* 250:1-9

Ganong WF 1993 Blood, pituitary, and brain renin-angiotensin systems and regulation of secretion of anterior pituitary gland. *Front Neuroendocrinol* 14:233-49

Ganong WF, Murakami K 1987 The role of angiotensin II in the regulation of ACTH secretion. *Ann N Y Acad Sci* 512:176-86

García A, García JM, Martínez MA, Del Rio B, Lazo PS, Ramos S 1999 Melatonin blocks the activation of estrogens receptor for DNA binding *FASEB J* 13: 857-868

Gauquelin G, Gharib C, Ghaemmaghami F, Allevard AM, Cherbal F, Geelen G, Bouzeghrane F, Legros JJ 1988 A day/night rhythm of vasopressin and oxytocin in rat retina, pineal and harderian gland. *Peptides* 9:289-93

Giani C, Fierabracci P, Bonacci R, Gigliotti A, Campani D, De Negri F, Cecchetti D, Martino E, Pinchera A 1996 Relationship between breast cancer and thyroid disease: relevance of autoimmune thyroid disorders in breast malignancy. *J Clin Endocrinol Metab* 81:990-4

Gibbs DM 1986 Oxytocin inhibits ACTH and peripheral catecholamine secretion in the urethane-anesthetized rat. *Regul Pept* 14:125-32

Gibson JM, Westwood M, Crosby SR et al.1996 Choice of treatment affects plasma levels of insulin-like growth factor-binding protein.I in non-insulin-dependent diabetes mellitus *J Clin Endocrinol Metab* 80: 1369-1375

Gimpl G, Fahrenholz F 2001 The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev* 81:629-83

Ginsburg E, Vonderhaar BK 1995 Prolactin synthesis and secretion by human breast cancer cells. *Cancer Res* 55:2591-5

Giugni TD, Soderberg C, Ham DJ, Bautista RM, Hedlund KO, Moller E, Zaia JA 1996 Neutralization of human cytomegalovirus by human CD13-specific antibodies. *J Infect Dis* 173:1062-71

Glenner GG, McMillan PJ, Folk JE 1962 A mammalian peptidase specific for the hydrolysis of N-terminal alpha-L-glutamyl and aspartyl residues. *Nature* 194:867

Goldman MB 1990 Thyroid diseases and breast cancer. *Epidemiol Rev* 12:16-28

González-Palacios JF 2003 Lesiones mamarias preinfiltrantes y riesgo de padecer cáncer de mama. *European School of Oncology* 2003

Goodman HM 1994 *Basic medical endocrinology*. Raven Press, New York, 288-290

Grazzini E, Guillon G, Mouillac B, Zingg HH 1998 Inhibition of oxytocin receptor function by direct binding of progesterone. *Nature* 392:509-12

Greaney A, Phelan J, O'Cuinn G 1980 Localization of thyroliberin pyroglutamyl peptidase on synaptosomal-membrane preparations of guinea-pig brain tissue. *Biochem Soc Trans* 8:423

Greenberg LJ 1962 Fluorometric measurement of alkaline phosphatase and aminopeptidase activities in the order of 10⁻¹⁴ mole. *Biochem Biophys Res Commun* 9:430-5

Griffiths EC, Kelly JA, Klootwijk W, Visser TJ 1979 Enzymic inactivation of thyrotrophin-releasing hormone by the hypothalamus and other areas of rat brain. *J Physiol* 290:39P-40P

Griffiths EC, Kelly JA, White N, Jeffcoate SL 1980 Further studies on the inactivation of thyrotrophin releasing hormone (TRH) by enzymes in the rat hypothalamus. *Acta Endocrinol (Copenh)* 93:385-91

Grubbs CJ, Juliana MM, Hill DL, Whitaker LM 1986 Suppression by pregnancy of chemically induced preneoplastic cells of the rat mammary gland. *Anticancer Res* 6:1395-400

Grunfeld C, Sherman BM, Cavalieri RR 1988 The acute effects of human growth hormone administration on thyroid function in normal men. *J Clin Endocrinol Metab* 67:1111-4

Gullino PM 1977 Natural history of breast cancer. Progression from hyperplasia to neoplasia as predicted by angiogenesis. *Cancer* 39:2697-703

Gullino PM, Pettigrew HM, Grantham FH 1975 N-nitrosomethylurea as mammary gland carcinogen in rats. *J Natl Cancer Inst* 54:401-14

Habel LA, Stanford JL 1993 Hormone receptors and breast cancer. *Epidemiol Rev* 15:209-19

Hadley, ME 1997. *Endocrinología*. Prentice Hall, Madrid

Halmos T, Santarromana M, Antonakis K, Scherman D 1997 Synthesis of O-methylsulfonyl derivatives of D-glucose as potential alkylating agents for targeted drug delivery to the brain. Evaluation of their interaction with the human erythrocyte GLUT1 hexose transporter. *Carbohydr Res* 299:15-21

Hamano H, Hayakawa T, Kondo T 1987 Serum immunoreactive elastase in diagnosis of pancreatic diseases. A sensitive marker for pancreatic cancer. *Dig Dis Sci* 32:50-6

Hankinson SE, Willett WC, Michaud DS, Manson JE, Colditz GA, Longcope C, Rosner B, Speizer FE 1999 Plasma prolactin levels and subsequent risk of breast cancer in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst* 91:629-34

Harding JW, Wright JW, Swanson GN, Hanesworth JM, Krebs LT 1994 AT4 receptors: specificity and distribution. *Kidney Int* 46:1510-2

Haring HU, Kellerer M, Mosthaf L 1994 Modulation of insulin signalling in non-insulin-dependent diabetes mellitus: significance of altered receptor isoform patterns and mechanisms of glucose-induced receptor modulation. *Horm Res* 41 Suppl 2:87-91; discussion 92

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

Hatzoglou A, Bakogeorgou E, Castanas E (a) 1996 The antiproliferative effect of opioid receptor agonists on the T47D human breast cancer cell line, is partially mediated through opioid receptors. *Eur J Pharmacol* 296:199-207

Hatzoglou A, Bakogeorgou E, Hatzoglou C, Martin PM, Castanas E (b) 1996 Antiproliferative and receptor binding properties of alpha- and beta-casomorphins in the T47D human breast cancer cell line. *Eur J Pharmacol* 310:217-23

Hatzoglou A, Bakogeorgou E, Kampa M, Panagiotou S, Martin PM, Loukas S, Castanas E 2000 Somatostatin and opioid receptors in mammary tissue. Role in cancer cell growth. *Adv Exp Med Biol* 480:55-63

Hatzoglou A, Ouafik L, Bakogeorgou E, Thermos K, Castanas E 1995 Morphine cross-reacts with somatostatin receptor SSTR2 in the T47D human breast cancer cell line and decreases cell growth. *Cancer Res* 55:5632-6

Haulica I, Branisteanu D, Rosca V, Stratone A, Berbelev V, Balan G, Ionescu L 1975 A renin-like activity in pineal gland and hypophysis. *Physiologie* 12:21-4

Hawthorn J, Nussey SS, Henderson JR, Jenkins JS 1987 Immunohistochemical localization of oxytocin and vasopressin in the adrenal glands of rat, cow, hamster and guinea pig. *Cell Tissue Res* 250:1-6

Hayes DJ, Phelan JJ, O'Cuinn G 1979 The metabolism of thyrotropin-releasing hormone by guinea-pig brain. *Biochem Soc Trans* 7:59-62

Heffelfinger SC, Miller MA, Yassin R, Gear R 1999 Angiogenic growth factors in preinvasive breast disease. *Clin Cancer Res* 5:2867-76

Henderson BE, Ross R, Bernstein L 1988 Estrogens as a cause of human cancer: the Richard and Hinda Rosenthal Foundation award lecture. *Cancer Res* 48:246-53

Hedin SG, Rowland S 1901 Untersuchungen über das vorkommen von proteolytischen enzyemen im thierkörper. *Hoppe-Seyler' s Zeitscheift fur Physiologische Chemie* 38: 531-540

Herbst JJ, Ross SA, Scott HM, Bobin SA, Morris NJ, Lienhard GE, Keller SR 1997 Insulin stimulates cell surface aminopeptidase activity toward vasopressin in adipocytes. *Am J Physiol* 272:E600-6

Hercbergs A 1988 Hypothyroidism and tumor regression. *N Engl J Med* 319:1351-2

Hill SM, Blask DE 1988 Effects of the pineal hormone melatonin on the proliferation and morphological characteristics of human breast cancer cells (MCF-7) in culture. *Cancer Res* 48:6121-6

Hirani-Hojatti S, Milligan JR, Kovnat A, Brown K, Archer MC 1989 Activation of the c-Ha-ras-1 proto-oncogene by methylation in vitro with alpha-acetoxy-N-nitrosodimethylamine. *Mol Carcinog* 2:101-6

Hiwada K, Saeki-Yamaguchi C, Inaoka Y, Kokubu T 1978 Cystine aminopeptidases from pregnancy serum and placenta. *Biochem Med* 20:296-304

Hoffmann T, Faust J, Neubert K, Ansorge S 1993 Dipeptidyl peptidase IV (CD 26) and aminopeptidase N (CD 13) catalyzed hydrolysis of cytokines and peptides with N-terminal cytokine sequences. *FEBS Lett* 336:61-4

Holgert H, Dagerlind A, Hokfelt T 1998 Immunohistochemical characterization of the peptidergic innervation of the rat adrenal gland. *Horm Metab Res* 30:315-22

Homeida AM 1986 Evidence for the presence of oxytocin in the corpus luteum of the goat. *Br J Pharmacol* 87:673-6

Hopsu V, Makinen EO 1966 Two methods for the demonstration of noradrenaline-containing adrenal medullary cells. *J Histochem Cytochem* 14:434-5

Hopsu VK, Kantonen UM, Glenner GG 1964 A peptidase from rat tissues selectively hydrolyzing N-terminal arginine and lysine residues. *Life Sci* 74:1449-53

Hovey RC, Trott JF, Vonderhaar BK 2002 Establishing a framework for the functional mammary gland: from endocrinology to morphology. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 7:17-38

Hsieh KP, Martin TF 1992 Thyrotropin releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone receptors activate phospholipase C by coupling to the guanosine triphosphate-binding proteins Gq and G11. *Mol Endocrinol* 6: 1673-81

<http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzyme.html>

<http://www.expasy.org>

Hu DE, Hiley CR, Fan TP 1996 Comparative studies of the angiogenic activity of vasoactive intestinal peptide, endothelins-1 and -3 and angiotensin II in a rat sponge model. *Br J Pharmacol* 117:545-551

Hu YF, Russo IH, Russo J 2000 Prevention of human breast cancer *J Women's Cancer*

Hui KS, Lajtha A. 1986 *In Vitro Neurochemical Methods* (Boulton, A A., Baker, G B., and Yu, P. H., eds), Humana Press, Clifton, 421-450

