



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

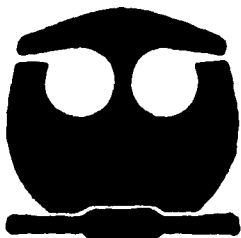
FACULTAD DE QUIMICA

**LA PARTICIPACION DE LA MITOCONDRIA EN LA
BIOENERGETICA DE LA LACTANCIA**



**EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA.**

**TRABAJO MONOGRAFICO DE
ACTUALIZACION
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A I
MARIA MAGDALENA SUASTEGUI MIRANDA**



MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO

PRESIDENTE Prof. RUTH ROMAN PALACIOS
VOCAL Prof. MAGDALENA OLIVA GONZALEZ
SECRETARIO Prof. HOMERO HERNANDEZ MONTES
1er. SUPLENTE Prof. LUZ DEL CARMEN CASTELLANOS ROMAN
2do. SUPLENTE Prof. RAQUEL ORTEGA MUÑOZ

. SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA.

BIBLIOTECA DEL HOSPITAL DE GINECOOBSTETRICIA No. 4

"LUIS CASTELAZO AYALA"

HEMEROBIBLIOTECA J.J. IZQUIERDO


DE LA FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

ASESOR



Dr. HOMERO HERNANDEZ MONTES

SUSTENTANTE



MARIA MAGDALENA SUASTEGUI MIRANDA

Todo tiene su tiempo, y todo
lo que se quiere debajo del cielo
tiene su hora.

Tiempo de nacer, y tiempo de
morir; tiempo de plantar y tiempo
de arrancar lo plantado.

Eclesiastés 3

Buena es la ciencia con herencia,
y provechosa para los que ven el sol,
Porque escudo es la ciencia, y
escudo es al dinero; mas la sabiduria
excede, en que da vida a sus poseedores.

Eclesiastés 7:11-12

D E D I C A T O R I A S .

**A MIS PADRES CON TODO CARIÑO
MI ADMIRACION Y MI ETERNO
AGRADECIMIENTO.**

A GERARDO.

No importa cuantas palabras escriba en una tesis como esta, nunca encontraré suficientes para expresar mi agradecimiento a Gerardo, mi esposo. El constantemente me asombra y me divierte. Su decidido apoyo y comprensión no tienen igual, aunque a veces no son merecidos ni adecuadamente correspondidos.

AL Dr. HOMERO HERNANDEZ MONTES

**A QUIEN AGRADEZCO SUS MAGNIFICOS
CONSEJOS Y SU APOYO INCONDICIONAL
PARA LA REALIZACIÓN DE ESTA TESIS.
POR SU ADMIRABLE ENTREGA EN EL
CONOCIMIENTO, MOTIVO DIGNO DE IMITARSE.**

Agradecimientos.

Agradezco al Dr. Homero Hernández Montes la concepción y dirección de este trabajo, su ayuda imprescindible y la confianza depositada en mi persona.

Deseo hacer mención a los profesores, amigos y otras personas que indirectamente han conducido mi interés hacia este trabajo y sobre todo a Iris, Martha y Lupita ya que sin su apoyo este trabajo no habría sido el mismo.

INDICE GENERAL

CAPITULO I	PAGINA
1.-Introducción.	1
CAPITULO II	
GENERALIDADES DE LA LACTANCIA	
2.1.- Anatomía de la mama.	14
CAPITULO III.	
CONTROL HORMONAL	
3.1.- Aspectos celulares y moleculares del control hormonal de la función mamaria	39
CAPITULO IV.	
SECRECION DE LA LECHE	
4.1.- Secreción.	80
CAPITULO V.	
LA MITOCONDRIA EN LA BIOENERGETICA DE LA LACTANCIA.	
5.1.- Bioenergética. Antecedentes	151
5.2.- Mitocondrias. Morfología y funciones	162
5.3.- Bioenergética y lactancia	176
CONCLUSION	203
BIBLIOGRAFIA	205

CAPITULO I

INTRODUCCION.

Desde los principios de la historia, la leche materna ha sido esencial para la continuidad de la raza humana. Hasta el siglo pasado la tasa de mortalidad era muy alta para los infantes que por alguna razón se veían privados de la leche materna; aún en nuestros días persiste una tasa alta en las zonas del mundo en las que no existen o son inseguros los sustitutos nutricionales adecuados de la leche humana. En los países subdesarrollados la incidencia de desnutrición proteico-energética y de enfermedades entéricas en niños pequeños está muy relacionada con la falta de leche materna, debido a un destete temprano y al uso cada vez mas frecuente de alimentación con biberón.

Las necesidades nutricionales del infante se satisfacen mejor con la leche materna que con cualquier otro sustituto, y la cual no ha sido posible mejorar como patrón de referencia.

En todo el mundo se ha usado la leche de otros mamíferos para alimentar a los infantes cuando la madre no puede o no desea amamantar a su hijo. Sin embargo, la leche de cada especie está diseñada biológicamente para satisfacer las necesidades de la desnutrición de esa especie. La condición y el grado de madurez metabólica al nacimiento, la duración del período de lactancia, la tasa de crecimiento postnatal temprana y la susceptibilidad a enfermedades específicas

varía de una especie a otra. Por ejemplo, el ternero al nacimiento, es mas pesado que el humano y su velocidad de crecimiento es casi dos veces la del infante humano, esto coincide con que la leche de vaca contiene aproximadamente el triple de proteínas (32.46 g/l) que la leche humana (10.6g/l)[1]. Por lo tanto, cuando se alimenta al infante humano con leche de vaca ésta debe de modificarse o agregarse en cantidades diferentes para adaptarla a las capacidades fisiológicas y requerimientos del infante.

Los intentos de imitar o replicar la leche humana alterando los componentes de la leche de vaca no han tenido éxito completo. La adaptación de la leche de vaca implica cambios en el contenido de nutrientes, así como en la concentración y balance de los mismos. La formulación de sustitutos comerciales de la leche humana ha cambiado continuamente según se ha ido ampliando el conocimiento nutricional y se puede esperar que haya mas cambios ya que se han identificado mas de 100 componentes no nutritivos, entre otras enzimas, hormonas y factores inmunológicos de la leche materna que afectan la digestión, la absorción y la utilización de nutrientes así como la resistencia a infecciones respiratorias y enterales y que tienen un efecto sobre el estado nutricional y la salud del infante. Por lo tanto, aunque se ha tratado, es casi imposible "humanizar" la leche de vaca.

Sin embargo, la disponibilidad de fórmulas seguras ha

ofrecido a las madres la oportunidad de alimentar a sus infantes en forma alternativa con pecho o con biberón.

En los Estados Unidos y en otros países tecnológicamente avanzados esta opción se volvió práctica común en la década de los años veinte con la comercialización de la leche evaporada de vaca, ofreciendo una base segura y uniforme para la adaptación, seguida después de fórmulas comerciales premodificadas. Como consecuencia, han ocurrido cambios importantes en las prácticas de alimentación infantil y la alimentación por amamantamiento ha declinado.

Por lo menos el 90% de los infantes en los Estados Unidos se alimentaron con pecho al principio del siglo veinte. Desafortunadamente, los estudios sobre la prevalencia de la alimentación por amamantamiento rara vez han usado la metodología o épocas comparables, pero a partir de diferentes fuentes pueden mostrarse esas tendencias [2].

La tendencia hacia la disminución en la alimentación al pecho en los Estados Unidos fue clara. Por 1965 sólo la cuarta parte de las madres iniciaron la lactancia. Tendencias semejantes se han reportado en otros países en donde se pueden conseguir fórmulas comerciales.

Un mayor interés por la alimentación al pecho se conoció por primera vez entre mujeres con buen nivel de educación y de ingresos medios superiores, sin embargo las mujeres con niveles económicos inferiores tienden a seleccionar la alimentación con biberón [3,4].

En 1920 se calculó que más del 75% de los infantes eran amamantados a los 6 meses de edad y el 10% a los 12 meses. En el período entre 1940 y 1960 aproximadamente la tercera parte de las madres con estudios dejaron de amamantar en el primer mes, otra tercera parte lo hacía en el segundo mes, y unas pocas continuaban alimentando con pecho hasta los 6 meses.

Por lo tanto, no sólo fueron menos las madres que iniciaron la alimentación al pecho, sino que las que lo hicieron destetaron a sus infantes a edades mas tempranas.

En la década pasada, así como parece estar aumentando la tendencia hacia el amamantamiento, también parece que la duración del mismo está en aumento. Los pocos reportes publicados en la década de los setentas sugieren que aproximadamente el 80% de los infantes que iniciaron su alimentación con leche materna seguían amamantados al mes y el 60% a los dos meses. Los datos publicados sobre infantes de mayor edad son muy escasos para discernir tendencias, pero los reportes informales sugieren que ya no es poco usual el amamantamiento durante por lo menos seis meses.

Factores que influyen en el cambio.

Las razones que explican la disminución en la prevalencia de la alimentación al pecho en los países tecnológicamente avanzados se han reportado ampliamente entre 1920 y 1960. La disponibilidad de la leche evaporada y de fórmulas premodificadas, la refrigeración, la distribución de agua potable y las técnicas de protección bacteriana

disminuyeron notablemente la mortalidad y la morbilidad de los infantes alimentados con biberón, y por primera vez las madres tuvieron una alternativa a la alimentación al pecho que no amenazara las vidas de sus niños.

Los cambios en la forma de vida y los puntos de vista de las mujeres sobre sus propias funciones en la sociedad acentuaron la tendencia hacia la alimentación con biberón. Un mayor número de mujeres trabajaba fuera de casa y regresaban a trabajar poco después del parto, por lo que el biberón se volvió el símbolo de la liberación femenina.

La tendencia a formar núcleos familiares reducían los contactos con las abuelas u otros parientes que habían tenido la experiencia de lactar y que podrían apoyar o aconsejar a la madre sobre la lactancia. Cada vez un número mayor de jóvenes no habían observado nunca la alimentación al pecho y ya no se consideraba a la lactancia como una secuela de la reproducción.

La especialización en la medicina significó a menudo, la sustitución del médico familiar por un obstetra cuya principal preocupación era la mujer durante el embarazo y el parto, y por un pediatra cuyo papel empezaba después del nacimiento del infante. Como consecuencia, faltaba una buena transición prenatal-postnatal necesaria para una buena lactancia.

Los partos en los hospitales sustituyeron los partos en la casa. La separación de la madre y del infante en cuartos

diferentes y el seguir un horario de alimentación eran prácticamente comunes. Por lo general, los niños se llevaban con las madres a intervalos de cuatro horas durante el día, pero no durante la noche.

Eran pocos los hospitales que permitían a la madre y al infante compartir el mismo cuarto y esta práctica mostraba una mayor proporción de madres amamantando con éxito. La duración de la estancia intrahospitalaria se volvió mas corta. En la década de los años cuarenta la madre y el infante permanecían en el hospital de 8 a 13 días lo cual permitía que se estableciera la lactancia [5].

En 1970 la estancia intrahospitalaria era algunas veces tan sólo de uno a dos días. A continuación, la madre volvía a las actividades hogareñas con una nueva responsabilidad, la del recién nacido, cuando la producción de leche aún era muy escasa y no se había establecido la relación madre-hijo en la lactancia, incrementando la angustia de la madre en un período crítico en el cual la tranquilidad produce mejores resultados.

Según iba disminuyendo la práctica de amamantar, las mujeres tenían menos exposición a la práctica y a los problemas de la lactancia y se volvían mas dependientes del consejo y guía de los médicos. Al mismo tiempo, los mismos médicos tenían cada vez menos experiencia y entrenamiento con los cuales guiar a la madre y los libros de pediatría dedicaban poco espacio al amamantamiento. También cambiaron

las actitudes de las mujeres y sus esposos, la alimentación con biberón se volvió una regla y la lactancia era vista como una práctica poco usual.

La alimentación con leche materna rara vez se practicaba en lugares públicos y hasta dentro de la familia a veces se volvía motivo de vergüenza.

Por lo tanto, las razones para la disminución en la alimentación al pecho no fueron fisiológicas sino sociales, culturales, emocionales y psicológicas.

El mayor interés sobre la alimentación al pecho en las dos últimas décadas surgió de las mismas madres, en especial las madres jóvenes. Una resistencia muy ampliamente distribuida hacia una sociedad del "plástico", estimuló la tendencia por un estilo de vida "natural". Como parte de este cambio cultural, un mayor número de mujeres han preferido experimentar el parto sin anestesia y amamantar a sus infantes. Esto se observó primero entre las mujeres con un mayor nivel educacional, pero los reportes recientes indican que la tendencia se ha extendido a un mayor rango socioeconómico. La falta de apoyo por los médicos condujo al principio a la formación de organizaciones como la Liga de la Leche, en la cual las mujeres se unían para compartir ideas y brindarse apoyo mutuo. Se organizaron grupos de la Childbirth Education Association en muchas comunidades. Últimamente, en pocos años, cada vez más médicos, enfermeras y otros trabajadores de la salud están recomendando y apoyando la

práctica de la alimentación al pecho.

Se ha calculado que del 90 al 95% de las madres son capaces de amamantar. Las contraindicaciones de la alimentación al pecho incluyen: que la madre no tenga deseos; alteraciones crónicas severas de la madre, tales como tuberculosis activa, septicemia, nefritis, enfermedad convulsiva o neurosis o psicosis severa; algunos medicamentos recibidos por la madre; o un defecto del infante, tales como paladar leporino o una enfermedad metabólica que requiere alimentos preparados especialmente. Anteriormente se creía que la mastitis era una razón para el destete, pero la creencia actual es de que un amamantamiento continuo previene congestionamientos durante el tratamiento contra la infección. El estrés fisiológico y nutricional ocasionado por un embarazo sumado a la lactancia sugiere que no se debe continuar con la lactancia mas allá de la primera mitad del embarazo. Se ha reportado hiperbilirrubinemia no conjugada en menos del uno por ciento de los infantes alimentados con pecho, atribuida a un metabolismo esteroide poco usual de la progesterona, el cual in vitro inhibe la actividad de la glucuronil transferasa.

Sin embargo, después de dos o tres días de alimentos sustitutivos, se puede continuar con un alto nivel de seguridad la alimentación por amamantamiento [2,5,6].

La mayoría de las mujeres que desean amamantar son capaces de alimentar al pecho, si se les hacen comprender los

mecanismos fisiológicos, si se les brinda un apoyo adecuado por el personal hospitalario y la familia y si están relativamente libres de ansiedad y estrés. La secreción generalmente queda bien establecida al final de la primera semana.

Un problema que presentan muchas madres y que por lo general ocurre entre la segunda y la quinta semana del postparto es el siguiente: La madre y el infante desarrollan en las primeras semanas una sincronización entre el suministro y la demanda. Casi al final del primer mes o a principios del segundo, el infante puede presentar un aumento súbito de la demanda, quizás relacionado con un aumento de la capacidad gástrica por incremento en el crecimiento. Aun si la madre ofrece ambos pechos al alimentarlo, el infante no queda satisfecho. La madre se angustia y esto puede disminuir el fenómeno de la bajada de la leche. En ese momento, con cierta frecuencia se suspende la alimentación con leche materna porque la madre o su médico deciden que ya no puede producir una cantidad suficiente de leche.