Huff KK, Knabbe C, Lindsey R, Kaufman D, Bronzert D, Lippman ME, Dickson RB 1988 Multihormonal regulation of insulin-like growth factor-I-related protein in MCF-7 human breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 2:200-8

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

Huggins C, Yang NC 1962 Induction and extinction of mammary cancer. A striking effect of hydrocarbons permits analysis of mechanisms of causes and cure of breast cancer. *Science* 137:257-62

- Hughes J, Smith TW, Kosterlitz HW, Fothergill LA, Morgan BA, Morris HR** 1975 Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* 258:577-80
- Hui KS, Saito M, Hui M** 1998 A novel neuron-specific aminopeptidase in rat brain synaptosomes. Its identification, purification, and characterization. *J Biol Chem* 273:31053-60
- Huirne JA, Lambalk CB** 2001 Gonadotropin-releasing-hormone-receptor antagonists. *Lancet* 358:1793-803
- Hulse GK, Coleman GJ, Copolov DL, Clements JA** 1984 Relationship between endogenous opioids and the oestrous cycle in the rat. *J Endocrinol* 100:271-5
- Huseby RA, Maloney TM, McGrath CM** 1987 Evidence for a direct growth-stimulating effect of estradiol on human MCF-7 cells *in vitro* *Cancer Res* 47: 2654-2659
- Humphreys RC** 1999 Programmed cell death in the terminal endbud. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 4:213-20
- Huseby RA, Maloney TM, McGrath CM** 1984 Evidence for a direct growth-stimulating effect of estradiol on human MCF-7 cells *in vivo*. *Cancer Res* 44:2654-9
- Iglesias AG, Suarez C, Feierstein C, Diaz-Torga G, Becu-Villalobos D** 2001 Desensitization of angiotensin II: effect on. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280:E462-70
- Ikeda M, Taga M, Sakakibara H, Minaguchi H, Vonderhaar BK** 1995 Detection of messenger RNA for gonadotropin-releasing hormone (GnRH) but not for GnRH receptors in mouse mammary glands. *Biochem Biophys Res Commun* 207:800-6
- Illnerova H, Buresova M, Presl J** 1993 Melatonin rhythm in human milk. *J Clin Endocrinol Metab* 77:838-41
- Imai K, Hama T, Kato T** 1983 Purification and properties of rat brain dipeptidyl aminopeptidase. *J Biochem (Tokyo)* 93:431-7

- Ito K, Maruchi N** 1975 Breast cancer in patients with Hashimoto's thyroiditis. *Lancet* 2:1119-21
- Itoh C, Nagamatsu A** 1995 An aminopeptidase activity from porcine kidney that hydrolyzes oxytocin and vasopressin: purification and partial characterization. *Biochim Biophys Acta* 1243:203-8
- Ivell R, Richter D** 1984 The gene for the hypothalamic peptide hormone oxytocin is highly expressed in the bovine corpus luteum: biosynthesis, structure and sequence analysis. *EMBO J* 3:2351-4
- Jacoby M** 1900 Ueber die fermentative eiweisspaltung und ammoniakbildung in der leber. *Hope-Seyleis Z Physiol Chem* 30: 149-173
- Jankowski M, Wang D, Hajjar F, Mukaddam-Daher S, McCann SM, Gutkowska J** 2000 Oxytocin and its receptors are synthesized in the rat vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6207-11
- Jarasch ED, Grund C, Bruder G, Heid HW, Keenan TW, Franke WW** 1981 Localization of xanthine oxidase in mammary-gland epithelium and capillary endothelium. *Cell* 25:67-82
- Jezova D, Ochedalski T, Kiss A, Aguilera G** 1998 Brain angiotensin II modulates sympathoadrenal and hypothalamic pituitary adrenocortical activation during stress. *J Neuroendocrinol* 10:67-72
- Jones MT** 1979 Control of adrenocortical hormone secretion In: VHT James (Ed) *Adrenal Gland*, Raven Press 99-130
- Jones MP, Melan MA, Witt-Enderby PA** 2000 Melatonin decreases cell proliferation and transformation in a melatonin receptor-dependent manner. *Cancer Lett* 151:133-43
- Joseph-Bravo P, Loudes C, Charli JL, Kordon C** 1979 Subcellular distribution of brain peptidases degrading luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) and thyrotropin releasing hormone (TRH). *Brain Res* 166:321-9

Josko J, Hendryk S, Jedrzejowska-Szypulka H, Gwozdz B, Herman ZS, Latka D, Kopec N 1996 Atrial natriuretic peptide secretion following subarachnoid hemorrhage in spontaneously hypertensive rats. *J Physiol Pharmacol* 47:641-8

Juszczak M 1998 Melatonin affects the oxytocin and prolactin responses to stress in male rats. *J Physiol Pharmacol* 49:151-63

Juszczak M 2002 Neurokinin A and the neurohypophysial response to melatonin: in vitro studies. *J Physiol Pharmacol* 53:823-34

Juszczak M, Debeljuk L, Stempniak B, Steger RW, Fadden C, Bartke A 1997 Neurohypophysial vasopressin in the Syrian hamster: response to short photoperiod, pinealectomy, melatonin treatment, or osmotic stimulation. *Brain Res Bull* 42:221-5

Juszczak M, Guzek JW, Lewy A 1986 The influence of melatonin on the content of vasopressin and oxytocin in the hypothalamus and neurohypophysis in euhydrated and dehydrated male rats. *J Pineal Res* 3:199-211

Juszczak M, Kopotowska A, Stempniak B, Guzek JW 1993 Hypothalamic and neurohypophysial vasopressin and oxytocin content as influenced by haemorrhage in melatonin-treated male rats. *Patol Pol* 44:55-9

Juszczak M, Stempniak B 1997 The effect of melatonin on suckling-induced oxytocin and prolactin release in the rat. *Brain Res Bull* 44:253-8

Juszczak M, Stempniak B, Guzek JW 1992 Melatonin, pinealectomy, and release of neurohypophysial hormones: in vitro studies. *J Pineal Res* 12:1-6

Kaiser UB, Jakubowiak A, Steinberger A, Chin WW 1997 Differential effects of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulse frequency on gonadotropin subunit and GnRH receptor messenger ribonucleic acid levels in vitro. *Endocrinology* 138:1224-31

Kakar SS, Grizzle WE, Neill JD 1994 The nucleotide sequences of human GnRH receptors in breast and ovarian tumors are identical with that found in pituitary. *Mol Cell Endocrinol* 106:145-9

Kanayama N, Kajiwara Y, Goto J, el Maradny E, Maehara K, Andou K, Terao T 1995 Inactivation of interleukin-8 by aminopeptidase N (CD13). *J Leukoc Biol* 57:129-34

Kania RK, Santiago NA, Gray GM 1977 Intestinal surface amino-oligopeptidasas. II. Substrate kinetics and topography of the active site. *J Biol Chem* 252:4929-34

Kapdi CC, Wolfe JN 1976 Breast cancer. Relationship to thyroid supplements for hypothyroidism. *JAMA* 236:1124-7

Katzenellenbogen BS, Kendra KL, Norman MJ, Berthois Y 1987 Proliferation, hormonal responsiveness, and estrogen receptor content of MCF-7 human breast cancer cells grown in the short-term and long-term absence of estrogens. *Cancer Res* 47:4355-60

Kelly JA, Loscher CE, Gallagher S, O'Connor B 1997 Degradation of pyroglutamyl-phenylalanyl-proline amide by a pyroglutamyl aminopeptidase purified from membrane fractions of bovine brain. *Biochem Soc Trans* 25:114S

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

Kieffer JD, Vickery AL Jr, Ridgway EC, Mover H, Kern K, Maloof F 1980 Induction of breast cancer by nitrosomethylurea in rats of the Buffalo strain: frequent association with thyroid disease. *Endocrinology* 107:1218-25

Kilbane MTTA, Shering SG, Smith DF, McDermott EWM, O'Higgins NJ, Smyth PPA 1998 Thyroid peroxidase (TPO) an autoantigen common to the thyroid and breast. *J Endocrinol* 156: 323

Kimura T, Saji F, Nishimori K, Ogita K, Nakamura H, Koyama M, Murata Y 2003 Molecular regulation of the oxytocin receptor in peripheral organs. *J Mol Endocrinol* 30:109-15

Kimura T, Saji F, Nishimori K, Ogita K, Nakamura H, Koyama M, Murata Y 2003 Molecular regulation of the oxytocin receptor in peripheral organs. *J Mol Endocrinol* 30:109-15

King RJ 1992 Effects of steroid hormones and related compounds on gene transcription. *Clin Endocrinol (Oxf)* 36:1-14

Kleinberg DL, Feldman M, Ruan W 2000 IGF-I: an essential factor in terminal end bud formation and ductal morphogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 5:7-17

Kleinberg DL, Ruan W, Catanese V, Newman CB, Feldman M 1990 Non-lactogenic effects of growth hormone on growth and insulin-like growth factor-I messenger ribonucleic acid of rat mammary gland. *Endocrinology* 126:3274-6

Kliukiene J, Tynes T, Andersen A 2001 Risk of breast cancer among Norwegian women with visual impairment. *Br J Cancer* 84:397-9

Kodama F, Greene GL, Salmon SE 1985 Relation of estrogen receptor expression to clonal growth and antiestrogen effects on human breast cancer cells. *Cancer Res* 45:2720-4

Kottler ML, Starzec A, Carre MC, Lagarde JP, Martin A, Counis R 1997 The genes for gonadotropin-releasing hormone and its receptor are expressed in human breast with fibrocystic disease and cancer. *Int J Cancer* 71:595-9

Kottler ML, Starzec A, Carre MC, Lagarde JP, Martin A, Counis R 1997 The genes for gonadotropin-releasing hormone and its receptor are expressed in human breast with fibrocystic disease and cancer. *Int J Cancer* 71:595-9

Krishnamurthi K, Verbalis JG, Zheng W, Wu Z, Clerch LB, Sandberg K 1999 Estrogen regulates angiotensin AT1 receptor expression via cytosolic proteins that bind to the 5' leader sequence of the receptor mRNA. *Endocrinology* 140:5435-8

Kumar R, Sukumar S, Barbacid M 1990 Activation of ras oncogenes preceding the onset of neoplasia. *Science* 248:1101-4

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

Kuukasjarvi T, Karhu R, Tanner M, Kahkonen M, Schaffer A, Nupponen N, Pennanen S, Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Isola J 1997 Genetic heterogeneity and clonal evolution underlying development of asynchronous metastasis in human breast cancer. *Cancer Res* 57:1597-604

Laatikainen TJ 1991 Corticotropin-releasing hormone and opioid peptides in reproduction and stress. *Ann Med* 23:489-96

Laban C, Bustin SA, Jenkins PJ 2003 The GH-IGF-I axis and breast cancer. *Trends Endocrinol Metab* 14:28-34