Se necesita tiempo para que el sistema neurohormonal responda al aumento de la succión produciendo mas prolactina y oxitocina. Esto generalmente se logra antes de 24 horas, produciéndose una mayor cantidad de leche. Mientras tanto, se puede seguir cualesquiera de dos procedimientos: colocar al bebé al pecho a intervalos cortos de tiempo en ocasiones brindará un estímulo suficiente. Por otro lado, el ofrecer un

biberón después de amamantarlo con la leche materna (no en sustitución) permite satisfacer al bebé; la madre se relaja y disminuye su tensión lo que ayuda a aumentar el suministro de leche. Los biberones no deben reemplazar la alimentación con el pecho y se deben evitar dar líquidos o sólidos entre los periodos de amamantamiento, de tal manera que el infante tenga hambre cuando se le ofrezca el pecho. También es posible, desde luego, que una mujer no pueda aumentar la producción de leche pero con frecuencia se toma una decisión apresurada al primer signo de dificultad.

Las mujeres varían ampliamente en su capacidad de producir leche. Algunas pueden amamantar exitosamente a gemelos, mientras que algunas deben usar fórmulas para complementar un aporte insuficiente para un hijo único. Para algunos infantes un solo pecho aporta lo suficiente para considerarse un alimento completo, de tal manera que se pueden alternar los pechos para alimentos sucesivos.

Una vez que la lactancia está bien establecida la madre puede tener mas libertad para las actividades sociales o hasta para trabajar fuera de casa sin suspender la alimentación al pecho. Después del amamantamiento se puede extraer la leche residual del pecho en forma manual y refrigerarla para alimentar posteriormente cuando la madre está fuera, o se puede sustituir un alimento al pecho con un biberón con fórmula.

Ya no es difícil encontrar instalaciones adecuadas para

que cuiden al infante de una madre que trabaja, pero muchas madres que trabajan amamantan en la mañana y en la noche y durante el día dejan la leche materna refrigerada o bien un sustituto comercial. Este horario tiene mas éxito con los infantes de mayor edad.

Un lapso amplio de tiempo entre los alimentos puede inhibir la producción de leche durante los primeros meses. Existe la posibilidad de que la madre que trabaja, necesite extraer la leche durante el día para aliviar el congestionamiento hasta que se adapte al horario.

La cantidad de leche que en realidad consume un infante es difícil de determinar. La colección de muestras de leche interfiere con el patrón usual de alimentación del infante y altera el estado psicológico de la madre. La respuesta fisiológica materna a una bomba mecánica o a la extracción manual es diferente a la de la succión del infante y el volumen de muestras recolectadas por estos métodos puede no reflejar la cantidad que el infante hubiera obtenido.

Los diferentes ambientes y técnicas de recolección pueden afectar el volumen debido a la sensibilidad del control neurohormonal de la producción de leche. La variación diurna es tan grande que la muestra de un solo alimento puede que no sea proporcionalmente representativa del volumen total; y la recolección de 24 horas generalmente no es práctica.

La mayoría de los datos disponibles sobre el volumen de

leche son indirectos, calculados por los pesos del infante antes y después de los alimentos. El volumen de leche aumenta rápidamente en el primer mes, según se va estableciendo la lactancia, y el aumento del volumen total es compatible con el aumento de peso del infante.

El volumen de leche puede disminuir algo por la menstruación, pero es probable que el contenido de nutrientes no se afecte. La reinstalación tanto de la menstruación como de la ovulación ocurren más tarde en la mujer que está lactando que en la que no lo está, así que el amamantamiento proporciona cierta protección contra la concepción. El período de infertilidad ha variado de 2 a 14 meses en diferentes poblaciones estudiadas y está relacionada con la intensidad de la alimentación al pecho. Los períodos más largos de alimentación al pecho total, sin alimentos complementarios para el infante, se asocian con una reinstalación más tardía del ciclo estral, no obstante, el estado nutricional de la mujer puede ser un factor determinante del momento de la reinstalación.

En países tropicales se encontró que las primeras menstruaciones después del parto ocurrían antes en mujeres que recibían alimentos adicionales durante el embarazo y la lactancia que en los controles, sugiriendo que existe un mayor retardo en la reinstalación de la menstruación y la ovulación en mujeres con desnutrición crónica que en mujeres bien nutridas. Debido a la gran variación individual, la

lactancia no es un método anticonceptivo confiable, especialmente para mujeres con un buen estado nutricional.

Los efectos de los anticonceptivos orales sobre el volumen y el contenido de nutrientes en la leche de pecho no se han definido claramente, las diferencias en los resultados de los estudios publicados pueden deberse a diferencias en los tipos de anticonceptivos usados, a las dosis, a la etapa de la lactancia, a la duración del estudio, al estado nutricional de la mujer y a las costumbres culturales que afectan tanto la lactancia como la rápida concepción después del parto [7]. Sin embargo, parece que al establecerse la lactancia el impacto del estímulo de succión sobrepasa los efectos inhibitorios de los gestógenos.

La mayoría de los estudios han mostrado menor duración de la lactancia, la inhibición de la producción de leche y menor incremento ponderal infantil, en particular con el uso amplio de los compuestos estrogénicos.

CAPITULO II

ANATOMIA DE LA MAMA.

El término seno incluye una variedad de estructuras anatómicas situadas en la región anterior del tórax que incluye a la glándula mamaria, una estructura glandular cutánea altamente especializada compuesta de elementos que están involucrados en la secreción y la eyección de la leche.

Esta glándula es característica de los mamíferos y su desarrollo y estructura son notablemente similares aún en las especies inferiores de esta clase. En los humanos, la glándula está compuesta de algunos 15 a 20 lóbulos, los cuales se originan en el pezón y la areola y se difunden por la pared torácica anterior y lateral. La glándula mamaria es solo uno de los componentes del pecho, otros componentes incluyen una cantidad variable de grasa, tejido conectivo, vasos, nervios y linfáticos.

CARACTERISTICAS ANATOMICAS DE LA MAMA.

SUPERFICIE ANATOMICA, ESTRUCTURAS DE SOPORTE Y RELACIONES GENERALES.

El seno cubre los músculos pectoral mayor, el serrato anterior y el oblicuo externo. Se extiende desde la segunda a la sexta costilla y del esternón a la línea media axilar. El tejido glandular contenido dentro puede alargarse mas allá del órgano en sí y extenderse lateralmente en la axila hacia arriba hasta la clavícula y hacia abajo hasta la fosa epigástrica (Fig.1).

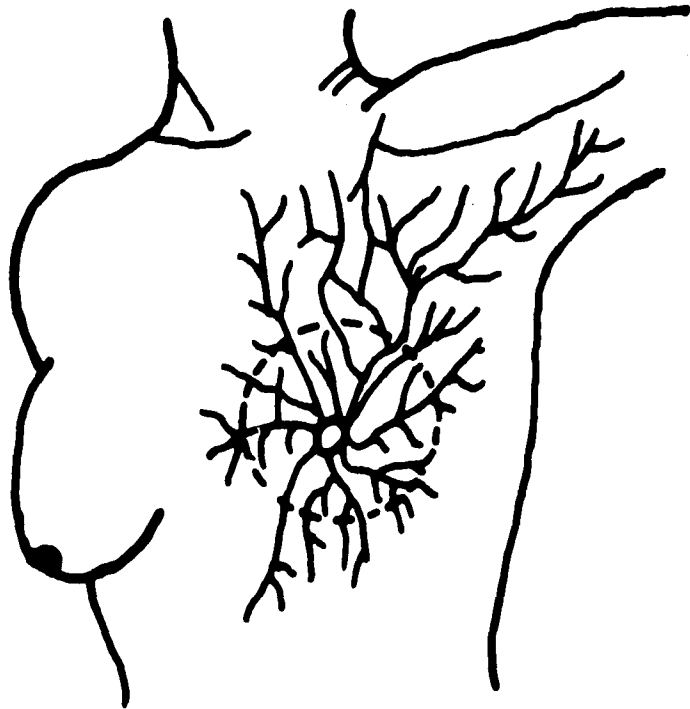


Fig.1.- Diagrama que muestra la extensión del tejido mamario. Nótese la extensión de los elementos ductales hacia la axila y hacia el epigastrio [8]

La cantidad mas grande de tejido glandular se localiza en el cuadrante lateral superior. Alrededor y cubriendo el tejido glandular está una zona, frecuentemente grande de tejido adiposo.

La mama está firmemente unida a la cubierta de la piel en el área de la areola por el tejido conectivo el cual rodea los conductos y por ligamentos o bandas gruesas de tejido conectivo el cual atraviesa y subdivide el tejido adiposo y los elementos glandulares [8].

El pezón y la areola.

El pezón es una condensación de tejido epitelial, el cual generalmente, aunque con gran variabilidad, es localizado al nivel del cuarto espacio intercostal. Los conductos lactíferos de la glándula mamaria se vacían en él. Está rodeado por piel pigmentada especializada, la areola, la cual contiene melanóforos y se oscurece durante el embarazo, y conserva esa coloración posteriormente. La areola también contiene glándulas sebáceas, las cuales se hipertrofian y forman papilas durante el embarazo, (folículos de Montgomery), glándulas sudoríparas y otras estructuras accesorias con conductos pequeñísimos abriéndose directamente en el epitelio areolar escamoso estratificado [9].

VASOS Y NERVIOS.-

El seno está altamente vascularizado y la sangre de la que se provee deriva principalmente de las arterias torácica lateral y la torácica interna.

La arteria torácica lateral, una rama directa de la arteria axilar, provee la mayor cantidad de la sangre a las zonas superficiales del órgano.

El seno está innervado principalmente por los nervios intercostales los cuales llevan fibras sensoras a la piel y fibras autónomas al músculo liso y los vasos sanguíneos. El complejo del pezón y la areola están innervados únicamente por las ramas interiores del cuarto nervio intercostal.

Un punto de considerable importancia porque a la interrupción de esta innervación puede interferir con la rama aferente del reflejo de la bajada de la leche, por lo que deben evitarse incisiones alrededor de la areola [10].

DRENAJE LINFÁTICO.-

Un rico plexo de vasos linfáticos drena el seno y la glándula mamaria. Existen dos vías importantes las cuales se originan en los lóbulos del seno y corren profundamente dentro de él.

La principal avenida de drenaje (más del 75%) es hacia la axila a través de los nódulos axilar apical y axilar pectoral. La mayoría de estos se sitúan cerca de los vasos de la superficie anterior del músculo serrato anterior.

El drenaje linfático del pezón y la areola sigue al drenaje del parénquima glandular profundo y no al canal adyacente superficial de salida de la piel [11].

DESARROLLO EMBRIOLOGICO.-

Desarrollo normal.-

La glándula mamaria es un órgano derivado del ectodermo, el cual puede ser definitivamente identificado a las 6 semanas después de la fertilización [12]. En este tiempo, una placa de células ectodérmicas pueden ser vistas agrupadas en una línea que se extiende desde la base axilar a la región posterior del órgano o región inguinal. Esto es conocido como la línea mamaria o colina mamaria. En animales inferiores, la línea mamaria es una discreta entidad identificable debido a que se extiende por la superficie abdominal y retrocede en la región del tórax. Cerca del fin de la sexta semana, el puente ectodérmico forma un abismo y el ectodermo empieza a penetrar el mesénquima subyacente, produciéndose la glándula mamaria definitiva (Fig.2).

En los roedores, cerca de la semana 20, 16 a 24 brotes primitivos invaden el tejido conectivo mesodérmico. Estos brotes que invaden el ectodermo continúan creciendo profundamente con la gestación y empiezan a ramificar. Solo los principales conductos lactíferos están presentes al nacimiento con la mayoría de los conductos y virtualmente todas las estructuras glandulares secretoras, esperando los cambios hormonales de la pubertad.

Las células ectodérmicas altamente diferenciadas desarrollan un contacto directo con los conductos desarrollados y el mesénquima. Estas células destinadas a

convertirse en células mioepiteliales, están localizadas alrededor de los conductos desarrollados [13].

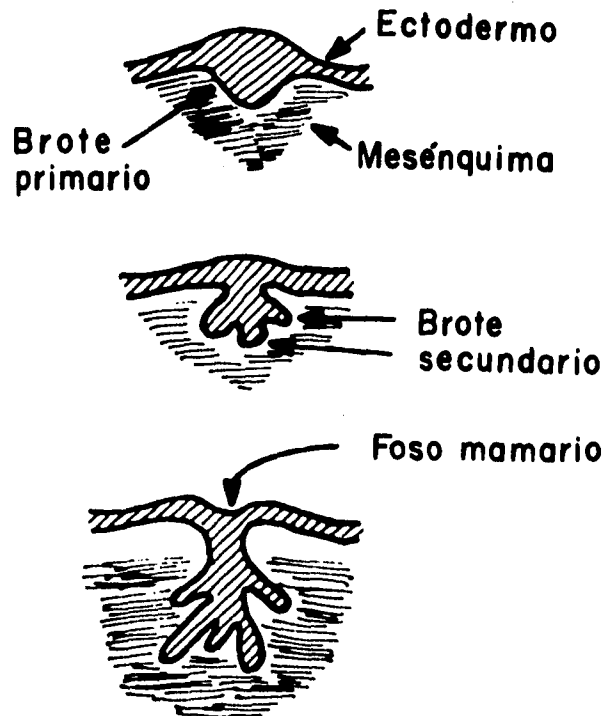


Fig. 2.- Esquema mostrando el desarrollo temprano de la glándula mamaria.

Conforme la gestación avanza, el tejido conectivo fibroso y los adipositos se desarrollan del mesénquima cercano. El desarrollo de los elementos alveolares intralobulares esperan la llegada de la pubertad pero el desarrollo completo ocurrirá solo durante el embarazo.

El pezón y la areola se desarrollan mas tarde en la gestación. Aproximadamente a los 8 meses, la superficie globular del primordio se aplanan y cornifica. Un poco antes del nacimiento, este primordio se transforma en el pezón por la proliferación del mesénquima adyacente produciéndose la eversión del primordio cornificado. Mas tarde el ectodermo y el mesénquima que circundan directamente al pezón se diferencian en la areola definitiva.

DESARROLLO POSTNATAL.-

El desarrollo de la glándula mamaria durante la infancia es menor si se compara con el crecimiento general del cuerpo hasta que se acerca la pubertad [14,15].

ADOLESCENCIA.-

Aunque los principales cambios de la glándula mamaria son iniciados en la pubertad, el desarrollo ulterior de la glándula varía enormemente de mujer a mujer, haciendo imposible clasificar la estructura de la glándula mamaria basados en la edad [16,17].

El período adolescencia empieza con el primer signo de cambio sexual en la pubertad y termina con la maduración

sexual. La pubertad en las hembras empieza entre las edades de 10 y 12 años. Con el acercamiento de la pubertad la mama rudimentaria empieza a mostrar un crecimiento activo tanto en el tejido glandular como en el estroma que lo rodea.

El incremento glandular es debido al crecimiento y la división de pequeños grupos o racimos de conductos primarios y secundarios.

Varios autores han mostrado a través de experimentos realizados en cultivo de mama normal en presencia de timidina tritiada que el epitelio de la glándula mamaria normal muestra variaciones en la síntesis de DNA [18].

Se ha descrito una disminución en la cadena guía del DNA en el epitelio mamario durante la fase folicular con un incremento significativo durante la fase lútea, encontrando que los lóbulos de la glándula mamaria humana en reposo, presentan un pico de actividad mitótica durante la fase lútea (25 días del ciclo) y que ocurren cambios cíclicos en la deleción celular o apoptosis, tres días después del pico de mitosis.

Aunque la proliferación y la muerte celulares parecen balancearse para mantener el equilibrio de la mama humana en reposo, el desarrollo mamario, inducido por las hormonas ováricas durante el ciclo menstrual, nunca retorna al punto de inicio del ciclo precedente.

El estudio del tejido mamario normal de 22 mujeres adultas con edades entre 18 y 63 años de edad, permitió

determinar que en las glándulas de las mujeres no embarazadas existen dos tipos de lóbulos identificables además de los lóbulos ya descritos como tipo 1.

La transición de los lóbulos tipo 1 al de tipo 2 y de este al tipo 3 es un proceso gradual de producción de yemas o nuevos brotes alveolares. En los lóbulos tipo 2 y 3 estos son conocidos como ductulos; ellos incrementan en número de aproximadamente 11 en el lóbulo 1 a 47 y 80 en los lóbulos tipo 2 y 3 respectivamente.

Los lóbulos tipo 1 son encontrados predominantemente en la mama de mujeres jóvenes que no han parido, mientras que los lóbulos tipo 2 y 3 son encontrados frecuentemente en las glándulas de mujeres que lo han hecho.

La determinación de la actividad proliferativa (DNA) de estas estructuras por medición de la incorporación de timidina tritiada en el epitelio mamario se realiza por la técnica de Russo y Russo (1982), quienes han demostrado que el DNA de los lóbulos tipo 2 está alrededor de 0.99 y el de los lóbulos tipo 3 es de 0.25 $\mu\text{g}/\text{DNA}$ [17,19].

Estos valores son 5 y 20 veces mas bajos que los encontrados en los lóbulos tipo 1 y 60 veces mas bajos que en los brotes terminales. Es importante enfatizar que en el estudio de la actividad proliferativa de la glándula mamaria, cada compartimento topográfico ha sido analizado individualmente y existe un gradiente del brote terminal al lóbulo tipo 3, las estructuras de los conductos tienen una

actividad proliferativa intermedia entre los lóbulos tipo 1 y tipo 2.

Este gradiente no parece modificarse con el envejecimiento, aunque en mujeres mayores toda la actividad proliferativa se reduce significativamente.

En la figura No. 3 se muestran los diferentes tipos de lóbulos y el análisis topográfico individual.

ESTRUCTURA DE LA GLANDULA MAMARIA.

CARACTERISTICAS GENERALES.-

En la pubertad, los 15 a 20 conductos embrionarios primitivos formados por la invaginación del ectodermo, arborizan extensamente en lóbulos separados. En la hembra adulta, aproximadamente de 10 a 15 de estos lóbulos son funcionales y el resto permanece como vestigios. Estos lóbulos drenan hacia el pezón por medio de diferentes conductos excretores llamados los conductos lactíferos, los cuales se dilatan ligeramente dentro del pezón para formar los senos lactíferos (Fig 4)

Hicken describió la distribución completa de los conductos en la zona anterolateral del tórax (mamografía) después de la inyección de medio de contraste en los conductos lactíferos. Debido al alto grado de complejidad y ramificación de los conductos, la glándula mamaria es clasificada histológicamente como una glándula tuboalveolar compleja [20].

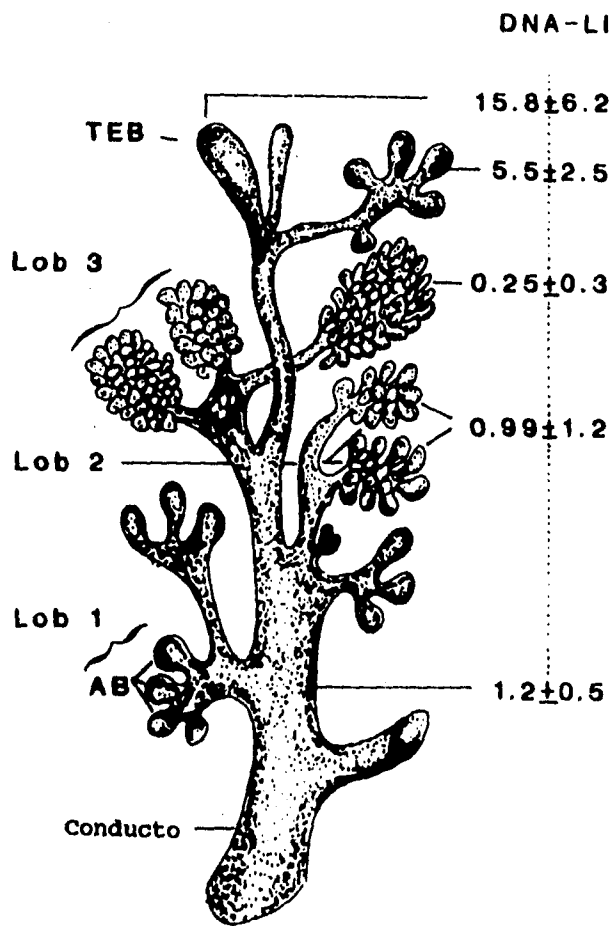


Fig 3.- Representación esquemática de los compartimentos de la glándula mamaria humana en donde se observan los brotes terminales, los brotes alveolares y los diferentes tipos de lóbulos[17].



Fig 4.- Esquema del sistema de conductos lactíferos y el pezón de una hembra de 21 años. Obsérvese como los conductos lactíferos convergen en el pezón. Los alveolos secretores se localizan en la periferia de los conductos intralobulares.

Las unidades secretoras básicas de la glándula son los alveolos, pequeñas evaginaciones en forma de saco en los conductos alveolares, los cuales están compuestos de una monocapa de células epiteliales mamarias que son cuboides y que reposan sobre una membrana basal clásica. Agrupadas alrededor de un conducto mamario parecido a un racimo de uvas, estos alveolos (y las porciones distales de los conductos alveolares) producen las sustancias a ser secretadas, que caracterizan a la glándula.

Son las unidades secretoras, las que muestran el mayor grado de crecimiento y regresión durante las diferentes fases del desarrollo de la glándula mamaria.

Alrededor de los alveolos y situado entre ellos y la lámina basal, se localizan unas células altamente especializadas que se cree, también se derivan del ectodermo. Esas células mioepiteliales o "células en forma de araña", contienen elementos tanto del músculo liso como de las células epiteliales y rodean a cada unidad alveolar como si fuera una canasta y también son encontradas a lo largo de los canales interlobulares. Estas células contráctiles son responsables de la eyección de la leche de los alveolos y los conductos alveolares. La presencia de estas células mioepiteliales (llamadas también "células canasta") ha sido citada como la evidencia de una relación morfogenética entre la glándula mamaria y las glándulas sudoríparas cutáneas. Clásicamente, el desarrollo postpuberal de la glándula mamaria

ha sido dividido en tres etapas funcionales principales: 1) una etapa inactiva o de reposo, visto en las hembras sexualmente maduras no lactante, no embarazadas, 2) una fase de proliferación o fase activa durante el embarazo y 3) la fase lactante o fase secretora durante la producción de la leche.

En ocasiones se incluye una cuarta etapa de regresión o atrofia. Esta ocurre al cesar la lactancia y después de la menopausia.

ETAPA INACTIVA O DE REPOSO.-

Previo al embarazo, la glándula mamaria de la hembra adulta es inactiva, lo cual permite la fácil identificación y organización de su parénquima y del estroma. Como se muestra en el esquema 5, los lóbulos consisten de túbulos o conductos limitados por un epitelio y embebidos en un estroma de tejido conectivo, se encuentran muy separados y los tejidos conectivo y adiposo son los elementos predominantes. El tejido conectivo interlobular es denso, fibroso y marcadamente menos celular que el tejido conectivo intralobular.

Un punto de importancia, es que el parénquima glandular del seno aparentemente no responde al ambiente hormonal de un modo totalmente sincrónico.

Las diferentes áreas dentro del mismo seno pueden cambiar en un grado mayor o menor. Por esta razón, se puede observar una gran variabilidad dentro de los lóbulos y

entre los lóbulos al analizar diferentes secciones histológicas.

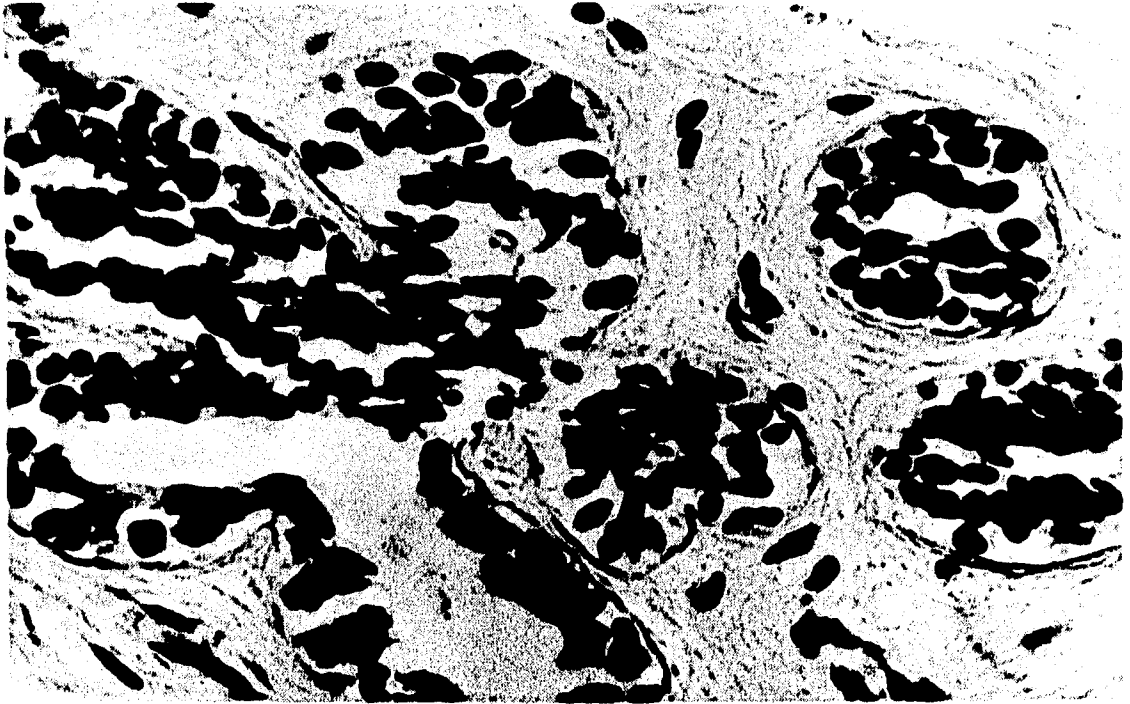


Fig.5.- Esquema de la etapa inactiva. Se observa una gran cantidad de tejido conectivo en relación con el parénquima. Son visibles pocos conductos estratificados sin evidencias de desarrollo alveolar.

LA FASE PROLIFERATIVA O FASE ACTIVA

Al tiempo en que se establece la menarquia se puede observar un desarrollo alveolar moderado, pero al presentarse los cambios hormonales del embarazo, la glándula mamaria experimenta una fase espectacular de crecimiento y proliferación.

En las etapas tempranas del embarazo, este incremento es debido a una verdadera hiperplasia de los elementos secretores y de los conductos, mientras que en el último trimestre la hipertrofia de las células alveolares y la actividad secretora son la base de los cambios vistos.

Durante el mismo intervalo, se observa un descenso significativo en el estroma de soporte con una marcada reducción en las células adiposas y en el tejido conectivo fibroso. La fase activa está caracterizada por un rápido incremento en el número de alveolos.

El primer trimestre del embarazo, los alveolos secretores están colapsados pero como la gestación avanza los sáculos se expanden y alargan transformando a la glándula en una estructura tuboalveolar clásica. En el epitelio de los alveolos se observan mitocondrias relativamente grandes y un aparato de Golgi aumentado. Simultáneamente hay un incremento en la cantidad de retículo endoplásmico rugoso.

Al iniciar el sexto mes del embarazo se observa la acumulación de lípidos en las células epiteliales alveolares.

LACTANCIA O FASE SECRETORA.

Durante los primeros pocos días después del parto, se observan cambios significativos en los elementos secretores de la glándula mamaria. Las células que limitan los sáculos alveolares desarrollan las características citológicas clásicas de una célula exocrina. En la base de la célula, numerosos ribosomas libres pueden ser vistos dentro del citoplasma. Estos son rápidamente reemplazados por membranas del retículo endoplásmico rugoso, las cuales son poco evidentes a las 48 horas postparto (Fig 6).

Por el uso de colorantes especiales para los lípidos, parece que algunas de las inclusiones de lípidos no son homogéneas [21].

Hasta el advenimiento de la microscopía electrónica hubo una gran discusión sobre la naturaleza del proceso secretor que se presenta en la célula durante la lactancia. La glándula mamaria fue primero clasificada como una mezcla de glándula merocrina y apocrina, ya que además de la secreción de lípidos se observan pequeños gránulos de secreción de proteínas en el citoplasma apical con el vaciamiento subsecuente de sus contenidos en el lumen alveolar.

Estudios recientes han mostrado que los productos proteínicos son liberados en el lumen alveolar por exocitosis, en la cual el material secretado sale directamente por el ápice celular sin pérdida del citoplasma; esto se debe a la fusión de la membrana de los gránulos secretores con la membrana plasmática apical. Sin embargo, el

proceso de liberación de las gotas de lípidos produce la pérdida de un poco de citoplasma, en menor cantidad que la cantidad que fue originalmente supuesta de los estudios del microscopio óptico [22].

Durante la lactancia los desmosomas desaparecen dejando la zona de oclusión para limitar estrictamente el paso de los componentes extracelulares en la luz alveolar.

Estas uniones han sido observadas en las membranas laterales de las células y se cree que son sitios de transporte de moléculas pequeñas entre las células. La membrana basal es proyectada en invaginaciones interdigitales con gran contenido de mitocondrias. Dentro de 48 horas, el epitelio alveolar se vuelve cuboide y continua incrementando su actividad secretora. Los alveolos empiezan a distenderse con la leche y conforme lo hacen se deforman. Se observa la compresión del tejido conectivo intraalveolar limítrofe y, en secciones histológicas, se observan los alveolos totalmente distendidos simulando a los folículos tiroideos llenos de coloides. En el esquema 7 se muestra el complejo de esas uniones.



Fig.6.- Esquema del desarrollo alveolar y de los conductos en una mujer nuligravida de 19 años. Con el inicio del ciclo menstrual se inicia un modesto desarrollo de los elementos de los conductos y secretores.