Laidlaw IJ, Clarke RB, Howell A, Owen AW, Potten CS, Anderson E 1995 The proliferation of normal human breast tissue implanted into athymic nude mice is stimulated by estrogen but not progesterone. *Endocrinology* 136:164-71

Lampelo S, Vanha-Perttula T 1979 Fractionation and characterization of cystine aminopeptidase (oxytocinase) and arylamidase of the human placenta. *J Reprod Fertil* 56:285-96

Lapresle C, Webb T 1962 The purification and properties of a proteolytic enzyme, rabbit cathepsin E, and further studies on rabbit cathepsin D. *Biochem J* 84:455-62

Larsen PR, Davies TF, Hay ID 1998 *The Thyroid Gland In*;: Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen PR, eds *Williams textbook of endocrinology* 9th ed Philadelphia, Saunders, 389-515

Lawson NO, Wee BE, Blask DE, Castles CG, Spriggs LL, Hill SM 1992 Melatonin decreases estrogen receptor expression in the medial preoptic area of inbred (LSH/SsLak) golden hamsters. *Biol Reprod* 47:1082-90

Le Guen S, Mas Nieto M, Canestrelli C, Chen H, Fournie-Zaluski MC, Cupo A, Maldonado R, Roques BP, Noble F 2003 Pain management by a new series of dual inhibitors of enkephalin degrading enzymes: long lasting antinociceptive properties and potentiation by CCK2 antagonist or methadone. *Pain* 104:139-48

Le Noble FA, Hekking JW, Van Straaten HW, Slaaf DW, Struyker Boudier HA 1991 Angiotensin II stimulates angiogenesis in the chorio-allantoic membrane of the chick embryo. *Eur J Pharmacol* 195:305-6

Le Noble FA, Kessels-van Wylick LC, Hacking WJ, Slaaf DW, oude Egbrink MG, Struijker-Boudier HA 1996 The role of angiotensin II and prostaglandins in arcade formation in a developing microvascular network. *J Vasc Res* 33:480-8

Leake RD, Weitzman RE, Fisher DA 1981 Oxytocin concentrations during the neonatal period. *Biol Neonate* 39:127-31

Leclercq G, Heuson JC 1979 Physiological and pharmacological effects of estrogens in breast cancer. *Biochim Biophys Acta* 560:427-55

Lee AV, Jackson JG, Gooch JL, Hilsenbeck SG, Coronado-Heinsohn E, Osborne CK, Yee D 1999 Enhancement of insulin-like growth factor signaling in human breast cancer: estrogen regulation of insulin receptor substrate-1 expression in vitro and in vivo. *Mol Endocrinol* 13:787-96

Leff MA, Buckley DJ, Krumenacker JS, Reed JC, Miyashita T, Buckley AR 1996 Rapid modulation of the apoptosis regulatory genes, bcl-2 and bax by prolactin in rat Nb2 lymphoma cells. *Endocrinology* 137:5456-62

Legros JJ 2001 Inhibitory effect of oxytocin on corticotrope function in humans: are vasopressin and oxytocin ying-yang neurohormones? *Psychoneuroendocrinology* 26:649-55

Legros JJ, Chiodera P, Geenen V, Smitz S, von Frenckell R 1984 Dose-response relationship between plasma oxytocin and cortisol and adrenocorticotropin concentrations during oxytocin infusion in normal men. *J Clin Endocrinol Metab* 58:105-9

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

Leong DS, Terron JA, Falcon-Neri A, Armando I, Ito T, Jöhren O, Tonelli LH, Hoe KL, Saavedra JM 2002 Restraint stress modulates brain, pituitary and adrenal expression of angiotensin II AT(1A), AT(1B) and AT(2) receptors. *Neuroendocrinology* 75:227-40

Leung BS, Sasaki GH 1973 Prolactin and progesterone effect on specific estradiol binding in uterine and mammary tissues in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 55:1180-7

Lever AF, Hole DJ, Gillis CR, McCallum IR, McInnes GT, MacKinnon PL, Meredith PA, Murray LS, Reid JL, Robertson JW 1998 Do inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme protect against risk of cancer? *Lancet* 352:179-84

Levi LN, Ben-Aroya N, Tel-Or S, Palmon A, Burstein Y, Koch Y 1996 Expression of the gene for the receptor of gonadotropin-releasing hormone in the rat mammary gland. *FEBS Lett* 379:186-90

Lewis JW, Shavit Y, Terman GW, Nelson LR, Martin FC, Gale RP, Liebeskind JC 1985 Involvement of opioid peptides in the analgesic, immunosuppressive, and tumor-enhancing effects of stress. *Psychopharmacol Bull* 21:479-84

Linderstrom-Lang K 1929 Uber darmerepsin. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 182: 151-174

Lippman ME, Dickson RB, Gelmann EP, Rosen N, Knabbe C, Bates S, Bronzert D, Huff K, Kasid A 1987 Growth regulation of human breast carcinoma occurs through regulated growth factor secretion. *J Cell Biochem* 35:1-16

Lissitzky S 1990 Thyroid hormones In: *Hormones: from molecules to disease* (Baulieu E-E, Kelly PA, eds) Paris: Hermann Publishers in arts and sciences (published simultaneously in Britain; London: Chapman and Hall), 343-386

Liu B, Burbach JP 1987 Characterization of vasopressin and oxytocin immunoreactivity in the sheep and rat pineal gland: absence of vasotocin and detection of a vasopressin-like peptide. *Peptides* 8:7-11

Liu B, Poulter L, Neacsu C, Burbach JP 1988 Isolation and identification of vasopressin- and oxytocin-immunoreactive substances from bovine pineal gland. Presence of N alpha-acetyloxytocin. *J Biol Chem* 263:72-5

Llovera M, Pichard C, Bernichtein S, Jeay S, Touraine P, Kelly PA, Goffin V 2000 Human prolactin (hPRL) antagonists inhibit hPRL-activated signaling pathways involved in breast cancer cell proliferation. *Oncogene* 19:4695-705

Loeser AA 1954 A new therapy for prevention of post-operative recurrences in genital and breast cancer; a six-years study of prophylactic thyroid treatment. *Br Med J* 4901:1380-3

- Lu J, Jiang C, Mitrenga T, Cutter G, Thompson HJ** 1998 Pathogenic characterization of 1-methyl-1-nitrosourea-induced mammary carcinomas in the rat. *Carcinogenesis* 19:223-7
- Lu SJ, Archer MC** 1992 Ha-ras oncogene activation in mammary glands of N-methyl-N-nitrosourea-treated rats genetically resistant to mammary adenocarcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:1001-5
- Lyll F, Dornan ES, McQueen J, Boswell F, Kelly M** 1992 Angiotensin II increases proto-oncogene expression and phosphoinositide turnover in vascular smooth muscle cells via the angiotensin II AT1 receptor. *J Hypertens* 10:1463-9
- Machado RD, Santos RA, Andrade SP** 2000 Opposing actions of angiotensins on angiogenesis. *Life Sci* 66:67-76
- Maestroni GJ** 1993 The immunoneuroendocrine role of melatonin. *J Pineal Res* 14:1-10
- Maiorana A, Gullino PM** 1978 Acquisition of angiogenic capacity and neoplastic transformation in the rat mammary gland. *Cancer Res* 38:4409-14
- Maluccio M, Sharma V, Lagman M, Konijn G, Suthanthiran M** 2001 Angiotensin II receptor blockade: a novel strategy to prevent immunosuppressant-associated cancer progression. *Transplant Proc* 33:1820-1
- Maneckjee R, Minna JD** 1990 Opioid and nicotine receptors affect growth regulation of human lung cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:3294-8
- Maneckjee R, Minna JD** 1994 Opioids induce while nicotine suppresses apoptosis in human lung cancer cells. *Cell Growth Differ* 5:1033-40
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, et al** 1995 The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83:835-9
- Manni A, Wright C** 1984 Polyamines as mediators of estrogen action on the growth of experimental breast cancer in rats. *J Natl Cancer Inst* 73:511-4

Mantle D, Lauffart B, Gibson A 1991 Purification and characterization of leucyl aminopeptidase and pyroglutamyl aminopeptidase from human skeletal muscle. *Clin Chim Acta* 197:35-45

Marshall JC, Barkan AL 1992 Hypothalamic-pituitary-end organ interaction In: Kelley WN (ed) *Textbook of Internal Medicine* JB Lippincott Company, Philadelphia, vol 2, 1931

Marsigliante S, Muscella A, Elia MG, Greco S, Storelli C 2003 Angiotensin II AT1 receptor stimulates Na⁺-K⁺ATPase activity through a pathway involving PKC-zeta in rat thyroid cells. *J Physiol* 546:461-70

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

Martínez JM, Prieto I, Ramírez MJ, Cueva C, Alba F, Ramírez M 1999 Amino peptidase activities in breast cancer tissue. *Clin Chem* 45:1797-802

Masamura S, Santner SJ, Heitjan DF, Santen RJ 1995 Estrogen deprivation causes estradiol hypersensitivity in human breast cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab* 80:2918-25

Mathe G 1987 Do tuftsin and bestatin constitute a biopharmacological immunoregulatory system? *Cancer Detect Prev Suppl* 1:445-55

Maus MV, Reilly SC, Clevenger CV 1999 Prolactin as a chemoattractant for human breast carcinoma. *Endocrinology* 140:5447-50

McCormick DL, Adamowski CB, Fiks A, Moon RC 1981 Lifetime dose-response relationships for mammary tumor induction by a single administration of N-methyl-N-nitrosourea. *Cancer Res* 41:1690-4

McDonald JK, Barrett AJ 1986 *Mammalian Proteases A glossary and Bibliography* Orlando Academic Press

McKinley MJ, Allen AM, May CN, McAllen RM, Oldfield BJ, Sly D, Mendelsohn FA 2001 Neural pathways from the lamina terminalis influencing cardiovascular and body fluid homeostasis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 28:990-2

Mediavilla MD, Cos S, Sanchez-Barcelo EJ 1999 Melatonin increases p53 and p21WAF1 expression in MCF-7 human breast cancer cells in vitro. *Life Sci* 65:415-20

Mediavilla MD, Guezmez A, Ramos S, Kothari L, Garijo F, Sanchez Barcelo EJ 1997 Effects of melatonin on mammary gland lesions in transgenic mice overexpressing N-ras proto-oncogene. *J Pineal Res* 22:86-94

Mediavilla MD, San Martin M, Bonanni Rey et al. 1993 Melatonin actions in mouse mammary glands. In: *Melatonin and pineal gland. From Basic Science to Clinical Applications*. Touitou Y, Arendt J, Pevet P, eds., Elsevier, Amsterdam, 261-264

Meites J 1972 Relation of prolactin and estrogen to mammary tumorigenesis in the rat. *J Natl Cancer Inst* 48:1217-24

Mertani HC, Garcia-Caballero T, Lambert A, Gerard F, Palayer C, Boutin JM, Vonderhaar BK, Waters MJ, Lobie PE, Morel G 1998 Cellular expression of growth hormone and prolactin receptors in human breast disorders. *Int J Cancer* 79:202-11