Anatomía del Pecho

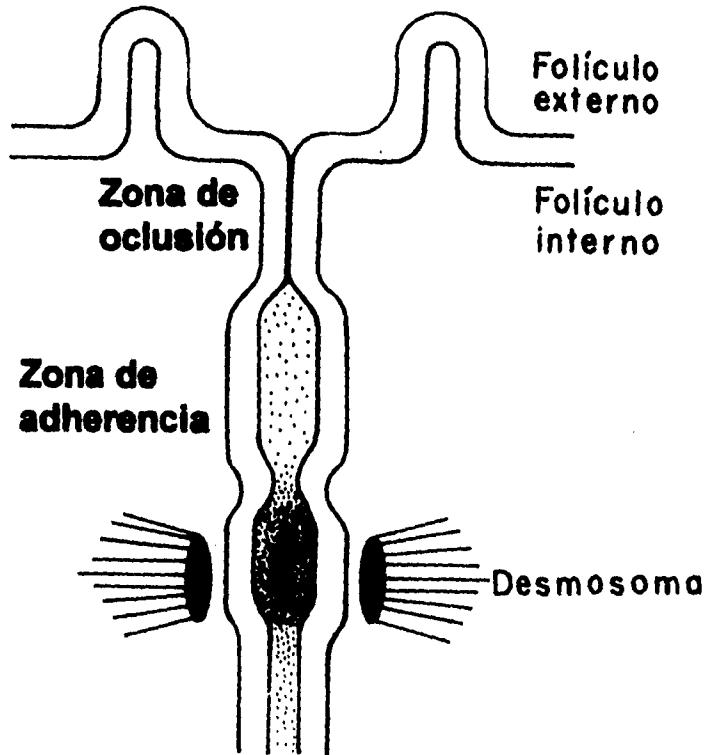


Fig 7.- Diagrama del complejo de uniones. Estas uniones se observan en los conductos a lo largo del ciclo mamario, sin embargo los desmosomas desaparecen de las células alveolares durante la lactancia dejando solamente la zona de oclusión para limitar la migración de componentes extracelulares.

La contracción de las células mioepiteliales ayudan en la expulsión del material del lumen alveolar a los conductos alveolares ayudando en sí a impulsar los productos secretores hacia los conductos lactíferos y a los senos.

Un proceso cíclico de la actividad secretora, la dilatación luminal, y la expulsión en el sistema de conductos continúa durante la lactancia, como dirigido por la succión del infante y el reflejo de la bajada de la leche.

REGRESION, INVOLUCION O ATROFIA.

La succión regular estimula la secreción continua de la leche. Cuando se detiene, la glándula rápidamente cesa su actividad secretora y experimenta una fase relativamente rápida de regresión. En pocos días, la leche que permanece en la luz de los alveolos es reabsorbida. Se observa una disminución constante en los elementos del parénquima como consecuencia de la reaparición de grandes cantidades de tejido conectivo intralobular e interlobular.

La glándula, sin embargo, no regresa al estado original prepuberal, ya que persisten muchos alveolos [23].

Conforme esto ocurre, los restos celulares son removidos por los macrófagos y los histiocitos y la glándula permanece entonces en una condición de reposo hasta el siguiente embarazo. Cerca de la menopausia, pero generalmente antes de que cese la función ovárica, empieza la atrofia de la glándula mamaria y los tejidos anexos. La pérdida del tejido empieza inicialmente en la zona periférica del lóbulo, pero

eventualmente casi todos los conductos alveolares e intralobulares se pierden (Fig. 8).



Fig. 8.- Esquema de conductos mamarios de una hembra de 34 años, cinco años después de su primer parto. Se nota el grado de regresión en los elementos secretores y conductos con un incremento en la relación estroma/parénquima [8].

RELACION PARENQUIMA-ESTROMA.-

La estructura tridimensional de la glándula requiere que los estudios morfométricos sean llevados al cabo en preparaciones en portaobjetos, aunque este es el único método en el cual la arquitectura del órgano se preserva, permitiendo así una buena valoración de la proporción parénquima-estroma.

Las preparaciones llevadas al cabo, por este método son excelentemente adaptadas para mediciones utilizando el sistema de análisis de imagen. El estudio de la relación parénquima-estroma en 14 glándulas de humanos en los estados de pubertad, postpubertad, en el parto y en mujeres embarazadas muestra que dicha relación es un proceso dinámico. En la glándula mamaria de mujeres en la pubertad casi el 90% de la glándula está constituida de estroma, este puede ser dividido en estroma intralobular, representando al 17% del total y consistente de tejido conectivo alrededor de los brotes alveolares individuales y el estroma interlobular, que separa un lóbulo de otro. Éste está compuesto de grasa y tejido conectivo.

El parénquima de estas glándulas representa el 10% del área mamaria y está constituido casi exclusivamente de lóbulos tipo 1 y los conductos. En las glándulas de mujeres en estado postpuberal y mujeres jóvenes no lactantes, el parénquima incrementa de un 10 a un 30% del área total de la

glándula (0-10% está compuesto de lóbulos tipo 1, 10-18% lóbulos tipo 2 y de 1 a 3% lóbulos tipo 3).

Hay una marcada reducción en la proporción de lóbulos tipo 1 y tipo 2.

El embarazo induce cambios dramáticos en la relación del parénquima y el estroma. Durante la primera mitad del embarazo, el área del parénquima se incrementa en un 55% y al final del embarazo en un 73% con la subsecuente reducción en la proporción del estroma [17,24].

La proliferación de acinis resulta en lóbulos mas grandes, compuestos de numerosas unidades secretoras (lóbulos tipo 4) tiene como consecuencia una marcada reducción en el estroma tanto intralobular como en el estroma interlobular.

El siguiente esquema (Fig. 9) muestra la relación que existe entre el parénquima y el estroma de la glándula mamaria durante las etapas: pubertad, postpubertad, parto y al inicio y final del embarazo.

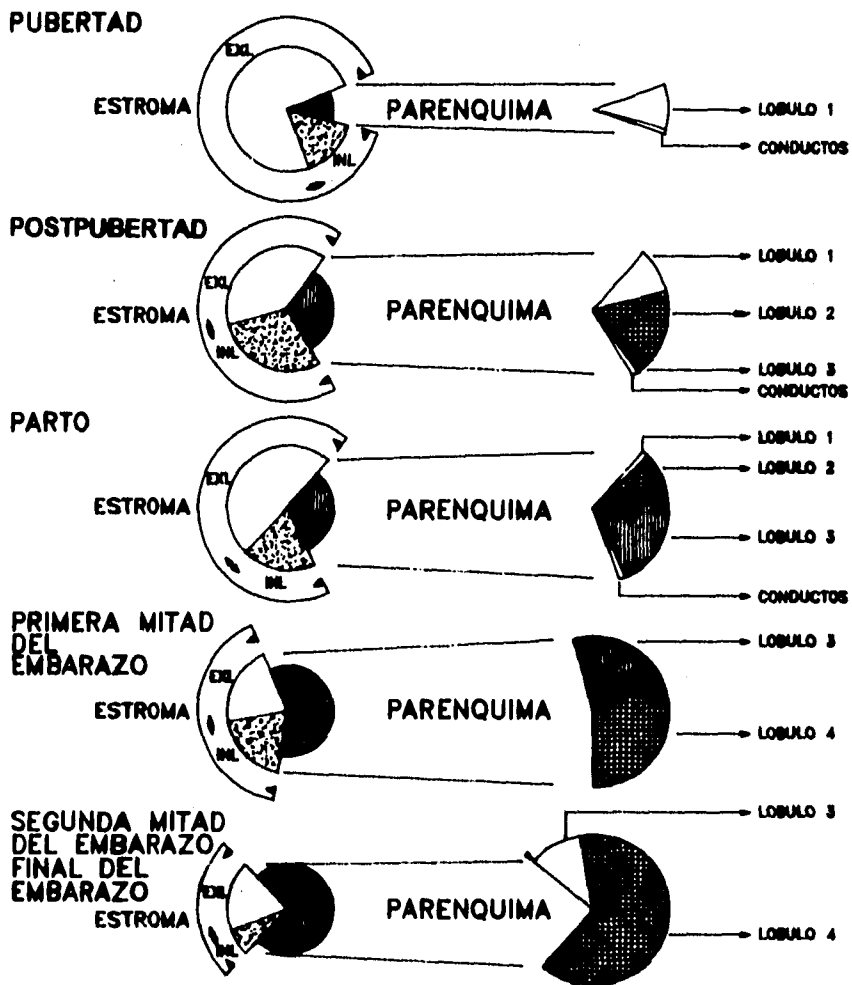


Fig 9.- Esquema que muestra los cambios en las proporciones del parénquima y del estroma en la glándula mamaria de la pubertad al final del embarazo [17].

CAPITULO III.

Aspectos celulares y moleculares del control hormonal de la función mamaria.

En la década pasada se realizaron progresos muy importantes que permiten un mejor conocimiento de los eventos moleculares y celulares que participan en la regulación del crecimiento de la glándula mamaria y la lactancia y está claro que algunas proteínas lactogénicas, particularmente la prolactina, juegan un papel muy importante como moduladores del control de la función mamaria, junto con los esteroides sexuales y el cortisol. En esta sección se describirá la participación de la prolactina, el efecto regulador de los estrógenos, la progesterona y los glucocorticoides, los efectos de la insulina, las hormonas tiroideas, las prostaglandinas y el AMP cíclico (AMPC).

Hormonas lactogénicas.

Las somatomotropinas son un grupo de polipéptidos de cadena simple con pesos moleculares entre 21,000 y 23,000 daltones que incluyen dos hormonas de origen pituitario, la prolactina y la hormona del crecimiento y una hormona sintetizada por las capas sinciciotrofoblásticas de la placenta, el lactógeno placentario (también conocido como somatomotropina coriónica o CS) [25]. Estas tres hormonas varían en grados de actividad lactogénica, pero en general la prolactina tiene el papel importante en la regulación de la función mamaria. En las especies no mamíferas, la prolactina

tiene una gran diversidad de funciones fisiológicas; por ejemplo, la regulación del balance de sales y del agua en los anfibios y el inicio de la nidación en los pájaros [26].

En los mamíferos, el papel principal de la prolactina es la regulación de la actividad de la glándula mamaria. Durante la lactancia, la prolactina es secretada en respuesta a la succión por el infante. La hormona se combina con sus receptores en las células secretoras de leche en la glándula mamaria, estimulando la producción de la leche y posiblemente regulando la cantidad de leche de la madre, necesaria para cubrir las demandas de su infante. La prolactina también estimula el crecimiento y la diferenciación mamaria. El papel del lactógeno placentario es menos claro en los humanos. Su acción primaria puede ser la promoción del crecimiento y el desarrollo mamario o regular el metabolismo materno durante el embarazo. Aunque la hormona del crecimiento humano tiene efectos lactogénicos en los cultivos de glándula mamaria de monos y otros sistemas *in vitro*, no se le adjudica alguna participación en las funciones de la glándula mamaria en el humano [27].

La homología de aminoácidos y la del cDNA muestran que el lactógeno placentario humano está más relacionado con la hormona del crecimiento que con la prolactina. Existe solo un 26% de aminoácidos homólogos entre la hormona del crecimiento y la prolactina humana, lo que sugiere que los genes de estas hormonas se modificaron hace 400 millones de años durante la

diferenciación entre peces y tetrápodos [28].

Por otro lado, el lactógeno placentario humano muestra un 85% de semejanza en su composición de aminoácidos con la hormona del crecimiento, sugiriendo que el gene para el lactógeno placentario humano se originó mucho después por duplicación del gene de la hormona del crecimiento. Estudios recientes han mostrado que los genes para la hormona del crecimiento y del lactógeno placentario están localizados en el cromosoma 17 junto con otro gene similar conocido como el "gene parecido al de la hormona del crecimiento". La observación de que las secuencias primarias de estos tres genes son similares es una buena evidencia que ellos se originan por la reduplicación de genes [29,30].

La regulación de la síntesis de la prolactina y su liberación

La prolactina es sintetizada en los ribosomas unidos a membranas, procesada en las membranas del Golgi, almacenada en gránulos secretores y secretada por exocitosis. Varios factores se involucran en el control de la síntesis y la liberación de la prolactina, incluyendo el factor inhibidor de la prolactina (PIF, probablemente dopamina), los estrógenos, la hormona liberadora de tirotrópina (THF) y los opiáceos endógenos.

Factor inhibidor de la prolactina

El control de la liberación de la prolactina está

controlado por el PIF, un factor o factores secretados en el sistema porta de la pituitaria por las neuronas tubuloinfundibulares del hipotálamo. Existe suficiente evidencia que sugiere que la dopamina es el principal inhibidor de la prolactina ya que suprime la liberación y síntesis de ésta al interactuar con los sitios receptores de las células que producen la prolactina: la dopamina ha sido encontrada en el flujo sanguíneo portal en concentraciones suficientes que inhiben la secreción de la prolactina localizándose receptores de alta afinidad, saturable y estereoespecíficos. Algunas drogas tales como la L-dopa, la cual es convertida a dopamina y como la bromocriptina, un agonista de la dopamina interfieren con la liberación de la prolactina tanto en animales como en preparaciones de células pituitarias estudiadas *in vitro* [31].

Estimulación por estrógenos de la liberación de la prolactina.

La administración crónica de estrógenos incrementa tanto los niveles de la prolactina en la hipófisis como la del plasma, los niveles máximos son obtenidos después de dos semanas. Esto parece ser el resultado de un incremento tanto en el número como en la actividad de las células que sintetizan la prolactina. En cultivos, la incubación prolongada en presencia de estrógenos revierte los efectos inhibitorios de la dopamina en las células de la pituitaria causando hipertrofia, la acumulación de la prolactina

contenida en los gránulos de secreción y un incremento en la transcripción del RNA mensajero específico de la prolactina.

Ya que el estrógeno decrece el contenido de dopamina de las células hipofisiarias, se ha sugerido que los esteroides actúan alterando el proceso del receptor de la dopamina. Esta interpretación es consistente con algunos experimentos que habían mostrado que el tratamiento con estrógenos disminuye la sensibilidad de las células que sintetizan la prolactina al efecto inhibitor de la dopamina.

Existen evidencias de que los estrógenos aumentan la liberación de la prolactina por su acción a nivel del hipotálamo [32,33].

Hormona liberadora de tirotropina

Generalmente, la hormona liberadora de tirotropina (TRH) no juega un papel fisiológico importante en el control de la liberación de la prolactina, aunque la infusión de TRH provoca un rápido incremento en la concentración plasmática de la prolactina generando una prueba clínica muy útil para probar las reservas de prolactina. Debido a que la TRH estimula la liberación *in vitro* de la prolactina de preparaciones de células pituitarias, el péptido permite aclarar el mecanismo de liberación de la prolactina. Así, se ha mostrado que la TRH induce la actividad eléctrica espontánea de las células de la prolactina en presencia del calcio extracelular, sugiriendo que este catión media la liberación de los gránulos secretores. La TRH también

incrementa la síntesis de la prolactina aumentando la transcripción del RNA mensajero [34].

Las acciones celulares de la prolactina.

La prolactina (PRL) juega un papel regulador en el crecimiento y desarrollo de la glándula mamaria así como en la regulación de funciones específicas que incluyen la síntesis de proteínas específicas de la leche como son la α -lactalbúmina y otras proteínas mamarias presentes durante la lactogénesis. Varios autores han demostrado un incremento en la síntesis de caseína cuando las células del epitelio mamario fueron tratadas con PRL tanto *in vivo* como *in vitro*, paralelamente se observa la acumulación del RNA mensajero específico de la caseína, debida tanto a un incremento en la transcripción del RNA mensajero como a su estabilización, Teyssot y Houdebine mostraron que la inyección de PRL y colchicina a conejas pseudoembarazadas inhibió la acumulación del mRNA de la caseína sin afectar la síntesis de la caseína, sugiriendo que la síntesis de la caseína no siempre está íntimamente acoplada a los niveles del mRNA de esa proteína[35,36].