Mettlin C 1999 Global breast cancer mortality statistics. *CA Cancer J Clin* 49:138-44

Miller BA, Feuer EJ, Hankey BF 1991 The increasing incidence of breast cancer since 1982: relevance of early detection. *Cancer Causes Control* 2:67-74

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

Mitra I, Hayward JL, McNeilly AS 1974 Hypothalamic-pituitary-prolactin axis in breast cancer. *Lancet* 1:889-91

Miyamoto S, Kasagi K, Alam MS, Misaki T, Iida Y, Konishi J 1997 Assessment of thyroid growth stimulating activity of immunoglobulins from patients with autoimmune thyroid disease by cytokinesis arrest assay. *Eur J Endocrinol* 136:499-507

Mizuno H, Naito M 1956 The effect of locally administered prolactin on the nucleic acid content of the mammary gland in the rabbit. *Endocr J* 3:227-30

Mizuno K, Hashimoto S, Ojima M, Kunii N, Tani M, Niimura S, Watari H, Fukuchi S 1985 Immunoreactive renin in human brain: distribution and properties. *Jpn Circ J* 49:1005-11

Mizutani S, Goto K, Nomura S, Ino K, Goto S, Kikkawa F, Kurauchi O, Goldstein G, Tomoda Y 1993 Possible action of human placental aminopeptidase N in feto-placental unit. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 82:65-80

Mizutani S, Safwat MA, Goto K, Tsujimoto M, Nakazato H, Itakura A, Mizuno M, Kurauchi O, Kikkawa F, Tomoda Y 1995 Initiating and responsible enzyme of arginine vasopressin degradation in human placenta and pregnancy serum. *Regul Pept* 59:371-8

Mogg RJ, Samson WK 1990 Interactions of dopaminergic and peptidergic factors in the control of prolactin release. *Endocrinology* 126:728-35

Mol JA, Henzen-Logmans SC, Hageman P, Misdorp W, Blankenstein MA, Rijnberk A 1995 Expression of the gene encoding growth hormone in the human mammary gland. *J Clin Endocrinol Metab* 80:3094-6

Molino A, Micciolo R, Turazza M, Bonetti F, Piubello Q, Corgnati A, Sperotto L, Recaldin E, Spagnoli P, Manfrin E, Bonetti A, Nortilli R, Tomezzoli A, Pollini GP, Modena S, Cetto GL 1997 Prognostic significance of estrogen receptors in 405 primary breast cancers: a comparison of immunohistochemical and biochemical methods. *Breast Cancer Res Treat* 45:241-9

Molis TM, Spriggs LL, Hill SM 1994 Modulation of estrogen receptor mRNA expression by melatonin in MCF-7 human breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 8:1681-90

Molis TM, Spriggs LL, Jupiter Y, Hill SM 1995 Melatonin modulation of estrogen-regulated proteins, growth factors, and proto-oncogenes in human breast cancer. *J Pineal Res* 18:93-103

Montiel M, Jimenez E 1998 Characterization of angiotensin II receptors (binding and mRNA) in the rat thyroid gland. *J Mol Endocrinol* 20:299-304

Montilla P, Munoz C, Pinilla J, Castro JA 1983 Effect of melatonin on L-leucine aminopeptidase in the hypothalamus and cerebral cortex of the normal and ovariectomized rat. *Rev Esp Fisiol* 39:145-8

Moolgavkar SH, Day NE, Stevens RG 1980 Two-stage model for carcinogenesis: Epidemiology of breast cancer in females. *J Natl Cancer Inst* 65:559-69

Moon RC, Grubbs CJ, Sporn MB, Goodman DG 1977 Retinyl acetate inhibits mammary carcinogenesis induced by N-methyl-N-nitrosourea. *Nature* 267:620-1

Moossa AR, Evans DA, Brewer AC 1973 Thyroid status and breast cancer. Reappraisal of an old relationship. *Ann R Coll Surg Engl* 53:178-88

Moreau C, Rasolojanahary R, Zamora AJ, Enjalbert A, Kordon C, Llorens-Cortes C 1997 Expression of angiotensin II receptor subtypes AT(1A) and AT(1B) in enriched fractions of dispersed rat pituitary cells. *Neuroendocrinology* 66:416-25

Morgan L, Pipkin FB, Kalsheker N 1996 Angiotensinogen: molecular biology, biochemistry and physiology. *Int J Biochem Cell Biol* 28:1211-22

Mounzih K, Grove KL, Speth RC, Steele MK, Ganong WF 1994 Further studies of the site at which angiotensin II acts in the central nervous system to inhibit the secretion of prolactin *Endocrinol J* 2: 41-46

Mote PA, Bartow S, Tran N, Clarke CL 2002 Loss of co-ordinate expression of progesterone receptors A and B is an early event in breast carcinogenesis. *Breast Cancer Res Treat* 72:163-72

Muñoz, A 1997 *Cáncer. Genes y nuevas terapias*. Hélice Madrid.

Muñoz A, Bernal J 1997 Biological activities of thyroid hormone receptors. *Eur J Endocrinol* 137:433-45

Murohara T, Asahara T, Silver M, Bauters C, Masuda H, Kalka C, Kearney M, Chen D, Symes JF, Fishman MC, Huang PL, Isner JM 1998 Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest* 101:2567-78

Murrell GA, Francis MJ, Bromley L 1987 Free radicals and Dupuytren's contracture. *Br Med J (Clin Res Ed)* 295:1373-5

Murrell GA, Francis MJ, Bromley L 1990 Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals. *Biochem J* 265:659-65

Murrell TG 1995 The potential for oxytocin (OT) to prevent breast cancer: a hypothesis. *Breast Cancer Res Treat* 35:225-9

Nagasaka T, Nomura S, Okamura M, Tsujimoto M, Nakazato H, Oiso Y, Nakashima N, Mizutani S 1997 Immunohistochemical localization of placental leucine amino-peptidase/oxytocinase in normal human placental, fetal and adult tissues. *Reprod Fertil Dev* 9:747-53

Nagatsu I, Gillespie L, Folk JE, Glenner GG 1965 Serum amino-peptidasas, "angiotensinase," and hypertension. I. Degradation of angiotensin II by human serum. *Biochem Pharmacol* 14:721-8

Nagatsu T, Hino M, Fuyamada H, Hayakawa T, Sakakibara S 1976 New chromogenic substrates for X-prolyl dipeptidyl-amino-peptidase. *Anal Biochem* 74:466-76

Nahmod VE, Balda MS, Pirola CJ, Finkielman S, Gejman PV, Cardinali DP 1982 Circadian rhythm and neural regulation of rat pineal angiotensin converting enzyme. *Brain Res* 236:216-20

Nakamura H, Itakuara A, Okamura M, Ito M, Iwase A, Nakanishi Y, Okada M, Nagasaka T, Mizutani S 2000 Oxytocin stimulates the translocation of oxytocinase of human vascular endothelial cells via activation of oxytocin receptors. *Endocrinology* 141:4481-5

Nandi S 1958 Endocrine control of mammary gland development and function in the C3H/He Crgl mouse. *J Natl Cancer Inst* 21:1039-63

Nandi S, Guzman RC, Yang J 1995 Hormones and mammary carcinogenesis in mice, rats, and humans: a unifying hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:3650-7

Naruse M, Naruse K, Kurimoto F, Sakurai H, Yoshida S, Toma H, Ishii T, Obana K, Demura H, Inagami T, et al 1985 Evidence for the existence of des-Asp1-angiotensin II in human uterine and adrenal tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 61:480-3

Ng ST, Zhou J, Adesanya OO, Wang J, LeRoith D, Bondy CA 1997 Growth hormone treatment induces mammary gland hyperplasia in aging primates. *Nat Med* 3:1141-4

Nicoletti A, Michel JB 1999 Cardiac fibrosis and inflammation: interaction with hemodynamic and hormonal factors. *Cardiovasc Res* 41:532-43

Noble F, Banisadr G, Jardinaud F, Popovici T, Lai-Kuen R, Chen H, Bischoff L, Parsadaniantz SM, Fournie-Zaluski MC, Roques BP 2001 First discrete autoradiographic distribution of aminopeptidase N in various structures of rat brain and spinal cord using the selective iodinated inhibitor. *Neuroscience* 105:479-88

North WG, Fay MJ, Du J 1999 MCF-7 breast cancer cells express normal forms of all vasopressin receptors plus an abnormal V2R. *Peptides* 20:837-42

North WG, Pai S, Friedmann A, Yu X, Fay M, Memoli V 1995 Vasopressin gene related products are markers of human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 34:229-35

Noteborn HP, Burbach JP, Ebels I 1987 Modified forms of vasopressin and oxytocin in a bovine pineal preparation. *FEBS Lett* 216:200-6

Noteborn HP, Reinharz AC, Pevet P, Ebels I, Salemink CA 1988 Neurohypophyseal hormone-like peptides in the ovine pineal gland using reverse-phase liquid chromatography and radioimmunoassay. *Peptides* 9:455-62

O'Connor B, O'Cuinn G 1985 Purification of and kinetic studies on a narrow specificity synaptosomal membrane pyroglutamate aminopeptidase from guinea-pig brain. *Eur J Biochem* 150:47-52

O'Higgins N 1992 Aspects of breast cancers. *Chirurgie* 118:324-7

- O'Leary RM, O'Connor B** 1995 A study of a synaptosomal thyrotropin releasing hormone-inactivating pyroglutamate aminopeptidase from bovine brain. *Int J Biochem Cell Biol* 27:881-90
- Obermuller N, Schlamp D, Hoffmann S, Gentili M, Inagami T, Gretz N, Weigel M** 1998 Localization of the mRNA for the angiotensin II receptor subtype 2 (AT2) in follicular granulosa cells of the rat ovary by nonradioactive in situ hybridization. *J Histochem Cytochem* 46:865-70
- Ochedalska AL, Rebas E, Kunert-Radek J, Fournie-Zaluski MC, Pawlikowski M** 2002 Angiotensins II and IV stimulate the activity of tyrosine kinases in estrogen-induced rat pituitary tumors. *Biochem Biophys Res Commun* 297:931-3
- Oikawa M, Dargan C, Ny T, Hsueh AJ** 1990 Expression of gonadotropin-releasing hormone and prothymosin-alpha messenger ribonucleic acid in the ovary. *Endocrinology* 127:2350-6
- Okon E, Koch Y** 1977 Localisation of gonadotropin-releasing hormone in the circumventricular organs of human brain. *Nature* 268:445-7
- Opie LH** 1994 The renin angiotensin aldosterone system and other proposed sites of action of angiotensin converting enzyme inhibitors In: LH Opie (ed) *Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors: Scientific Basic for Clinical Use*, 2nd Edn. New York: Wiley Liss, Inc, 1-19
- Otani A, Takagi H, Oh H, Koyama S, Honda Y** 2001 Angiotensin II induces expression of the Tie2 receptor ligand, angiopoietin-2, in bovine retinal endothelial cells. *Diabetes* 50:867-75
- Page DL, Dupont WD, Rogers LW, Rados MS** 1985 Atypical hyperplastic lesions of the female breast. A long-term follow-up study. *Cancer* 55:2698-708
- Page SR, Ang VT, Jackson R, White A, Nussey SS, Jenkins JS** 1990 The effect of oxytocin infusion on adenohipophyseal function in man. *Clin Endocrinol (Oxf)* 32:307-13
- Palmieri FE, Bausback HH, Ward PE** 1989 Metabolism of vasoactive peptides by vascular endothelium and smooth muscle aminopeptidase M. *Biochem Pharmacol* 38:173-80

Palmieri FE, Bausback HH, Ward PE 1989 Metabolism of vasoactive peptides by vascular endothelium and smooth muscle aminopeptidase M. *Biochem Pharmacol* 38:173-80

Palmieri FE, Petrelli JJ, Ward PE 1985 Vascular, plasma membrane aminopeptidase M. Metabolism of vasoactive peptides. *Biochem Pharmacol* 34:2309-17

Palmon A, Ben Aroya N, Tel-Or S, Burstein Y, Fridkin M, Koch Y 1994 The gene for the neuropeptide gonadotropin-releasing hormone is expressed in the mammary gland of lactating rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:4994-6

Panagiotou S, Bakogeorgou E, Papakonstanti E, Hatzoglou A, Wallet F, Dussert C, Stournaras C, Martin PM, Castanas E 1999 Opioid agonists modify breast cancer cell proliferation by blocking cells to the G2/M phase of the cycle: involvement of cytoskeletal elements. *J Cell Biochem* 73:204-11

Panagiotou S, Hatzoglou A, Calvo F, Martin PM, Castanas E 1998 Modulation of the estrogen-regulated proteins cathepsin D and pS2 by opioid agonists in hormone-sensitive breast cancer cell lines (MCF7 and T47D): evidence for an interaction between the two systems. *J Cell Biochem* 71:416-28

Panagiotou S, Martin PM, Castanas E 1997 Opioids agonists decrease the concentration of steroid receptors in hormone-sensitive breast cancer cell lines. In: *2ernes Journées of the IFR Jean Roche* Marseille, France

Paradiso A, Pezzetta A, Cellamare G, Schittulli F, Marzullo F, Reshkin SJ 2000 GnRH receptors in human breast cancer and its contiguous not-involved breast tissue. *J Endocrinol Invest* 23:90-6

Park CW, Shin YS, Ahn SJ, Kim SY, Choi EJ, Chang YS, Bang BK 2001 Thyroxine treatment induces upregulation of renin-angiotensin-aldosterone system due to decreasing effective plasma volume in patients with primary myxoedema. *Nephrol Dial Transplant* 16:1799-806

Parker TL, Kesse WK, Mohamed AA, Afework M 1993 The innervation of the mammalian adrenal gland. *J Anat* 183 (Pt 2):265-76

Partanen S, Syrjanen K 1982 Histochemically demonstrable enzyme activities and their independence of the hormone receptor content in female breast carcinoma. *Histopathology* 6:771-7

Paschke R, Metcalfe A, Alcalde L, Vassart G, Weetman A, Ludgate M 1994 Presence of nonfunctional thyrotropin receptor variant transcripts in retroocular and other tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 79:1234-8

Pasqualini R, Koivunen E, Kain R, Lahdenranta J, Sakamoto M, Stryhn A, Ashmun RA, Shapiro LH, Arap W, Ruoslahti E 2000 Amino peptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis. *Cancer Res* 60:722-7

Pawlikowski M, Melen-Mucha G, Mucha S 1999 The involvement of the renin-angiotensin system in the regulation of cell proliferation in the rat endometrium. *Cell Mol Life Sci* 55:506-10

Peeters PH, van Noord PA, Hoes AW, Grobbee DE 1998 Hypertension, antihypertensive drugs, and mortality from cancer among women. *J Hypertens* 16:941-7

Peluso JJ 1992 Morphologic and physiologic features of the ovary. In: *Pathobiology of the aging rat* (Mohr U, Dungworth DL, Capen CC, eds). Washington, DC, ILSI Press, 337-349

Petersson M 2002 Oxytocin decreases plasma levels of thyroid-stimulating hormone and thyroid hormones in rats. *Regul Pept* 108:83-7

Pfleiderer G, Celliers PG 1963 Isolation of an amino peptidase from kidney particle. *Biochem Z* 339:186-9

Pike MC, Spicer DV, Dahmouh L, Press MF 1993 Estrogens, progestogens, normal breast cell proliferation, and breast cancer risk. *Epidemiol Rev* 15:17-35

Plecas B, Ugresic N, Hristic M, Popovic A, Jovovic D 1989 The response of rat adrenal medulla to oxytocin. *Arch Int Physiol Biochim* 97:303-8

Podhajcer OL, Bravo AI, Sorin I, Guman N, Cerdeiro R, Mordoh J 1986 Determination of DNA synthesis, estrogen receptors, and carcinoembryonic antigen in isolated cellular subpopulations of human breast cancer. *Cancer* 58:720-9

Ponce G, Charli JL, Pasten JA, Aceves C, Joseph-Bravo P 1988 Tissue-specific regulation of pyroglutamate aminopeptidase II activity by thyroid hormones. *Neuroendocrinology* 48:211-3

Popovic A, Plecas B, Ugresic N, Glavaski A 1996 Altered gonadal hormone level and constant light-induced stress interfere with the response of the adrenal medulla to oxytocin. *Braz J Med Biol Res* 29:273-80

Poulain DA, Wakerley JB 1982 Electrophysiology of hypothalamic magnocellular neurones secreting oxytocin and vasopressin. *Neuroscience* 7:773-808

Press EM, Porter RR, Cebra J 1960 The isolation and properties of a proteolytic enzyme, cathepsin D, from bovine spleen. *Biochem J* 74:501-14

Prusak E, Siewinski M, Szewczuk A 1980 A new fluorimetric method for the determination of gamma-glutamyltransferase activity in blood serum. *Clin Chim Acta* 107:21-6

Pucell AG, Hodges JC, Sen I, Bumpus FM, Husain A 1991 Biochemical properties of the ovarian granulosa cell type 2-angiotensin II receptor. *Endocrinology* 128:1947-59

Pulido-Cejudo G, Conway B, Proulx P, Brown R, Izaguirre CA 1997 Bestatin-mediated inhibition of leucine aminopeptidase may hinder HIV infection. *Antiviral Res* 36:167-77

Qayum A, Gullick WJ, Mellon K, Krausz T, Neal D, Sikora K, Waxman J 1990 The partial purification and characterization of GnRH-like activity from prostatic biopsy specimens and prostatic cancer cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol* 37:899-902

Ram PT, Dai J, Yuan L, Dong C, Kiefer TL, Lai L, Hill SM 2002 Involvement of the mt1 melatonin receptor in human breast cancer. *Cancer Lett* 179:141-50

Rasmussen AA, Cullen KJ 1998 Paracrine / autocrine regulation of breast cancer by the insulin-like growth factors. *Breast Cancer Res Treat* 47:219-33

Rasmussen TE, Pedraza-Diaz S, Hardre R, Laustsen PG, Carrion AG, Kristensen T 2000 Structure of the human oxytocinase / insulin-regulated aminopeptidase gene and localization to chromosome 5q21. *Eur J Biochem* 267:2297-306

Rawlings ND, Barrett AJ 1993 Evolutionary families of peptidases. *Biochem J* 290 (Pt 1), 205-18

Ray A, Ratnakar N, Murthy NS, Sharma BK 2000 Adrenocorticotrophic hormone and growth factor receptors in breast cancer. *Indian J Exp Biol* 38:663-8

Reaux A, Iturrioz X, Vazeux G, Fournie-Zaluski MC, David C, Roques BP, Corvol P, Llorens-Cortes C 2000 Aminopeptidase A, which generates one of the main effector peptides of the brain renin-angiotensin system, angiotensin III, has a key role in central control of arterial blood pressure. *Biochem Soc Trans* 28:435-40

Reeck GR, de Haen C, Teller DC, Doolittle RF, Fitch WM, Dickerson RE, Chambon P, McLachlan AD, Margoliash E, Jukes TH, et al 1987 "Homology" in proteins and nucleic acids: a terminology muddle and a way out of it. *Cell* 50:667

Reiter RJ 1980 The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocr Rev* 1:109-31

Reiter RJ 1988 Pineal gland, cellular proliferation and neoplastic growth. An historical account. In: (Gupta D, Attanasio A, Reiter RJ, eds) *The Pineal Gland and Cancer*. Tubingen, Germany: Brain Research Promotion :41-64

Reiter RJ 1995 Functional pleiotropy of the neurohormone melatonin: antioxidant protection and neuroendocrine regulation. *Front Neuroendocrinol* 16:383-415

Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, Poeggeler B, Barlow-Walden L, Chuang J, Ortiz GG, Acuna-Castroviejo D 1995 A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J Pineal Res* 18:1-11

Rieu M, Portos C, Lissak B, Laplanche S, Sambor B, Berrod JL, Fombeur JP 1996 Relationship of antibodies to thyrotropin receptors and to thyroid ultrasonographic volume in

euthyroid and hypothyroid patients with autoimmune thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab* 81:641-5

Ritchie JC, Davis TP, Nemeroff CB 2003 Action of three ectopeptidases on corticotropin-releasing factor: metabolism and functional aspects. *Neuropsychopharmacology* 28:22-33

Rivera ES, Andrade N, Martin G, Melito G, Cricco G, Mohamad N, Davio C, Caro R, Bergoc RM 1994 Induction of mammary tumors in rat by intraperitoneal injection of NMU: histopathology and estral cycle influence. *Cancer Lett* 86:223-8

Robertson JF, Blamey RW 2003 The use of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) agonists in early and advanced breast cancer in pre- and perimenopausal women. *Eur J Cancer* 39:861-9

Robinson G, Evans JJ 1990 Oxytocin has a role in gonadotrophin regulation in rats. *J Endocrinol* 125:425-32

Roger P, Sahla ME, Makela S, Gustafsson JA, Baldet P, Rochefort H 2001 Decreased expression of estrogen receptor beta protein in proliferative preinvasive mammary tumors. *Cancer Res* 61:2537-41

Rose DP, Pruitt B, Stauber P, Erturk E, Bryan GT 1980 Influence of dosage schedule on the biological characteristics of N-nitrosomethylurea-induced rat mammary tumors. *Cancer Res* 40:235-9

Roselli-Reh fuss L, Robbins LS, Cone RD 1992 Thyrotropin receptor messenger ribonucleic acid is expressed in most brown and white adipose tissues in the guinea pig. *Endocrinology* 130:1857-61