Existe también evidencia de los efectos de la prolactina posteriores a la traducción. La inyección *in vivo* de prolactina a conejas pseudoembarazadas induce una unión rápida y específica de los ribosomas y el RNAm de caseína a las membranas de las células mamarias [37].

La incubación *in vitro* de tejido lactante con prolactina

por un período entre 15 y 45 min produjo un incremento en el volumen del aparato de Golgi y un incremento en la secreción al medio de caseína y de la grasa de la leche. La secreción de caseína no fue disminuida por la presencia de inhibidores de la síntesis de proteína. Wilde y colaboradores reportaron que la prolactina disminuye la velocidad de degradación de la caseína en explantes cultivados de tejido mamario de conejas embarazadas [38]. Todos estos experimentos, sugieren que la prolactina actúa en sitios múltiples y de forma coordinada para incrementar la síntesis y secreción de los distintos componentes de la leche. La acción de la prolactina varía con el ambiente hormonal y con la etapa del desarrollo mamario.

Por ejemplo, Ways y colaboradores reportaron fluctuaciones en la sensibilidad de la glándula mamaria a la estimulación por la prolactina, de la síntesis de caseína en explantes de glándula mamaria obtenidos en días diferentes del embarazo de la ratona [39].

La prolactina puede no ser un requisito indispensable para la síntesis de α -lactalbúmina y la actividad en cultivo de la glándula mamaria de la rata embarazada, aunque es necesaria para los cultivos de tejido virgen. Todas estas observaciones muestran la importancia de la etapa del desarrollo mamario en respuesta a la prolactina.

La internación de la prolactina

Existe suficiente evidencia que muestra que la

prolactina es internada. Por ejemplo, estudios inmunocitoquímicos sugieren que la prolactina intracelular está presente en muchos tejidos incluyendo la luz de los alveolos y en las células epiteliales de la glándula mamaria de las ratas lactantes.

Nolin examinó la prolactina inmunorreactiva endógena en la glándula mamaria de ratas lactantes y estableció un ciclo de incorporación.

Las células "secretoras" en reposo no contienen prolactina intracelular aunque la leche en la luz de los alveolos limita con esas células [40,41].

La prolactina inmunorreactiva fue localizada en racimos a través del citoplasma de células "activas"; aproximadamente 1/4 de estas células mostraron prolactina teñida en el núcleo. En células secretoras cuboideas "intermedias" la prolactina citoplásmica estuvo uniformemente dispersa. Así, la prolactina teñida mostró correlación con la actividad secretora funcional de la célula, aunque no queda claro en esos estudios si el material inmunorreactivo es prolactina.

Otra evidencia de que la prolactina es internada fue obtenida por Suard en un estudio de líneas celulares de tumores mamarios, en las cuales el 25% de la prolactina interna permanecía intacta después de 10 horas a 37°C [42]. A nivel de microscopía electrónica se encontró que la prolactina inicialmente unida a la membrana plasmática era posteriormente internada y se asociaba tanto con elementos

vesiculares como con el núcleo. Aunque la prolactina apareció aparentemente intacta después de 30 min a 37°C, el significado funcional de esta internación no fue claro.

Djiane y colaboradores informaron que un antisuero al receptor de PRL parcialmente purificado de membranas de glándula mamaria de conejo podría mimificar la actividad de la prolactina en la síntesis de la caseína y la acumulación del RNA mensajero de caseína en el mismo tiempo de acción de la prolactina [43].

Este efecto fue bloqueado por la colchicina y amplificado por los glucocorticoides como sucede con la prolactina en explantes de glándula.

Estos resultados sugieren que no es esencial que la PRL se interne para que se produzcan las respuestas celulares.

El papel de los mediadores celulares.

Houdebine y colaboradores investigaron el efecto de los inhibidores de enzimas lisosomales, la formación de microfilamentos y la formación de microtúbulos en la inducción producida por la prolactina de RNAm de la caseína. Solamente la colchicina, que afecta la estructura de los microtúbulos, inhibió la síntesis de la caseína y la acumulación del RNAm de caseína en respuesta a la prolactina[44].

Teyssot mostró que membranas aisladas de la glándula mamaria, al ser incubadas con prolactina, liberaban un factor soluble, el cual indujo específicamente la transcripción del

gen de caseína en los núcleos aislados de células mamarias[45].

En resumen, la prolactina parece actuar en múltiples sitios para estimular la síntesis y secreción de componentes de la leche en la lactogénesis. Los receptores específicos a la prolactina están involucrados en esas acciones pero el mecanismo por el cual la unión de la prolactina se traduce en señales intracelulares no está bien estudiado. Las investigaciones que se realizan actualmente sobre la internación de la prolactina y los probables segundos mensajeros pueden guiarnos en un futuro cercano a definir la participación de ambos procesos en la acción de la prolactina.

Lactógeno placentario.-

El primer reporte de una hormona lactogénica derivada de la placenta humana fue rápidamente seguida por su purificación y la demostración de su actividad lactogénica en la coneja pseudoembarazada. Josimovich y Mac Laren nombraron a la hormona, lactógeno placentario [46]. Por su semejanza estructural con la hormona de crecimiento, Li y colaboradores la llamaron somatomotropina coriónica humana (hCS) [47]. Aunque en 1975, la comisión de nomenclatura bioquímica de la IUPAC-IUB recomendó el nombre de corionotropina humana, la mayoría de los investigadores utilizan el término de lactógeno placentario (hPL).

Regulación de la secreción del lactógeno placentario

Los niveles del lactógeno placentario aumentan continuamente durante el embarazo en el humano. Varios autores han postulado que los niveles del lactógeno placentario se correlacionan con la masa de la placenta.

Estos niveles reflejan una continua y rápida secreción debido a que la vida media en el plasma es de solo 20 min. Vigneri y colaboradores observaron fluctuaciones horarias en los niveles plasmáticos del lactógeno placentario en 9 mujeres en su tercer trimestre del embarazo y sugirieron que la causa de esas variaciones podían resultar de fluctuaciones en el flujo sanguíneo de la placenta [48]. La disminución en la glucosa del plasma producida por el ayuno o la infusión de insulina produjo un incremento del 40% en los niveles del lactógeno placentario.

La hiperglicemia tuvo poco efecto, pero la arginina estimuló su secreción. Aunque se encontró que la bromocriptina reduce los niveles del lactógeno placentario en las cabras. Bigazzi observó que la supresión total de la secreción de la prolactina por la bromocriptina durante el embarazo no tiene efectos en los niveles plasmáticos del HPL.

En resumen, la masa placentaria y la hipoglicemia son los únicos factores que se han demostrado en la regulación de la secreción del hPL [49].

Acciones del lactógeno placentario

Debido a que el lactógeno placentario es secretado

solamente durante el embarazo, su papel fisiológico en la función mamaria puede ser limitado a la estimulación del tejido mamario y su diferenciación. Este papel es claro en ciertos mamíferos en los cuales, a diferencia de los humanos, la prolactina permanece baja durante el embarazo. En los humanos, se ha postulado que el lactógeno placentario puede ser mas importante en la regulación del metabolismo materno que en la mamogénesis [50]. El lactógeno placentario humano y la prolactina tienen actividades lactogénicas similares en una gran variedad de sistemas *in vitro* incluyendo tanto a cultivos de explantes de ratón y ratas, uniéndose en ambas con igual afinidad a los receptores de prolactina de las membranas de los glóbulos de grasa de la leche de conejo. Se ha reportado que el hPL estimula el marcaje con timidina tritiada de células de fibroadenoma mamario de humanos que fueron transplantadas en ratones desnudos sugiriendo una acción específica sobre la síntesis del DNA en el tejido mamario humano. Todas estas observaciones mas el hecho de que el nivel plasmático del lactógeno placentario es 100 veces mayor que el de la prolactina durante el embarazo humano sugiere que aquel estimula la mamogénesis [51].

Conclusión.

Algunos de los aspectos mas importantes tanto celulares como moleculares de la función hormonal, se ha obtenido de las investigaciones relacionadas con la secreción y la acción de la prolactina. Por ejemplo, si se considera el

control de la síntesis y liberación de la prolactina se puede concluir que la transcripción del RNAM, la traducción, las modificaciones de las proteínas y su liberación de la célula son controladas de manera coordinada.

De igual manera, la interacción de la prolactina con la membrana plasmática de la glándula mamaria parece iniciar una serie de eventos intracelulares, que conducen a la síntesis y secreción coordinadas de los distintos componentes de la leche.

Se han examinado las acciones de algunas hormonas lactogénicas sobre la función mamaria, como si ellas sucedieran aisladas de otras reacciones. Aunque esta separación fue necesaria para profundizar en las bases de la acción de la prolactina. La forma es artificial, debido a que la acción de las hormonas lactogénicas participan de una serie de eventos coordinados que dependen primero, de un desarrollo oportuno de la glándula mamaria y segundo, de un ambiente hormonal favorable.

El papel de las hormonas esteroides en el control de la función mamaria.

La ablación endocrina y los estudios de sustitución en animales en la década de los años 50's, subrayó la importancia de las hormonas esteroides, los estrógenos, la progesterona y los corticoides adrenales en la regulación de la función mamaria, sin embargo, la evidencia mas reciente de los estudios realizados con sistemas in vitro sugiere que

estas hormonas actúan modulando los efectos de las hormonas lactogénicas mas que regulándolas.

Estrógenos

En el animal intacto, los estrógenos estimulan el crecimiento y el desarrollo de la mama y promueven la secreción de la prolactina por la pituitaria anterior. Además, muestran efectos paradójicos al inhibir la secreción de la leche en la glándula lactante. La secreción de la prolactina estimulada por los estrógenos también puede ser observada *in vitro*.

La correlación entre el crecimiento mamario en la pubertad y el principio de la función ovárica en las mujeres fue obtenida inicialmente por Halban en 1905, mas tarde por los años 30's se estableció que las inyecciones de estrógeno producían el desarrollo mamario en una variedad de mamíferos[51].

El tratamiento producía la proliferación de los conductos y se acompañaba de la formación de quistes mamarios debido a la acumulación de los productos de secreción.

Tanto en rumiantes como en roedores, el tratamiento *in vivo* con los estrógenos y la progesterona es usado rutinariamente para inducir el desarrollo mamario previo a la realización de experimentos *in vitro* o *in vivo* sobre la lactogénesis.

Estas observaciones, mas la evidente relación de los receptores a los estrógenos y el crecimiento de una

proporción significativa de tumores mamarios han conducido a la aceptación de la idea de que los estrógenos promueven la proliferación del epitelio mamario, particularmente en las porciones de los conductos de la glándula. El mecanismo de estos efectos sobre el crecimiento mamario es controvertido. Algunas observaciones sugieren que el efecto de los estrógenos produzca la estimulación mitogénica sobre la glándula.

Mas aún, la mayoría de los efectos producidos por los estrógenos en animales sanos requieren la integridad de la glándula pituitaria, sugiriendo que las hormonas actúan indirectamente por estimular la secreción de un factor hipofisiario de crecimiento o bien que la hormona hipofisiaria actúa sinérgicamente con los esteroides para inducir el crecimiento mamario.

Se ha sugerido que este efecto de los estrógenos ocurre bajo condiciones fisiológicas en los humanos, pues se ha observado una correlación entre los niveles del 17- β estradiol y los niveles de prolactina en la pubertad, durante el embarazo y la menarquía así como la observación de que el estrógeno contenido en las píldoras anticonceptivas incrementa la prolactina plasmática [52].

Los incrementos en los niveles del estradiol observado en jóvenes púberes que mostraron ginecomastia se correlacionaron con un incremento en los niveles de prolactina del plasma. Así, desde un punto de vista fisiológico, en los humanos y en

la mayoría de los animales (el mono Rhesus es aparentemente una excepción), corren paralelos un incremento en los niveles plasmáticos de los estrógenos y de la prolactina, elevando la posibilidad de que los efectos de los estrógenos sobre el crecimiento mamario sean mediados por la prolactina.

Por otro lado, existe evidencia que sugiere que los estrógenos promueven acciones propias de crecimiento en su propio tejido mamario, particularmente en presencia de prolactina. La actividad mitogénica en la línea MCF-7 de cáncer mamario es estimulada *in vitro* por el 17- β estradiol.

El crecimiento de la línea celular mamaria ZR-75-1, en un medio sin suero depende de los estrógenos y es inhibida por el antiestrógeno tamoxifeno. En la ratona ovariectomizada, la proliferación de los lactocitos estimulada por la PRL fue aumentada por los estrógenos y la progesterona.

En la mujer, la hiperprolactinemia producida por algunos tumores hipofisarios produce el crecimiento mamario (ginecomastia) solo cuando el nivel del estrógeno plasmático aumenta. Todas estas observaciones sugieren que el estrógeno actúa de forma sinérgica con la prolactina para producir el crecimiento mamario. Se necesitan pruebas críticas de las hipótesis alternativas que son:

- 1) Los estrógenos actúan como mitógenos primarios en el tejido mamario,
- 2) los estrógenos son agentes que sensibilizan al tejido mamario para la acción de las hormonas

lactogénicas o 3) la acción del estrógeno es totalmente indirecta, mediando su estimulación a través de la secreción de otras hormonas y factores de crecimiento [53,54].

Mecanismo de acción de los estrógenos en el tejido mamario.

Como en otros tejidos, los estrógenos en la glándula mamaria, se unen a un receptor citosólico que es translocado al núcleo. Ya que su presencia se correlaciona con la susceptibilidad del tumor a la terapia hormonal, los receptores del estrógeno han recibido mucha atención en cáncer de mama [55]. Existen pocos estudios con tejido mamario normal. Shymala y Nandi han reportado, en el ratón lactante, una sola clase de receptor para el $17\text{-}\beta$ estradiol en el citosol con una constante de unión de $9 \times 10^{-10} \text{M}$ [56]. Estos receptores no tienen reacción cruzada con los corticoides, la progesterona o la testosterona y parecen ser similares al receptor uterino del estrógeno. Ha sido inferido de estas observaciones que los estrógenos tienen efectos biológicos (por ejemplo, un incremento en los receptores de la progesterona en el tejido mamario en la ratona virgen) que los receptores mamaros al estrógeno están presentes antes del desarrollo puberal de la glándula.

Haslam y Shymala han demostrado recientemente que los receptores a estrógeno con una K_d de $1.5 \times 10^{-9} \text{M}$ estuvieron presentes en concentraciones equivalentes (aproximadamente 350 fmol/mg DNA) en el panículo adiposo así como en el

epitelio mamario de la ratona virgen, aumentando la posibilidad de que el mesénquima mamario sea también blanco de la acción estrogénica [57].

Durante la lactancia fueron observados niveles incrementados de los receptores en la glándula mamaria de las ratas. Bohnet y colaboradores observaron que, si las crías fueran separadas al nacimiento o se administrara la 17 α -hidroxiprogesterona, el incremento en los receptores postparto sería abolido [58].

En un número de tumores mamaricos inducidos por un carcinógeno así como en la glándula mamaria de ratón CHS los niveles de los receptores del estrógeno se ven estimulados por la acción de la prolactina.

Sin embargo, Bohnet y colaboradores encontraron que la inhibición de la secreción de la prolactina por la administración de bromocriptina a ratas lactantes, no tuvo efectos sobre el nivel de los receptores estrogénicos en la glándula mamaria y concluyeron por lo tanto, que la prolactina no es un regulador importante de los niveles del receptor estrogénico [58].