Ruan W, Catanese V, Wiczorek R, Feldman M, Kleinberg DL 1995 Estradiol enhances the stimulatory effect of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on mammary development and growth hormone-induced IGF-I messenger ribonucleic acid. *Endocrinology* 136:1296-302

Ruan W, Kleinberg DL 1999 Insulin-like growth factor I is essential for terminal end bud formation and ductal morphogenesis during mammary development. *Endocrinology* 140:5075-81

Ruiz M, Montiel M, Jimenez E, Morell M 1987 Effect of thyroid hormones on angiotensinogen production in the rat in vivo and in vitro. *J Endocrinol* 115:311-5

Russell JA, Leng G, Bicknell RJ 1995 Opioid tolerance and dependence in the magnocellular oxytocin system: a physiological mechanism? *Exp Physiol* 80:307-40

Russo IH, Medado J, Russo J (a) 1989 Endocrine influences on mammary structure and development. In: *Integument and mammary gland of laboratory animals* (Jones TC, Mohr U, Hunt RD, eds). Berlin, Springer Verlag, 252-266

Russo IH, Russo J 1986 From pathogenesis to hormone prevention of mammary carcinogenesis. *Cancer Surv* 5:649-70

Russo IH, Russo J (a) 1996 Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies. *Environ Health Perspect* 104:938-67

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

Russo IH, Russo J 1998 Role of hormones in mammary cancer initiation and progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 3:49-61

Russo J 1983 Basis of cellular autonomy in the susceptibility to carcinogenesis. *Toxicol Pathol* 11:149-66

Russo J, Ao X, Grill C, Russo IH 1999 Pattern of distribution of cells positive for estrogen receptor alpha and progesterone receptor in relation to proliferating cells in the mammary gland. *Breast Cancer Res Treat* 53:217-27

Russo J, Calaf G, Russo IH 1993 A critical approach to the malignant transformation of human breast epithelial cells with chemical carcinogens. *Crit Rev Oncog* 4:403-17

Russo J, Gusterson BA, Rogers AE, Russo IH, Wellings SR, van Zwieten MJ 1990 Comparative study of human and rat mammary tumorigenesis. *Lab Invest* 62:244-78

Russo J, Hu YF, Silva ID, Russo IH 2001 Cancer risk related to mammary gland structure and development. *Microsc Res Tech* 52:204-23

Russo J, Hu YF, Yang X, Russo IH 2000 Developmental, cellular, and molecular basis of human breast cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr* 17-37

Russo J, Reina D, Frederick J, Russo IH 1998 Expression of phenotypical changes by human breast epithelial cells treated with carcinogens *in vitro* *Cancer Res* 48: 2837-2857

Russo J, Rivera R, Russo IH 1992 Influence of age and parity on the development of the human breast. *Breast Cancer Res Treat* 23:211-8

Russo J, Romero AL, Russo IH 1994 Architectural pattern of the normal and cancerous breast under the influence of parity. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 3:219-24

Russo J, Russo IH (b) 1980 Influence of differentiation and cell kinetics on the susceptibility of the rat mammary gland to carcinogenesis. *Cancer Res* 40:2677-87

Russo J, Russo IH (a) 1980 Susceptibility of the mammary gland to carcinogenesis. II. Pregnancy interruption as a risk factor in tumor incidence. *Am J Pathol* 100:497-512

Russo J, Russo IH 1987 Biological and molecular bases of mammary carcinogenesis. *Lab Invest* 57:112-37

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

Russo J, Russo IH 1993 Development pattern of human breast and susceptibility to carcinogenesis. *Eur J Cancer Prev* 2 Suppl 3:85-100

Russo J, Russo IH 1994 Toward a physiological approach to breast cancer prevention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 3:353-64

Russo J, Russo IH (b) 1996 Experimentally induced mammary tumors in rats. *Breast Cancer Res Treat* 39:7-20

Russo J, Russo IH 1997 Differentiation and breast cancer. *Medicina (B Aires)* 57 Suppl 2:81-91

Russo J, Russo IH 2000 Atlas and histologic classification of tumors of the rat mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 5:187-200

Russo J, Russo IH, vanZwieten MJ, Rogers AE, Gusterson B (c)1989 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

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

Russo J, Tahin Q, Lareef MH, Hu YF, Russo IH 2002 Neoplastic transformation of human breast epithelial cells by estrogens and chemical carcinogens. *Environ Mol Mutagen* 39:254-63

Russo J, Tait L, Russo IH 1983 Susceptibility of the mammary gland to carcinogenesis. III. The cell of origin of rat mammary carcinoma. *Am J Pathol* 113:50-66

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

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

Saavedra JM 1992 Brain and pituitary angiotensin. *Endocr Rev* 13:329-80

Sachdev D, Yee D 2001 The IGF system and breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 8:197-209

Sadoshima J, Aoki H, Izumo S 1997 Angiotensin II and serum differentially regulate expression of cyclins, activity of cyclin-dependent kinases, and phosphorylation of retinoblastoma gene product in neonatal cardiac myocytes. *Circ Res* 80:228-41

Saiki I, Fujii H, Yoneda J, Abe F, Nakajima M, Tsuruo T, Azuma I 1993 Role of aminopeptidase N (CD13) in tumor-cell invasion and extracellular matrix degradation. *Int J Cancer* 54:137-43

Saiki I, Murata J, Watanabe K, Fujii H, Abe F, Azuma I 1989 Inhibition of tumor cell invasion by ubenimex (bestatin) in vitro. *Jpn J Cancer Res* 80:873-8

Sakamura T 1987 Mammary embryogenesis. In: *The mammary gland* (Neville MC, Danile CW, eds). New York, Plenum Press, 37-66

Sakura H, Kobayashi H, Mizutani S, Sakura N, Hashimoto T, Kawashima Y 1983 Kinetic properties of placental aminopeptidase A: N-terminal degradation of angiotensin II. *Biochem Int* 6:609-15

Samson WK, Schell DA 1995 Oxytocin and the anterior pituitary gland. *Adv Exp Med Biol* 395:355-64

Sanchez-Barcelo EJ, Cos S, Fernandez R, Mediavilla MD 2003 Melatonin and mammary cancer: a short review. *Endocr Relat Cancer* 10:153-9

Sanderink GJ, Artur Y, Siest G 1988 Human aminopeptidases: a review of the literature. *J Clin Chem Clin Biochem* 26:795-807

Santisteban P, Kohn LD, Di Lauro R 1987 Thyroglobulin gene expression is regulated by insulin and insulin-like growth factor I, as well as thyrotropin, in FRTL-5 thyroid cells. *J Biol Chem* 262:4048-52

Sapino A, Cassoni P, Stella A, Bussolati G 1998 Oxytocin receptor within the breast: biological function and distribution. *Anticancer Res* 18:2181-6

Sapino A, Cassoni P, Stella A, Bussolati G 1998 Oxytocin receptor within the breast: biological function and distribution. *Anticancer Res* 18:2181-6

Sasano H, Frost AR, Saitoh R, Taniyama Y, Nagura H, Matsunaga G, Takehana K, Kimura M, Silverberg SG 1997 Immunolocalization of cyclins D and E and cyclin dependent kinase (cdk) 2 and 4 in human breast carcinoma. *Anticancer Res* 17:3685-90

Schally AV 1999 Luteinizing hormone-releasing hormone analogs: their impact on the control of tumorigenesis. *Peptides* 20:1247-62

Schally AV, Nair RM, Redding TW, Arimura A 1971 Isolation of the luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone-releasing hormone from porcine hypothalami. *J Biol Chem* 246:7230-6

Schomburg L, Bauer K 1995 Thyroid hormones rapidly and stringently regulate the messenger RNA levels of the thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptor and the TRH-degrading ectoenzyme. *Endocrinology* 136:3480-5

Schwabe C, McDonald JK 1977 Demonstration of a pyroglutamyl residue at the N terminus of the B-chain of porcine relaxin. *Biochem Biophys Res Commun* 74:1501-4

Schwartz MK 1976 Laboratory aids to diagnosis--enzymes. *Cancer* 37:542-8

Scopsi L, Balslev E, Brunner N, Poulsen HS, Andersen J, Rank F, Larsson LI 1989 Immunoreactive opioid peptides in human breast cancer. *Am J Pathol* 134:473-9

Seeburg PH, Adelman JP 1984 Characterization of cDNA for precursor of human luteinizing hormone releasing hormone. *Nature* 311:666-8

Sellitti DF, Tseng YC, Latham KR 1983 Nuclear thyroid hormone receptors in C3H/HeN mouse mammary glands and spontaneous tumors. *Cancer Res* 43:1030-8

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

Shavit Y, Depaulis A, Martin FC, Terman GW, Pechnick RN, Zane CJ, Gale RP, Liebeskind JC 1986 Involvement of brain opiate receptors in the immune-suppressive effect of morphine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:7114-7

Shimamura M, Hazato T, Iwaguchi T 1988 A new aminopeptidase in monkey cerebral membrane fraction: hydrolysis of enkephalin. *Brain Res* 445:350-3

Shimamura M, Hazato T, Iwaguchi T 1991 Enkephalin-degrading aminopeptidase in the longitudinal muscle layer of guinea pig small intestine: its properties and action on neuropeptides. *J Biochem (Tokyo)* 109:492-7

Shinada M, Akdeniz A, Panagiotopoulos S, Jerums G, Bach LA 2000 Proteolysis of insulin-like growth factor-binding protein-3 is increased in urine from patients with diabetic nephropathy. *J Clin Endocrinol Metab* 85:1163-9

Shoker BS, Jarvis C, Clarke RB, Anderson E, Hewlett J, Davies MP, Sibson DR, Sloane JP 1999 Estrogen receptor-positive proliferating cells in the normal and precancerous breast. *Am J Pathol* 155:1811-5

Shoker BS, Jarvis C, Sibson DR, Walker C, Sloane JP 1999 Oestrogen receptor expression in the normal and pre-cancerous breast. *J Pathol* 188:237-44

Silberstein GB, Daniel CW 1987 Investigation of mouse mammary ductal growth regulation using slow-release plastic implants. *J Dairy Sci* 70:1981-90

Silva JM, Dominguez G, Gonzalez-Sancho JM, Garcia JM, Silva J, Garcia-Andrade C, Navarro A, Munoz A, Bonilla F 2002 Expression of thyroid hormone receptor/erbA genes is altered in human breast cancer. *Oncogene* 21:4307-16

Sim MK, Choo MH, Qiu XS 1994 Degradation of angiotensin I to. *Biochem Pharmacol* 48:1043-6

Simoneaux V 1995 Neuropeptides of the mammalian pineal gland *Neuroendocrinol Lett* 17: 115-30

Singer B, Kusmierek JT 1982 Chemical mutagenesis. *Annu Rev Biochem* 51:655-93

Singh DV, Bern HA 1969 Interaction between prolactin and thyroxine in mouse mammary gland lobulo-alveolar development in vitro. *J Endocrinol* 45:579-83

Singh H, Kalnitsky G 1980 alpha-N-benzoylarginine-beta-naphthylamide hydrolase, an aminoendopeptidase from rabbit lung. *J Biol Chem* 255:369-74

Sinha YN, Tucker HA 1966 Mammary gland growth of rats between 10 and 100 days of age. *Am J Physiol* 210:601-5

Sipe HJ Jr, Jordan SJ, Hanna PM, Mason RP 1994 The metabolism of 17 beta-estradiol by lactoperoxidase: a possible source of oxidative stress in breast cancer. *Carcinogenesis* 15:2637-43

Sirbasku DA 1978 Estrogen induction of growth factors specific for hormone-responsive mammary, pituitary, and kidney tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75:3786-90

Sjoholm I, Yman L 1967 Degradation of oxytocin, lysine-vasopressin, angiotensin II and angiotensin-II-amide by oxytocinase (cystine aminopeptidase). *Acta Pharm Suec* 4:65-76

Slater TF 1984 Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J* 222:1-15

Slater TF 1989 Free radical mechanism in tissue injury In : *Cell Function and Disease*. Candeo LE, Todd LE, Packer L, Jaz J (eds) 209-218 New York, Plenum Publishing Corp

Slebodzinski AB, Brzezinska-Slebodzinska E, Styczynska E, Szejnoga M 1999 Presence of thyroxine deiodinases in mammary gland: possible modulation of the enzyme-deiodinating activity by somatotropin. *Domest Anim Endocrinol* 17:161-9

Smyth PP 1997 The thyroid and breast cancer: a significant association? *Ann Med* 29:189-91

Smyth PP 2000 Autoimmune thyroid disease and breast cancer: a chance association? *J Endocrinol Invest* 23:42-3

Smyth PP, Shering SG, Kilbane MT, Murray MJ, McDermott EW, Smith DF, O'Higgins NJ 1998 Serum thyroid peroxidase autoantibodies, thyroid volume, and outcome in breast carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 83:2711-6

Smyth PP, Smith DF, McDermott EW, Murray MJ, Geraghty JG, O'Higgins NJ 1996 A direct relationship between thyroid enlargement and breast cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 81:937-41

Sobel D, Vagnucci A 1982 Angiotensin II mediated ACTH release in rat pituitary cell culture. *Life Sci* 30:1281-6

Soloff MS, Swartz TL 1973 Characterization of a proposed oxytocin receptor in rat mammary gland. *J Biol Chem* 248:6471-8

Soto AM, Sonnenschein C 1987 Cell proliferation of estrogen-sensitive cells: the case for negative control. *Endocr Rev* 8:44-52

Spackman DH, Smith EL, Brown DM 1955 Leucine aminopeptidase. IV. Isolation and properties of the enzyme from swine kidney. *J Biol Chem* 212:255-69

Spencer JG 1954 The influence of the thyroid in malignant disease. *Br J Cancer* 8:393-411

Spicer DV, Ursin G, Parisky YR, Pearce JG, Shoupe D, Pike A, Pike MC 1994 Changes in mammographic densities induced by a hormonal contraceptive designed to reduce breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 86:431-6

Spinedi E, Rodriguez G 1986 Angiotensin II and adrenocorticotropin release: mediation by endogenous corticotropin-releasing factor. *Endocrinology* 119:1397-402

Spitzweg C, Joba W, Eisenmenger W, Heufelder AE 1998 Analysis of human sodium iodide symporter gene expression in extrathyroidal tissues and cloning of its complementary deoxyribonucleic acids from salivary gland, mammary gland, and gastric mucosa. *J Clin Endocrinol Metab* 83:1746-51

Sporn MB, Roberts AB 1985 Autocrine growth factors and cancer. *Nature* 313:745-7

Squires PM, Kennedy TG 1992 Evidence for a role for a uterine renin-angiotensin system in decidualization in rats. *J Reprod Fertil* 95:791-802

Steele MK, McCann SM, Negro-Vilar A 1982 Modulation by dopamine and estradiol of the central effects of angiotensin II on anterior pituitary hormone release. *Endocrinology* 111:722-9

Stefaneanu L, Kovacs K, Horvath E, Lloyd RV, Buchfelder M, Fahlbusch R, Smyth H 1994 In situ hybridization study of estrogen receptor messenger ribonucleic acid in human adenohypophysial cells and pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 78:83-8

Stirling D, Magness RR, Stone R, Waterman MR, Simpson ER 1990 Angiotensin II inhibits luteinizing hormone-stimulated cholesterol side chain cleavage expression and stimulates basic fibroblast growth factor expression in bovine luteal cells in primary culture. *J Biol Chem* 265:5-8

Stoica A, Saceda M, Doraiswamy VL, Coleman C, Martin MB 2000 Regulation of estrogen receptor-alpha gene expression by epidermal growth factor. *J Endocrinol* 165:371-8

Stoll BA 1965 Breast cancer and hypothyroidism. *Cancer* 18:1431-6

Stoll M, Meffert S, Stroth U, Unger T 1995 Growth or antigrowth: angiotensin and the endothelium. *J Hypertens* 13:1529-34

Stoll M, Steckelings UM, Paul M, Bottari SP, Metzger R, Unger T 1995 The angiotensin AT2-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J Clin Invest* 95:651-7

Strbak V, Giraud P, Resetkova E, Ouafik LH, Dutour A, Oliver C, Povazanova K, Randuskova A 1991 Thyroliberin (TRH) and TRH free acid (TRH-OH) present in milk do not originate from local synthesis in mammary gland. *Endocr Regul* 25:134-8

Subramanian A, Kothari L 1991 Melatonin, a suppressor of spontaneous murine mammary tumors. *J Pineal Res* 10:136-40

Sukumar S, Notario V, Martin-Zanca D, Barbacid M 1983 Induction of mammary carcinomas in rats by nitroso-methylurea involves malignant activation of H-ras-1 locus by single point mutations. *Nature* 306:658-61

Surmacz E, Guvakova MA, Nolan MK, Nicosia RF, Sciacca L 1998 Type I insulin-like growth factor receptor function in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 47:255-67

Szalay KS, Stark E 1981 Effect of beta-endorphin on the steroid production of isolated zona glomerulosa and zona fasciculata cells. *Life Sci* 29:1355-61

Tahmasebi M, Puddefoot JR, Inwang ER, Goode AW, Carpenter R, Vinson GP 1998 Transcription of the prorenin gene in normal and diseased breast. *Eur J Cancer* 34:1777-82

Takatani O, Okumoto T, Kosano H, Nishida M, Hiraide H, Tamakuma S 1989 Relationship between the levels of serum thyroid hormones or estrogen status and the risk of breast cancer genesis in Japanese women. *Cancer Res* 49:3109-12

Tallan HH, Jones ME, Fruton JS 1952 On the proteolytic enzymes of animal tissues. X beef spleen cathepsin C. *J Biol Chem* 194: 793-805

Tamarkin L, Danforth D, Lichter A, DeMoss E, Cohen M, Chabner B, Lippman M 1982 Decreased nocturnal plasma melatonin peak in patients with estrogen receptor positive breast cancer. *Science* 216:1003-5

Tannenbaum GS, Gurd W, Lapointe M, Pollak M 1992 Tamoxifen attenuates pulsatile growth hormone secretion: mediation in part by somatostatin. *Endocrinology* 130:3395-401

Taparowsky E, Shimizu K, Goldfarb M, Wigler M 1983 Structure and activation of the human N-ras gene. *Cell* 34:581-6

Taper H, Lans M, Economidou-Karaoglou A, de Gerlache J, Roberfroid M 1986 Variations in serum alkaline DNase activity: a possible clinical test for therapeutic prognosis of human tumors. *Anticancer Res* 6:949-56

Taylor A, Daims M, Lee J, Surgenor T 1982 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

Taylor AH, Ang VT, Jenkins JS, Silverlight JJ, Coombes RC, Luqmani YA 1990 Interaction of vasopressin and oxytocin with human breast carcinoma cells. *Cancer Res* 50:7882-6

Taylor C, Trowbridge P, Chilvers C 1991 Stress and cancer surveys: attitudes of participants in a case-control study. *J Epidemiol Community Health* 45:317-20

Thompson HJ, Adlakha H 1991 Dose-responsive induction of mammary gland carcinomas by the intraperitoneal injection of 1-methyl-1-nitrosourea. *Cancer Res* 51:3411-5

Thompson HJ, McGinley JN, Wolfe P, Singh M, Steele VE, Kelloff GJ 1998 Temporal sequence of mammary intraductal proliferations, ductal carcinomas in situ and adenocarcinomas induced by 1-methyl-1-nitrosourea in rats. *Carcinogenesis* 19:2181-5

Thompson HJ, Meeker LD 1983 Induction of mammary gland carcinomas by the subcutaneous injection of 1-methyl-1-nitrosourea. *Cancer Res* 43:1628-9

Tobe H, Kojima F, Aoyagi T, Umezawa H 1980 Purification by affinity chromatography using amastatin and properties of aminopeptidase A from pig kidney. *Biochim Biophys Acta* 613:459-68

Tonelli QJ, Sorof S 1981 Expression of a phenotype of normal differentiation in cultured mammary glands is promoted by epidermal growth factor and blocked by cyclic adenine nucleotide and prostaglandins. *Differentiation* 20:253-9

Tsai MJ, O'Malley BW 1994 Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem* 63:451-86

Tsang D, Ng SC, Ho KP (a) 1982 Development of methionine-enkephalin and naloxone binding sites in regions of rat brain. *Brain Res* 255:637-44

Tsang D, Ng SC, Ho KP, Ho WK (b) 1982 Ontogenesis of opiate binding sites and radioimmunoassayable beta-endorphin and enkephalin in regions of rat brain. *Brain Res* 281:257-61

Tsavaris NB, Kosmidis PA, Delides GS, Delides A, Papaioanou D, Pavlakis E, Lissaios B, Zaharakis M 1988 Correlation of histoenzymological studies with the response to chemotherapy and survival in breast cancer patients. *Cancer Lett* 42:225-30

Tsujimoto M, Mizutani S, Adachi H, Kimura M, Nakazato H, Tomoda Y 1992 Identification of human placental leucine aminopeptidase as oxytocinase. Arch Biochem Biophys 292:388-92

Tsukahara T, Ishiura S, Sugita H 1988 An ATP-dependent protease and ingensin, the multicatalytic proteinase in K652 cells. Eur J Biochem 177: 261-266

Tsutsumi Y, Matsubara H, Masaki H, Kurihara H, Murasawa S, Takai S, Miyazaki M, Nozawa Y, Ozono R, Nakagawa K, Miwa T, Kawada N, Mori Y, Shibasaki Y, Tanaka Y, Fujiyama S, Koyama Y, Fujiyama A, Takahashi H, Iwasaka T 1999 Angiotensin II type 2 receptor overexpression activates the vascular kinin system and causes vasodilation. J Clin Invest 104:925-35

Umezawa H 1980 Screening of small molecular microbial products modulating immune responses and bestatin. Recent Results Cancer Res 75:115-25