En la línea celular MCF-7, los estrógenos estimulan la proliferación, incrementan la síntesis de proteínas, del RNA y del DNA así como regulan la cinasa de la timidina, la lactato deshidrogenasa y la polimerasa del DNA.

En los tumores mamaricos de la rata, así como en la línea celular humana MCF-7, se ha demostrado que el estrógeno

ejerce un control exacto sobre el nivel de los receptores a la progesterona. Una observación semejante ha sido hecha en la glándula mamaria de ratona virgen en donde los estrógenos también incrementan la oxidación de la glucosa y la síntesis del DNA.

Los estrógenos y la diferenciación de la glándula mamaria

En humanos, la hipersecreción de la prolactina produce galactorrea (una secreción anormal de leche) en solo una pequeña proporción de hombres (20%) pero lo hace en una gran proporción en mujeres (60% en el mismo estudio), lo que sugiere que las hormonas ováricas sensibilizan a la glándula mamaria hacia la prolactina.

De acuerdo con esta sugerencia, las inyecciones de estrógeno, en la ratona ovariectomizada, aparentemente restablecen la sensibilidad del tejido mamario a la prolactina, y el tratamiento con estrógenos en ratones neonatales incrementa significativamente la habilidad del tejido a desarrollar una función diferenciada.

La producción de estrógenos por la glándula mamaria.

Maule Walker y Peaker utilizando técnicas de diferencia arteriovenosa en la cabra, encontraron evidencias de la producción del 17- β estradiol por la glándula mamaria cercana al parto [59].

Se conoce desde hace mucho tiempo que la administración

de estrógenos produce la supresión de la lactancia durante el período postparto.

El mecanismo de la inhibición no es entendido aunque se piensa que involucra la acción directa sobre la glándula mamaria. Nolin y Bogdanove mostraron que el estradiol disminuye la cantidad de prolactina inmunohistoquímicamente visible en las células epiteliales de la mama y Bohnet y colaboradores mostraron que la inyección de estradiol evita el incremento en los niveles de los receptores de la prolactina que ocurre 48 horas después del parto en la rata. Ambas observaciones aumentan la posibilidad de que los estrógenos suprimen la lactancia por interferir con la unión de la prolactina [58,60,61].

Resumen

Los estrógenos, actúan directa o indirectamente sensibilizando al tejido mamario a los efectos de la prolactina. Ellos también pueden potenciar los efectos de la hormona hipofisiaria sobre la diferenciación y estimulan la proliferación celular en la mama.

Cualquiera que sea el mecanismo, el efecto global del incremento en los niveles plasmáticos del estradiol en las mujeres no lactantes, así como en los hombres, es promover el desarrollo mamario, particularmente del estroma y las estructuras de los conductos. En general, un incremento en el estradiol plasmático se relaciona con un incremento en la prolactina plasmática y las dos hormonas pueden trabajar en

forma sinérgica para promover el crecimiento mamario. Los estrógenos también parecen tener efectos inhibitorios paradójicos sobre la producción de leche en la glándula lactante.

Progesterona

La progesterona, la hormona del embarazo, es la principal responsable de coordinar el desarrollo de la mama durante el embarazo y el parto.

Tiene dos efectos bien caracterizados durante el embarazo: 1) La progesterona parece, en los estudios realizados in vivo tener un efecto sinérgico con el estrógeno y la prolactina para producir el desarrollo lobuloalveolar máximo de la glándula. 2) Los estudios in vivo e in vitro indican que la progesterona inhibe el inicio de la secreción de leche durante el embarazo. Los estudios en los sistemas in vitro indican que la progesterona evita la acumulación o activación de las enzimas involucradas en la diferenciación terminal de la función mamaria sin afectar su crecimiento.

La función de la progesterona en el desarrollo lobuloalveolar.

Se conoce desde 1930 que la inyección de estrógenos produce, en la mayoría de los mamíferos, solamente la proliferación de los conductos, mientras que la inyección de estrógenos y progesterona en las dosis adecuadas produce un

desarrollo lobuloadveolar semejante al observado durante el embarazo.

Stoudemire y colaboradores reportaron que la combinación *in vivo* de la progesterona y la prolactina estimuló la incorporación de timidina tanto en el epitelio de los conductos como en el epitelio alveolar de ratas hipofisectomizadas y ovariectomizadas, mientras que el estrógeno y la prolactina estimularon solo el epitelio de los conductos [62].

La progesterona y la inhibición de la lactogénesis

La lactogénesis puede ser acelerada en las hembras embarazadas de todas las especies, si se elimina la fuente de la progesterona en el embarazo. La administración de progesterona evita los cambios asociados con la lactogénesis, sugiriendo que el esteroide actúa directamente sobre la glándula mamaria. En un experimento clásico, Kuhn mostró que las inyecciones de progesterona evitan el incremento en el contenido de lactosa de la glándula mamaria, incremento que se observa después de la ovariectomía de ratas embarazadas[63,64].

En estudios *in vitro*, Turkington y Hill encontraron en explantes mamarios de rata embarazada que la progesterona inhibe el incremento de α -lactalbúmina inducida por la prolactina [65]. La progesterona inhibe la oxidación de la glucosa y su conversión a lípidos en células mamarías aisladas de la ratona.

La progesterona y su análogo R5020 han sido encontrados que se unen con alta afinidad a receptores glucocorticoides en la glándula mamaria de lactantes, sugiriendo que la progesterona actúa inhibiendo la unión de cortisol, potenciando la acción glucocorticoide de la prolactina. Por otro lado, se encuentran las observaciones de Teyssot y Houdebine que muestran que la progesterona modifica la síntesis del RNA ribosomal y la traducción del RNA mensajero de caseína pero no de los glucocorticoides [66].

Por lo tanto, parece probable que la progesterona ejerce su efecto interactuando con los sitios de unión específicos de la progesterona, es posible también que la progesterona puede actuar por aumento del nivel del AMP cíclico.

Sitios de unión de la progesterona en glándula mamaria.

Haslam y Shymala estudiaron los receptores citosólicos a la progesterona de la glándula mamaria de la ratona durante las distintas etapas de reproducción [67].

Usando la progestina sintética R 5020, encontraron la unión específica a un receptor 4.5 S con una constante de unión de 2.8×10^{-9} M.

Había alrededor de 4000 sitios receptores por célula, aproximadamente un 10% de la concentración uterina. La dexametasona, un glucocorticoide sintético, se unió pobremente a este receptor pero desplazó al R5020 de un segundo receptor de menor afinidad. Los niveles de este receptor fueron altos en el tejido de la ratona virgen y su

concentración fue incrementada por los estrógenos, en forma semejante a lo que ocurre en el útero. La concentración del receptor (mg de DNA) disminuye durante el embarazo. Han sido encontrados receptores de la progesterona en el panículo adiposo mamario, pero parecen no estar regulados por los estrógenos o la etapa de la lactancia. Shymala y otros han sido incapaces de detectar un sitio de unión específico a la R5020 en las glándulas de ratón y rata lactantes, guiándolos a postular que la ausencia de sitios de unión de la progesterona puede ser la responsable de la carencia de efectos de la progesterona en la lactancia. Existen pocos estudios de los receptores de la progesterona en la glándula mamaria humana normal, aunque estos receptores están presentes o pueden ser inducidos en líneas tumorales humanas[68,69,70].

Lloyd encontró cantidades significativas de un receptor de progesterona con una Kd de 1.9 nM en el citosol de tres de nueve muestras de tejido mamario humano normal obtenido por mastectomía o autopsia [71].

Conclusiones

Existen evidencias del efecto inhibitor de la progesterona en la diferenciación terminal de la función mamaria durante el embarazo, como es la presencia de receptores específicos de la progesterona en el citosol de las glándulas mamarias de varias especies. Se desconoce el mecanismo molecular del efecto inhibitor así como la

naturaleza de los receptores fisiológicos de la progesterona, y la importancia de la competencia progesterona-cortisol.

El desarrollo reciente de buenos sistemas *in vitro* para el estudio de la proliferación y de la diferenciación así como una prueba molecular de la función mamaria, contestará estas preguntas en un futuro cercano.

Glucocorticoides

Los animales adrenalectomizados no inician o mantienen la lactancia a menos que se les den glucocorticoides y estas hormonas son también necesarias para mantener la lactancia en animales hipofisectomizados.

Estas observaciones guiaron al reconocimiento que los esteroides adrenales son importantes en la secreción de la leche. Estas observaciones fueron reforzadas por experimentos que muestran que el cortisol es necesario para iniciar y mantener la función diferenciada del tejido mamario *in vitro*. Tales estudios dejaron poca duda de que los glucocorticoides potencian los efectos de otros factores lactogénicos específicos.

¿Un aumento en los glucocorticoides actúa como un estímulo lactogénico?

Debido a que la inyección de altas dosis de glucocorticoides en conejas pseudoembarazadas o al final del embarazo, induce una secreción precoz de leche, un gran número de autores han propuesto que el incremento en los

niveles de glucocorticoides durante el parto, sirve, junto con niveles incrementados de prolactina, como la señal hormonal principal para la lactogénesis [72]. La mayoría de las evidencias sugiere, sin embargo, que este no es el caso: las dosis requeridas de glucocorticoides para iniciar la secreción de la leche están mas en el rango farmacológico que en el fisiológico. No se observa un incremento posterior en los glucocorticoides en el momento del parto en animales y humanos y la dosis fisiológica de corticoides dada a ratas en el embarazo tardío no produce un aumento en el contenido de RNA mensajero de caseína asociado con la lactogénesis en esta especie. La infusión de dexametasona en corderos fetales produce también un incremento inmediato en el flujo sanguíneo en la mama, semejante al observado durante la lactogénesis.

La misma dosis infundida en la vena materna no tiene efectos en el flujo sanguíneo de la mama, sugiriendo que algún factor diferente del cortisol, es el responsable de los cambios que acompañan la lactogénesis en las borregas.

Finalmente, altas dosis de esteroides dadas durante el embarazo como terapia para enfermedades inflamatorias, no inician la lactogénesis prematura en la mujer. Así, un incremento en los niveles plasmáticos de cortisol al momento del parto no es el responsable de la lactogénesis.

Los receptores a glucocorticoides en la glándula mamaria.

Shymala encontró 14,000 sitios receptores a

glucocorticoides por célula en la glándula mamaria de ratona lactante con una constante de unión para la dexametasona de $8 \times 10^{-9}M$. Otros compuestos con actividad glucocorticoide desplazan a la dexametasona muy activamente, mientras que la progesterona, la dexosicorticosterona y la aldosterona muestran competencia moderada. El receptor al cortisol es transportado al núcleo después de que se une a los glucocorticoides. La progesterona se une a este receptor y evita su translocación, actuando como un antagonista de la acción del glucocorticoide [73].

La acción celular de los glucocorticoides.

La mejor evidencia de que los glucocorticoides no son un requisito indispensable para la proliferación mamaria se genera de los sistemas de cultivo a partir de glándula mamaria realizados por Banerjee y colaboradores, en los cuales el desarrollo lobuloalveolar podía ser inducido in vitro en un cultivo de glándula normal con una combinación hormonal, en la cual no se incluyó un esteroide adrenal [74]. Mas aún, Klevjer- Anderson no encontró efectos del cortisol sobre la velocidad de proliferación celular en los cultivos de células mamarias normales y cancerosas. Por otro lado muchos investigadores han encontrado que el cortisol no incrementa la proliferación de las células mamarias en sistemas estudiados in vitro [75].

Algunos investigadores sugieren que la prolactina, que induce la diferenciación, observada en ausencia de cortisol

es debida a la presencia de cortisol endógeno. Ray y colaboradores mostraron un requerimiento absoluto de corticoides para mantener o desarrollar la síntesis de α -lactalbúmina en cultivos prolongados de tejido de glándula mamaria [76].

De nuevo no es claro si esta observación representa un efecto específico del cortisol sobre la síntesis de las proteínas de la leche o es un efecto general sobre la "salud" de los sistemas de cultivo.

La diferenciación inducida por la prolactina generalmente es estimulada por los glucocorticoides. Por ejemplo, el cortisol incrementó, en explantes mamarios tratados con prolactina, el desarrollo del retículo endoplásmico rugoso y la acumulación de caseína y del RNAm de caseína.

En general, no se ha observado un efecto importante del cortisol en ausencia de prolactina. Estas observaciones sugieren que los glucocorticoides tienen un papel facilitador mas que regulador en la diferenciación de la mama.

Se desconoce si ellos hacen la regulación de los niveles de receptores de prolactina, por amplificar el nivel del RNAm de caseína inducido por la prolactina o bien si lo hacen por un proceso de post-transcripción. El cortisol no parece afectar todos los aspectos de la función de diferenciación en el tejido de la mama. Devinoy y Houdebine encontraron que el cortisol potencia la acción *in vivo* de la prolactina sobre la

acumulación de caseína y del RNAm de caseína mas eficientemente que la acción de la prolactina sobre la síntesis de la lactosa o del RNA y del DNA total [77,78]. Ono y Oka han mostrado que las curvas de dosis-respuesta para los efectos del cortisol sobre la síntesis de α -lactalbúmina y caseína difieren marcadamente en los explantes de tejido mamario de ratona virgen y ratona embarazada [79,80]. Encontraron que la síntesis de α -lactalbúmina fue completamente estimulada a concentraciones de cortisol mayores de 10^{-10} M, mientras que la síntesis de caseína fue estimulada a concentraciones de cortisol cercanas al rango fisiológico ($< 10^{-7}$ M). Es interesante también que la síntesis de α -lactalbúmina fue totalmente inhibida a concentraciones de cortisol mayores a 10^{-6} M.

La función de la espermidina en la acción del glucocorticoide.

Los niveles de las descarboxilasas, la ornitina y de la S-adenosil metionina, enzimas limitantes en la síntesis de poliaminas como la espermidina, son elevados en la glándula mamaria de animales embarazadas y lactantes. Esta observación ha guiado a los investigadores a postular, una función reguladora de las poliaminas tanto en el crecimiento mamario como en la secreción de la leche.

En muchos sistemas, la espermidina estimula la actividad biológica de los glucocorticoides. Esto fue demostrado en los estudios de Oka y Perry en explantes de glándula mamaria de

ratona donde la hidrocortisona potenció los efectos de la prolactina sobre la síntesis de caseína y α -lactalbúmina. En este sistema la espermidina puede sustituir al cortisol.

Mas aún, el cortisol incrementa la concentración tisular de espermidina. Este incremento así como el incremento en la síntesis de proteínas de la leche fue anulado por el metil glioxal bis (guanil hidrazona) un inhibidor específico de la síntesis de espermidina. Ese bloqueo puede ser superado por la adición de espermidina exógena. Estas observaciones guiaron a Oka y a Perry a sugerir que el efecto del cortisol es mediado por la espermidina [81].

Sin embargo, estudios mas recientes en otras especies no apoya esta sugerencia, por ejemplo, en conejas, la inducción de proteínas de la leche fue independiente de la espermidina. En ratas, tanto los glucocorticoides como la espermidina fueron necesarios para la expresión del gene de caseína, pero la espermidina no puede reemplazar al glucocorticoide [82]. Este esquema se complica más aún ya que se ha observado que la insulina y la prolactina parecen incrementar los niveles de espermidina. Se desconoce la relación entre la espermidina y los glucocorticoides para regular algunas funciones de la glándula mamaria.