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

van der Pompe G, Antoni MH, Heijnen CJ 1996 Elevated basal cortisol levels and attenuated ACTH and cortisol responses to a behavioral challenge in women with metastatic breast cancer. Psychoneuroendocrinology 21:361-74

Vanderpump MP, Tunbridge WM, French JM, Appleton D, Bates D, Clark F, Grimley Evans J, Hasan DM, Rodgers H, Tunbridge F, et al 1995 The incidence of thyroid disorders in the community: a twenty-year follow-up of the Whickham Survey. Clin Endocrinol (Oxf) 43:55-68

Verkasalo PK, Pukkala E, Stevens RG, Ojamo M, Rudanko SL 1999 Inverse association between breast cancer incidence and degree of visual impairment in Finland. Br J Cancer 80:1459-60

Vertes M, Pamer Z, Garai J 1986 On the mechanism of opioid-oestradiol interactions. *J Steroid Biochem* 24:235-8

Vienonen A, Syvala H, Miettinen S, Tuohimaa P, Ylikomi T 2002 Expression of progesterone receptor isoforms A and B is differentially regulated by estrogen in different breast cancer cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol* 80:307-13

Vonderhaar BK 1982 Effect of thyroid hormones on mammary tumor induction and growth. In: *Hormonal regulation of experimental mammary tumors* (Leung BS, ed) Elmsford NY, Pergamon Press, 138-154

Vonderhaar BK 1984 Hormones and growth factors in the mammary gland development. In: *Control of cell growth and proliferation* (Venezial CM, ed) New York, Van Nostrand and Reinhold, 11-33

Vonderhaar BK 1987 Prolactin: transport, function, and receptors in mammary gland development and differentiation In: *The mammary gland: development, regulation, and function* (Neville MC, Daniel CW, eds) New York, Plenum Press, 383-438

Vonderhaar BK 1988 Regulation of development of the normal mammary gland by hormones and growth factors. *Cancer Treat Res* 40:251-66

Vonderhaar BK 1998 Prolactin: the forgotten hormone of human breast cancer. *Pharmacol Ther* 79:169-78

Vonderhaar BK, Greco AE 1979 Lobulo-alveolar development of mouse mammary glands is regulated by thyroid hormones. *Endocrinology* 104:409-18

Vonderhaar BK, Greco AE 1982 Effect of thyroid status on development of spontaneous mammary tumors in primiparous C3H mice. *Cancer Res* 42:4553-61

Wanebo HJ, Benua RS, Rawson RW 1966 Neoplastic disease and thyrotoxicosis. *Cancer* 19:1523-6

Waldschmidt-Leits E, Purr A 1929 Uber proteinase und carboxypolypeptidase aus pankreas (XVII mitterlung zur specifität tierischer proteasen). Berichte 62: 956-962

Wang XT, Unnerstall JR, Ibuki T, Wang H, Pappas GD 2000 Comparison of tyrosine hydroxylase and preproenkephalin expression in rat adrenal medullary explants in vitro and transplanted into subarachnoid space. Exp Neurol 161:346-60

Ward PE, Benter IF, Dick L, Wilk S 1990 Metabolism of vasoactive peptides by plasma and purified renal aminopeptidase M. Biochem Pharmacol 40:1725-32

Warren JB, Loi RK 1995 Captopril increases skin microvascular blood flow secondary to bradykinin, nitric oxide, and prostaglandins. FASEB J 9:411-8

Webb EC 1993 Enzyme nomenclature: a personal retrospective. FASEB J 7:1192-4

Weijl NI, Van der Harst D, Brand A, Kooy Y, Van Luxemburg S, Schroder J, Lentjes E, Van Rood JJ, Cleton FJ, Osanto S 1993 Hypothyroidism during immunotherapy with interleukin-2 is associated with antithyroid antibodies and response to treatment. J Clin Oncol 11:1376-83

Weinberg RA 1992 The integration of molecular genetics into cancer management. Cancer 70:1653-8

Welsch CW 1985 Host factors affecting the growth of carcinogen-induced rat mammary carcinomas: a review and tribute to Charles Brenton Huggins. Cancer Res 45:3415-43

Werner H, Amarant T, Fridkin M, Koch Y 1986 Growth hormone releasing factor-like immunoreactivity in human milk. Biochem Biophys Res Commun 135:1084-9

Werner H, Amarant T, Millar RP, Fridkin M, Koch Y 1985 Immunoreactive and biologically active somatostatin in human and sheep milk. Eur J Biochem 148:353-7

Werner H, Katz P, Fridkin M, Koch Y, Levine S 1988 Growth hormone releasing factor and somatostatin concentrations in the milk of lactating women. *Eur J Pediatr* 147:252-6

Werner H, Le Roith D 2000 New concepts in regulation and function of the insulin-like growth factors: implications for understanding normal growth and neoplasia. *Cell Mol Life Sci* 57:932-42

Werner S, Widstrom AM, Wahlberg V, Eneroth P, Winberg J 1982 Immunoreactive calcitonin in maternal milk and serum in relation to prolactin and neurotensin. *Early Hum Dev* 6:77-82

Wilk S 1986 Neuropeptide-specific peptidases: does brain contain a specific TRH-degrading enzyme? *Life Sci* 39:1487-92

Wilk S 1989 Inhibitors of TRH-degrading enzymes. *Ann N Y Acad Sci* 553:252-64

Wilk S, Wilk E, Magnusson RP 1998 Purification, characterization, and cloning of a cytosolic aspartyl aminopeptidase. *J Biol Chem* 273:15961-70

Williams JM, Daniel CW 1983 Mammary ductal elongation: differentiation of myoepithelium and basal lamina during branching morphogenesis. *Dev Biol* 97:274-90

Woodruff TK, Mayo KE 1990 Regulation of inhibin synthesis in the rat ovary. *Annu Rev Physiol* 52:807-21

Wright JW, Harding JW 1992 Regulatory role of brain angiotensins in the control of physiological and behavioral responses. *Brain Res Brain Res Rev* 17:227-62

Wright JW, Harding JW 1994 Brain angiotensin receptor subtypes in the control of physiological and behavioral responses. *Neurosci Biobehav Rev* 18:21-53

Wright JW, Krebs LT, Stobb JW, Harding JW 1995 The angiotensin IV system: functional implications. *Front Neuroendocrinol* 16:23-52

Wu Z, Maric C, Roesch DM, Zheng W, Verbalis JG, Sandberg K 2003 Estrogen regulates adrenal angiotensin AT1 receptors by modulating AT1 receptor translation. *Endocrinology* 144:3251-61

Yamada T, Horiuchi M, Dzau VJ 1996 Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:156-60

Yamahara N, Nomura S, Suzuki T, Itakura A, Ito M, Okamoto T, Tsujimoto M, Nakazato H, Mizutani S 2000 Placental leucine aminopeptidase / oxytocinase in maternal serum and placenta during normal pregnancy. *Life Sci* 66:1401-10

Yamamoto M, Chikuma T, Kato T 2003 Changes in the levels of neuropeptides and their metabolizing enzymes in the brain regions of nucleus basalis magnocellularis-lesioned rats. *J Pharmacol Sci* 92:400-10

Yamauchi T, Yamauchi N, Ueki K, Sugiyama T, Waki H, Miki H, Tobe K, Matsuda S, Tsushima T, Yamamoto T, Fujita T, Taketani Y, Fukayama M, Kimura S, Yazaki Y, Nagai R, Kadowaki T 2000 Constitutive tyrosine phosphorylation of ErbB-2 via Jak2 by autocrine secretion of prolactin in human breast cancer. *J Biol Chem* 275:33937-44

Yan ZJ, Roy D 1995 Mutations in DNA polymerase beta mRNA of stilbene estrogen-induced kidney tumors in Syrian hamster. *Biochem Mol Biol Int* 37:175-83

Yasin SA, Costa A, Besser GM, Hucks D, Grossman A, Forsling ML 1993 Melatonin and its analogs inhibit the basal and stimulated release of hypothalamic vasopressin and oxytocin in vitro. *Endocrinology* 132:1329-36

Yasin SA, Grossman A, Forsling ML 1996 Diurnal variation in the effect of melatonin on neurohypophysial hormone release from the rat hypothalamus. *Brain Res Bull* 39:1-5

Yee D 1994 The insulin-like growth factor system as a target in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 32:85-95

Yokoe T, Iino Y, Takei H, Horiguchi J, Koibuchi Y, Maemura M, Ohwada S, Morishita Y 1996 Relationship between thyroid-pituitary function and response to therapy in patients with recurrent breast cancer. *Anticancer Res* 16:2069-72

Young S, Hallows RC 1973 Tumours of the mammary gland. *IARC Sci Publ* 31-73

Yuan L, Collins AR, Dai J, Dubocovich ML, Hill SM 2002 MT(1) melatonin receptor overexpression enhances the growth suppressive effect of melatonin in human breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 192:147-56

Yuasa Y, Srivastava SK, Dunn CY, Rhim JS, Reddy EP, Aaronson SA 1983 Acquisition of transforming properties by alternative point mutations within c-bas / has human proto-oncogene. *Nature* 303:775-9

Yung SY 1988 Inhibins, activins and follistatins: gonadal proteins modulating the secretion of follicle-stimulating hormone. *Endocrine Rev* 9: 267-293

Zagon IS, McLaughlin PJ 1983 Increased brain size and cellular content in infant rats treated with an opiate antagonist. *Science* 221:1179-80

Zagon IS, McLaughlin PJ 1984 Duration of opiate receptor blockade determines tumorigenic response in mice with neuroblastoma: a role for endogenous opioid systems in cancer. *Life Sci* 35:409-16

Zagon IS, Roesener CD, Verderame MF, Ohlsson-Wilhelm BM, Levin RJ, McLaughlin PJ 2000 Opioid growth factor regulates the cell cycle of human neoplasias. *Int J Oncol* 17:1053-61

Zagon IS, Verderame MF, McLaughlin PJ 2002 The biology of the opioid growth factor receptor (OGFr). *Brain Res Brain Res Rev* 38:351-76

Zarbl H, Sukumar S, Arthur AV, Martin-Zanca D, Barbacid M 1985 Direct mutagenesis of Ha-ras-1 oncogenes by N-nitroso-N-methylurea during initiation of mammary carcinogenesis in rats. *Nature* 315:382-5

Zhang R, Haag JD, Gould MN 1990 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* 50:4286-90

Zhu YS, Yen PM, Chin WW, Pfaff DW 1996 Estrogen and thyroid hormone interaction on regulation of gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:12587-92

Zwart AS, Davis EA, Widdop RE 1998 Modulation of AT1 receptor-mediated contraction of rat uterine artery by AT2 receptors. *Br J Pharmacol* 125:1429-36

Zwieten MJ 1984 Normal anatomy and pathology of the rat mammary gland. In: *The rat as animal model in breast cancer research*. Boston, Martinus Nijhoff, 53-134