Conclusiones.

Aunque los glucocorticoides no inician la función de la célula mamaria, parece ser que potencian la acción de la prolactina. A cierto nivel, se unen a un receptor soluble, el

cual experimenta cambios conformacionales que le permiten unirse al núcleo. Un problema importante con muchos de los experimentos *in vitro* es que la concentración de cortisol utilizado es de aproximadamente 10^{-5} M lo que representa dos órdenes de magnitud mas alto que la concentración de cortisol libre en el plasma (10^{-7} M). Por esta razón, la importancia fisiológica de muchos de los efectos reportados para el cortisol no puede ser explicada.

El papel de la insulina en la función mamaria.

El papel principal metabólico de la insulina en los mamíferos es la regulación del almacenaje de nutrientes y su movilización por el hígado, el tejido adiposo y el músculo.

En las células mamarias, como en el tejido adiposo, la insulina incrementa el uso de la glucosa para la síntesis de lípidos.

Debido a que se ha encontrado que grandes dosis de insulina son necesarias para mantener los tejidos mamarios *in vitro*, se ha propuesto que otra función para esta hormona sea la regulación del desarrollo mamario.

Se sabe que la insulina estimula la replicación de los explantes mamarios y se utiliza una concentración de 10^{-6} M, para mantener la integridad de estas células y la sensibilidad a las hormonas en los sistemas *in vitro* en presencia de suero homólogo al 5%. Por otro lado, existe poca evidencia para una función *in vivo* de la insulina como un regulador de la mamogénesis: los niveles de insulina que

se encontraron variaron mucho durante un experimento del estrógeno y la progesterona que inducen la lactancia en cabras y la diabetes inducida por el aloxan no interfirió con el estrógeno que estimula el crecimiento mamario en conejas hipofisectomizadas. La diabetes inducida por la estreptozotocina no evita que el estrógeno y la progesterona produzcan crecimiento mamario en el ratón macho [83,84]. En sistemas *in vitro*, Errick y Sueoka fueron capaces de obtener la estimulación de la prolactina sobre la proliferación celular alveolar mamaria en ausencia de insulina.

La mayor interpretación es que la insulina puede servir como un factor de crecimiento mamario en algunos sistemas *in vitro*, quizás por mimificar un factor sérico parecido a la insulina (insulin-like), pero no es esencial por si misma para el crecimiento mamario *in vivo*.

La función de la insulina en la lactogénesis y la lactancia.

Una deficiencia en la insulina plasmática por 24 horas o más conduce a una disminución de la producción de leche en las cabras y en las ratas. Sin embargo, una deficiencia de insulina por un período corto, no evitó la lactogénesis en la rata o disminuye la lactancia en la cabra, sugiriendo que los efectos *in vivo* de la insulina sobre la secreción de la leche pueden ser efectos secundarios debidos a cambios en la disponibilidad del sustrato mas que a un efecto primario de la hormona sobre los tejidos de la mama.

La respuesta de los sistemas in vitro a los agentes lactogénicos es a menudo dependiente o aumentada por la insulina. Por ejemplo, Topper y Freeman encontraron que esta hormona es esencial para estimular la síntesis de las proteínas de la leche por la prolactina y el cortisol en explantes mamarios de ratonas embarazadas [61].

Vonderhaar mostró que una cantidad tan pequeña como 0.05 g/ml de insulina que es aproximadamente 10 veces los niveles plasmáticos normales fue efectiva en los sistemas in vitro[85].

Por otro lado, la insulina no fue necesaria para inducir la síntesis de caseína por la prolactina en explantes de conejas pseudoembarazadas ni lo fue para la inducción de la síntesis de ácidos grasos de cadena intermedia en explantes mamarios de ratona. Recientemente, Ray y colaboradores, utilizando cultivos primarios prolongados, mostraron que la insulina aumenta ligeramente la síntesis de α -lactalbúmina en el cultivo de células alveolares de ratas embarazadas en presencia de prolactina y cortisol [76]. La hormona tiene un efecto mas importante en los cultivos derivados de animales vírgenes, lo que sugiere que esta hormona, o un factor de crecimiento, parecido a la insulina (insulin-like) podría ser necesario para evitar el bloqueo a la diferenciación que ha sido sugerido por Topper y colaboradores [61].

Efectos de la insulina en la síntesis de los lípidos.

A diferencia del tejido adiposo y del músculo, no existe

evidencia de que la insulina regule el transporte de la glucosa en las células alveolares de la mama [86]. Sin embargo, la insulina tiene claros efectos sobre la síntesis de lípidos en este tejido. En particular, la insulina revierte el efecto del ayuno sobre el metabolismo de los lípidos. Aunque han sido utilizadas dosis suprafisiológicas.

Los acinis aislados de ratas en ayunas mostraron una disminución en el consumo de glucosa y la vía de las pentosas así como una disminución en la formación de los lípidos.

Algunos efectos similares se observaron si los acinis de ratas alimentadas eran incubados en presencia de ácido acetoacético (cuerpo cetónico). La insulina *in vitro* revierte tanto el efecto del ayuno como el del ácido acetoacético. La lipogénesis en animales en ayuno realimentados no se observa si la síntesis de insulina es cancelada por la estreptozotocina. Agius y colaboradores mostraron que ratas alimentadas con una dieta rica en grasa, disminuyeron el peso de la camada y la lipogénesis de los acinis obtenidos de la glándula [87].

Todas esas observaciones son consistentes con la hipótesis de que los niveles incrementados de cuerpos cetónicos y la disminución en la concentración plasmática de insulina sean los responsables de la baja disminución en la síntesis de los lípidos observados en la glándula mamaria de los animales en ayunas.

La disponibilidad de glucosa u otros sustratos como el

lactato y el piruvato influyen en la velocidad de síntesis de los ácidos grasos en rebanadas de glándula mamaria de ratas lactantes, sugiriendo que la disponibilidad de los sustratos puede jugar un papel importante en la regulación de la síntesis de los lípidos de la leche.

Un sitio de acción de la insulina en las células alveolares de la mama ha sido identificado por Coore y otros, en la piruvato deshidrogenasa [88,89]. El ayuno incrementó la forma fosforilada de este complejo, lo que lo convierte en inactivo. Como en el tejido adiposo, la insulina tiene el efecto opuesto, o sea disminuye a la forma fosforilada de la enzima e incrementa el uso del piruvato para la síntesis de ácidos grasos. Esas observaciones parecen tener relación con la actividad de la cinasa de la piruvato deshidrogenasa. La evidencia reciente sugiere que la insulina regula la actividad de la acetil-CoA carboxilasa y de la glicerol fosfato acil transferasa.

Conclusión.

La función fisiológica de la insulina en el crecimiento celular alveolar mamario y su diferenciación aún no está totalmente aclarada.

A menudo se utilizan grandes dosis de esta hormona (5g/ml) para mantener al tejido y obtener su proliferación y diferenciación en respuesta a la prolactina y al cortisol.

Esas dosis pueden ser necesarias debido a que la insulina mimifica los efectos de un factor de crecimiento

presente en bajas concentraciones en el plasma, o simplemente porque mucho de la insulina añadida sea adsorbida a las cajas de cultivo o degradada por los cultivos. Cualquiera que sea la respuesta parece probable que algún factor parecido a la insulina sea necesario para iniciar o mantener la respuesta hormonal de las células alveolares mamarias.

Hormonas tiroideas.

Aunque las hormonas tiroideas parecen promover el crecimiento de la mama y la lactancia, ellas probablemente juegan un papel facilitador mas que un papel regulador.

Vonderhaar y Greco compararon la respuesta de ratones hipotiroideos, tiroideos e hipertiroideos desde el destete y encontraron que el desarrollo lobulocelular era proporcional a los niveles plasmáticos de triyodotironina (T_3) [90].

La hormona tiroidea fue necesaria junto con la prolactina, la hormona del crecimiento y los corticoides para la restauración de la lactancia en cabras y ratas hipofisectomizadas. Por otro lado, Hart y Morant reportaron recientemente que los niveles de la hormona tiroidea varían al azar durante el desarrollo mamario en la cabra tratada con estrógeno y progesterona, sugiriendo un papel facilitador mas que regulador en la función mamaria [91].

Vonderhaar y sus colegas estudiaron el papel de la T_3 sobre la producción de α -lactalbúmina en explantes de glándula mamaria mantenidos en cultivo libre de suero. Vonderhaar encontró que a una concentración de 10^{-9} M la T_3

facilitó la estimulación de la prolactina sobre la producción de α -lactalbúmina pero no tuvo efectos sobre la galactosil transferasa [92,93]. Houdebine y colaboradores reportaron que específicamente la tiroxina aumenta la síntesis de la caseína en explantes de conejas pseudoembarazadas tratadas con insulina y prolactina [94]. Debido a que la tiroxina no altera los niveles del RNAm de caseína, estos resultados se interpretaron como que la hormona tiroidea actúa a nivel post-trancricional.

Prostaglandinas.

Aunque las prostaglandinas son producidas en grandes cantidades por la glándula mamaria tanto *in vivo* como *in vitro*, han recibido poca atención como reguladores de la función mamaria.

Los reportes de que la prostaglandina $F_{2\alpha}$ inicia la lactogénesis en los humanos y en las ratas están relacionados probablemente a los cambios hormonales que conducen al parto y a la lactancia mas que a una acción directa sobre la glándula misma.

La evidencia mas sólida para la participación de las prostaglandinas en la función mamaria viene del trabajo de Maule Walker y Peaker [95]. Estos investigadores encontraron, utilizando cabras, que la glándula mamaria produce una gran cantidad (1ng/min) de $PGF_{2\alpha}$ antes del parto.

Una proporción de esta $PGF_{2\alpha}$ se encuentra en la leche, dando concentraciones aproximadas de 100 ng/ml. Después del

parto, hubo un incremento en la producción de la $PGF_{2\alpha}$, pero casi toda fue inmediatamente metabolizada y los niveles en la leche cayeron a 0.7ng/ml. Estos investigadores sugirieron que la $PGF_{2\alpha}$ actúa, como un inhibidor preparto de la secreción de la leche y que después del parto, el metabolismo acelerado evita la acción inhibidora posterior.

Un resultado diferente fue obtenido por Vorherr y Vorherr quien encontró que una inyección intravenosa de $PGF_{2\alpha}$ reduce la presión intramamaria en respuesta a la oxitocina en las ratas lactantes [96].

AMP cíclico.

Existe información que sugiere que el AMP cíclico puede jugar un papel inhibidor de la lactogénesis durante el embarazo.

Sapag-Hagar, Greenbaum y colaboradores observaron incrementos importantes en la actividad de la adenilato ciclasa y en los niveles del AMPc en la glándula mamaria de la rata cerca del parto [97]. Ambas variables disminuyen de nuevo en el primer día de la lactancia y permanecen bajos durante el período de producción de leche. Estudios *in vitro* muestran que el dibutilil AMPc inhibió la inducción de varias enzimas en explantes de ratona embarazada tratados con hormonas. Speake y colaboradores encontraron que el dibutilil AMPc y la treofilina disminuyen la estimulación de la sintetasa de los ácidos en explantes de coneja embarazada, y Lozzi y colaboradores encontraron que el dibutilil AMPc o la

treofilina disminuyen la producción de lactosa por las rebanadas de glándula mamaria de cuyos y conejos [98,99]. Se desconoce cual efecto de la treofilina resulta de un incremento en el AMPc, aunque Wilde y Kuhn encontraron que la treofilina inhibe fuertemente la síntesis de la lactosa en los acinis de la glándula mamaria de rata mientras que el dibutiril AMPc mostró un efecto inhibitor solo a muy altas concentraciones[100].

De estas observaciones y el descubrimiento de que la progesterona incrementa los niveles del AMPc en la membrana de ratas embarazadas no lactantes, se intenta especular que los niveles incrementados de AMPc en la glándula mamaria durante la fase final del embarazo, estimulados quizá por la progesterona, inhibe los cambios terminales de la lactogénesis.

Mas aún, es de interés que Yang y colaboradores hayan encontrado que el AMPc aumenta la actividad proliferativa en cultivos primarios de células mamarias, elevando la posibilidad de que el AMPc cambie el balance entre el crecimiento y diferenciación hacia la etapa de crecimiento[101].

Conclusión.

De estudios resumidos en este capítulo, es claro que las interacciones hormonales que regulan las respuestas pleyotrópicas involucran la proliferación celular mamaria, la diferenciación y la secreción de la leche. De los estudios de

la síntesis de caseína, ha llegado a ser claro que el control del recambio del RNAm es un punto importante de la regulación de la síntesis de proteínas.

Sin embargo existen muchos otros pasos en los cuales el potencial para la regulación existe. Estos incluyen la traducción y degradación de las enzimas involucradas en la síntesis de lactosa y otros componentes de la leche, la manufactura de los sistemas de membranas involucrados en el transporte y procesamiento de los productos secretores y el empaquetamiento y salida de estas sustancias. Claramente, la síntesis y secreción de leche requiere la regulación coordinada de todos esos procesos.

En muchos aspectos, el sistema de explantes parece ser mejor para la examinación de la regulación coordinada de la función mamaria. Las respuestas de este sistema a las hormonas corren frecuentemente paralelas a las respuestas in vivo, suficiente material está disponible para los análisis bioquímicos y los tejidos pueden ser mantenidos en medio libre de suero. Por otro lado, el sistema de explantes contiene múltiples tipos celulares, de quienes las interacciones no son claramente entendidas. Mas aún, la diferenciación terminal in vivo de la glándula mamaria parece ocurrir en dos etapas. En la etapa I el potencial para la secreción de la leche es solo expresado parcialmente. En la etapa II, todos los procesos secretores son amplificadas y el resultado es la secreción copiosa de leche. Los sistemas de

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

explantes no muestran esas dos etapas. Por esta razón debe tenerse precaución en aplicar los resultados obtenidos en los sistemas de explantes a las funciones in vivo de la glándula mamaria.

CAPITULO IV

SECRECION.

La secreción de la leche ocurre en todos los mamíferos, la presencia de las glándulas mamarias es uno de los mas importantes criterios que distinguen la clase de otros animales. Aunque la localización y la forma externa de la glándula mamaria difiere de una especie a otra, los mecanismos de producción de leche son muy similares.

La leche es producida por las células epiteliales de la línea de los alveolos mamarios y es almacenada en la luz alveolar adyacente a estas células. Durante la eyección, la leche es forzada de los alveolos por la contracción de las células mioepiteliales circunvecinas y existen conductos directos dentro de un canal al cual drenan varios racimos de alveolos.

En el seno humano existen canales que se unen a 15 a 25 conductos grandes, los cuales se dilatan dentro de pequeños senos cerca de la areola. Estos conductos se abren directamente en el pezón. En otros animales, los canales pueden vaciarse dentro de un canal simple primario o una cisterna y cada uno es drenado alternativamente por el canal del pezón o teta. Estas estructuras pueden proveer un almacenaje adicional de leche, particularmente en los animales que producen leche.

Con el desarrollo de la microscopía electrónica y otras herramientas para estudiar la bioquímica de la secreción de la leche, se han definido en la década pasada, cinco vías

específicas para la síntesis y secreción de los componentes de la leche. Estas vías ilustradas en la figura A, operan simultáneamente para transformar los precursores obtenidos de la sangre en los constituyentes de la leche y transferirlos a la luz alveolar.

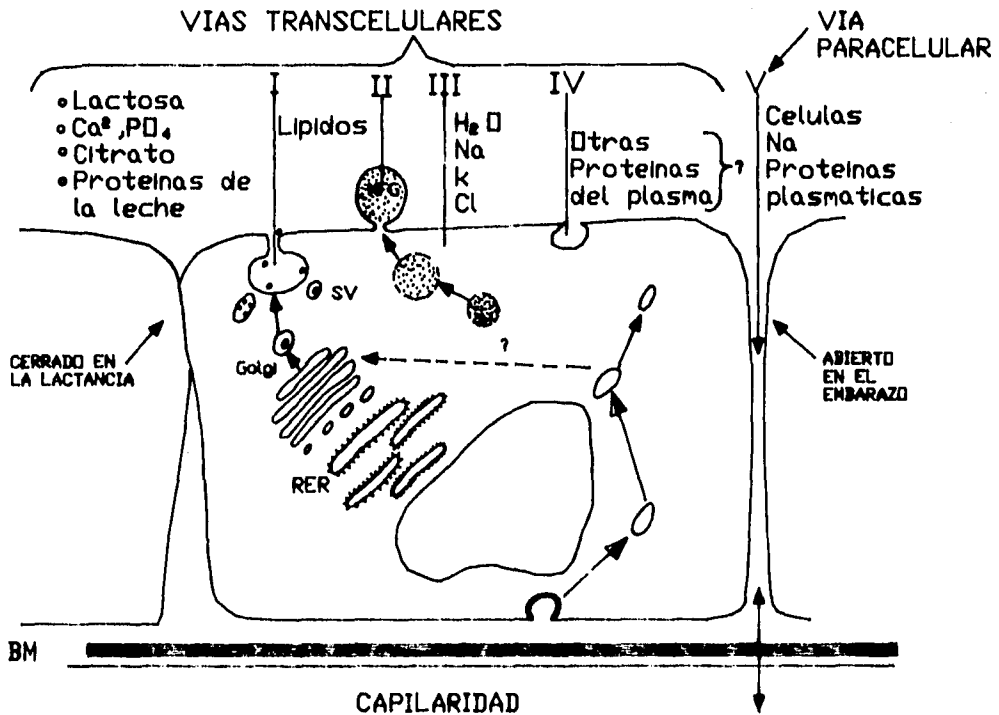


Fig A.- Las vías para la síntesis y secreción de la leche en los alveolos mamarios. (I) Exocitosis de la lactosa y las proteínas de la leche en las vesículas secretoras derivadas del Golgi. (II) Secreción de la grasa de la leche vía los glóbulos de grasa de la leche. (III) Secreción de iones y agua a través de la membrana apical (IV) Pinocitosis-exocitosis de inmunoglobulinas y (V) La vía paracelular para los componentes del plasma y los leucocitos.

Aunque los procesos bioquímicos involucrados son fundamentalmente los mismos en todos los mamíferos, existen diferencias en la producción y en algunos casos en la naturaleza de los sintetizados que resultan en la leche, así como la composición difiere de especie a especie.

Algunas de las vías de secreción de la leche, por ejemplo, la exocitosis de vesículas que contienen proteínas, son comunes a muchos tejidos secretores tales como el páncreas, el hígado y las glándulas salivales. En contraste el mecanismo para la secreción de lípidos en la leche parece ser único de la glándula mamaria.

En comparación con las glándulas salivales y glándulas sudoríparas, la velocidad de secreción de la leche es lenta, cerca de 1 a 2 ml de leche por gramo de tejido por día [102]. La leche es almacenada en espacios adyacentes a las que la producen. Histológicamente las células que delimitan los conductos mas pequeños se parecen a las células alveolares y reaccionan con anticuerpos anticaseína, lo que sugiere que ellas, al igual que las células alveolares también secretan leche [102,103].

Debido a que la leche pasa rápidamente a través de los conductos, este tránsito forzado de los alveolos al pezón, es poco probable que un proceso de reabsorción, como los que se encuentran en glándulas de la saliva y del sudor, juegue un papel importante en la composición de la leche.

Las características de las cinco vías para la secreción

de la leche serán resumidas y se discutirán los cambios en la composición de la secreción mamaria en el parto, la secreción de elementos celulares a la leche, los mecanismos por los cuales los infantes remueven la leche del pecho y finalmente el flujo sanguíneo mamario.

MECANISMOS CELULARES PARA LA SINTESIS Y LA SECRECION DE LA LECHE.

Para producir leche, se sincronizan cuatro procesos de secreción en las células alveolares de la glándula mamaria madura: la exocitosis, la síntesis de lípidos y su secreción, la secreción de iones y agua y la transferencia de inmunoglobulina del espacio extracelular.

EXOCITOSIS.

Entre los componentes más importantes de la leche tenemos a las proteínas, la lactosa, el calcio, el fosfato y el citrato que son empaquetados en vesículas secretoras y secretados por exocitosis.

La secuencia de aminoácidos de las proteínas de la leche son codificadas en el DNA nuclear, son transcritos en el RNA mensajero el cual pasa al citoplasma. Al igual que otras proteínas secretadas, la traducción del RNAm ocurre en los ribosomas que se encuentran unidos a la membrana del retículo endoplásmico. Conforme la proteína es sintetizada es transferida a la luz del retículo, la secuencia cercana al aminoácido N-terminal es eliminada y los carbohidratos pueden ser adicionados.

Las proteínas así atrapadas son llevadas después al sistema de Golgi para ser procesadas y seleccionadas.

El calcio, el fosfato y el citrato son transportados al interior de las vesículas del aparato de Golgi desde el citoplasma. Dentro de esas vesículas el calcio y el fosfato se combinan con las fosfoproteínas conocidas como caseínas para formar grandes agregados llamados micelas.

La galactosiltransferasa, una enzima unida a la membrana, reacciona con una proteína soluble, la α -lactalbúmina dentro del sistema de Golgi para sintetizar la lactosa. Debido a que la membrana de este aparato es impermeable a la lactosa, el carbohidrato es osmóticamente activo; conforme la lactosa se acumula, las vesículas se van llenando de agua.

Cuando las vesículas alcanzan las regiones terminales del Golgi, las micelas de caseína y otras proteínas de la leche, la lactosa, el calcio, el fosfato y el citrato son empaquetados en las vesículas secretoras, éstas son llevadas hacia la región apical de la célula fundiéndose con la membrana apical y liberando su contenido en el espacio alveolar.

Síntesis de lípidos y su secreción.

Los triacilgliceroles son sintetizados en el citoplasma y en el retículo endoplásmico liso de las células alveolares mamarias, coalescen en grandes gotas de grasa, las cuales gradualmente son movilizadas hacia el ápice de la célula. Las gotitas de lípidos chocan contra la membrana y llegan a ser

totalmente cubiertas en la membrana plasmática apical y finalmente se separan de las células como glóbulos de grasa de la leche. La inclusión ocasional de una fracción del citoplasma dentro de los glóbulos permite que alguna sustancia contenida en el citoplasma entre a la leche [104].

SECRECIÓN DE IONES MONOVALENTES Y AGUA.-

El sodio, el potasio y el agua pueden pasar libremente al Golgi, a las vesículas secretoras y la membrana apical.

El agua se moviliza de las células a través de esas membranas en respuesta a un gradiente osmótico establecido por la lactosa [102,105].

Las concentraciones de potasio y de sodio en la leche son directamente reguladas por el potencial eléctrico a través de la membrana apical. Debido a que el cloruro en la leche no está en equilibrio con su concentración en el citoplasma, es necesario postular alguna clase de transporte activo para que este ion regrese a la célula. La concentración del ion bicarbonato es mas baja en la leche que en el plasma, sin embargo se desconoce como es secretado a la leche, aunque Linzell y Peaker postularon un intercambio de $\text{Cl}^- \text{HCO}_3$ en la membrana apical [106].

Secreción de inmunoglobulina.

La inmunoglobulina A, y quizá otras proteínas del plasma, se combinan con un receptor específico en la membrana basolateral de la célula. El receptor y la IgA ligada a él son internadas en una vesícula endocítica y son transportadas

hacia la membrana apical o al aparato de Golgi para después ser vaciadas en la leche [107].

FLUJO DE MEMBRANA EN LAS CELULAS ALVEOLARES MAMARIAS.

Es aparente que hay un tráfico intenso entre los compartimientos membranosos durante la síntesis y la secreción de los componentes de la leche. Por ejemplo, las proteínas originalmente atrapadas en el retículo endoplásmico rugoso pueden ser transferidas al aparato de Golgi para su selección y mas tarde empaquetadas en las vesículas secretoras.

Los mecanismos de esas transferencias y el flujo de materiales membranosos entre esos compartimientos no son todavía entendidos aunque están sujetos de considerable interés general por parte de los biólogos celulares [108]. La cronología y la organización ultraestructural de la exocitosis y de la secreción de los glóbulos de grasa han sugerido a algunos investigadores que la secreción de la leche está acompañada por un flujo polarizado de membranas intracelulares [109]. De acuerdo con este punto de vista, las membranas, posiblemente en asociación con los productos de secreción recién sintetizados, se movilizan del complejo de Golgi a las vesículas secretoras y de ahí a la membrana plasmática donde son envueltas y expulsadas en los glóbulos de grasa de la leche. De acuerdo con este modelo, la membrana apical muestra un recambio con la membrana, ya que se incrementa su superficie con las vesículas secretoras y es

removida como la membrana de los glóbulos de grasa de la leche.

Evidencias que concuerdan con este esquema, han sido obtenidas por la observación de que ciertas enzimas del aparato de Golgi como la xantina oxidasa, la galactosil transferasa y la tiamina pirofosfatasa son también encontradas en la membrana de los glóbulos de grasa de la leche. En otros estudios, empleando la criofractura se ha observado que algunas partículas intrínsecas de la membrana, probablemente proteínas, son excluidas parcialmente de la membrana de los glóbulos de grasa de la leche, sugiriendo que hay una selección y segregación de los componentes proteicos de la membrana apical y que son atrapados en los glóbulos de grasa de la leche.

Los mecanismos propuestos para el transporte transcelular de las inmunoglobulinas de la leche, mediado por receptores, postulan dos vías adicionales de flujo de membrana: 1) una porción de la membrana del Golgi que contiene el receptor para la inmunoglobulina recién sintetizada es transportada y se fusiona con la membrana plasmática basolateral de la célula secretora. 2) Después de la unión de la inmunoglobulina, el complejo es endocitado y la membrana de la vesícula resultante es transportada hacia la membrana apical y fusionada con ésta [110,111].

EL PAPEL DE LA VIA PARACELULAR EN LA SECRECIÓN DE LA LECHE.

La quinta vía para la secreción de sustancias hacia la leche involucra el paso de esas sustancias entre las células epiteliales y no a través de ellas por lo que es llamada la vía paracelular.

El paso de sustancias a través de los espacios entre las células alveolares es normalmente evitado por uniones herméticas (zona de oclusión) entre células alveolares adyacentes [102, 105].

Durante el embarazo, así como en la mastitis y en las mamas en involución esas uniones llegan a abrirse permitiendo que algunos constituyentes del plasma pasen directamente a la leche.

Bajo esas condiciones, la secreción mamaria tiene una alta concentración de sodio y cloruro y bajas concentraciones de lactosa y potasio que son generalmente encontradas en la leche durante la lactancia plena.

Cambios en la composición de la leche al parto.

Después del parto, en el humano, la composición de la secreción mamaria cambia marcadamente, pasando de una solución rica en sodio, cloruro, inmunoglobulinas y lactoferrina a una solución rica en lactosa con baja concentración de proteínas. Un incremento abrupto en la actividad sintética de las células alveolares produce un incremento tanto en el volumen de la leche secretada como en la producción total de nutrientes. El cierre de esas uniones

complejas es responsable del cambio en la composición iónica ya que ahora se evita el paso directo a la leche de los elementos del plasma tales como el sodio y el cloruro.

Durante la transición entre la secreción de calostro a la secreción de leche madura, parte de la actividad de las células alveolares también decrece, en particular la secreción de lactoferrina e IgA. Esto sugiere que la actividad secretora de las células alveolares es regulada de tal forma que las sustancias de importancia nutricional primaria reemplazan a aquellas cuya importancia es inmunológica o de protección en el período temprano del postparto.

La secreción llamada precalostro, puede ser obtenida de la glándula mamaria de mujeres embarazadas. De la mitad del embarazo al parto, la composición del precalostro es bastante estable, con altas concentraciones de sodio, cloruro, lactoferrina e inmunoglobulinas y bajos niveles de lactosa[112]. Empezando en el parto, la secreción mamaria es llamada calostro. En general, este término ha sido usado en los humanos para describir las secreciones mamarias obtenidas durante los primeros cuatro o cinco días después del parto. La secreción obtenida durante los siguientes cinco días es llamada leche de transición. Es evidente que la composición de la secreción mamaria sufre un ajuste continuo durante el postparto de manera que no se pueden dar valores precisos en la composición.

Durante la mastitis y después del destete ocurren cambios en la composición que son opuestos a los que se presentan en la lactogénesis [113,114,115]. Se ha sugerido que las diferencias obtenidas en la composición pueden explicar la observación de que los infantes prematuros crecen mejor cuando son alimentados con la leche de su propia madre que cuando son alimentados con productos de los bancos de leche. Los datos obtenidos muestran que en esta condición los cambios en el epitelio mamario son retardados en las madres con niños prematuros.

Ya que las bases fisiológicas de esta observación no están claras, se ha sugerido investigar si ese retraso es producido por un vaciado incompleto del seno debido a la débil succión del infante prematuro o bien a la remoción insuficiente de la leche con un "tiraleche" en aquellas mujeres cuyos infantes son demasiado chicos para mamar.

Sin embargo, el retraso en la maduración del epitelio mamario puede también reflejar un desarrollo preparto incompleto.

La secreción de células en el calostro y la leche.

Durante el puerperio temprano, la secreción mamaria en el seno humano contiene cerca de 10^6 células/ml, la mayoría de las cuales son polimorfonucleares, macrófagos y linfocitos. Después del primer mes, el número de células secretadas se reduce por un factor de al menos 100 y las células predominantes cambian de leucocitos a células

epiteliales, las cuales son encontradas en la leche durante la lactancia a una concentración de 10^4 células/ml [116,117].

La velocidad diaria de secreción de leucocitos a la leche humana parece alcanzar su máximo el día 5 y después cae gradualmente conforme madura el epitelio mamario. En micrografías electrónicas, los leucocitos pueden ser vistos colocados entre las células epiteliales mamarias, sugiriendo que entran a la secreción mamaria directamente por la vía paracelular [118].

Se desconoce si estas células modifican la integridad de las uniones complejas o si ellas pasan a través de espacios en el epitelio alveolar. En cualquier caso, el número de leucocitos secretados en la leche es mas alto durante la lactancia temprana cuando las uniones complejas son mas permeables a pequeños iones y otros constituyentes del plasma[119,120].

La succión y la eyección de la leche del seno.

La cantidad de leche que es removida del seno es el producto de la interacción coordinada entre la succión del infante y el reflejo de la bajada de la leche en la madre. Cuando el infante comienza la succión, los impulsos aferentes generados en los receptores de la areola, viajan al cerebro en donde estimulan la liberación de la oxitocina de la pituitaria posterior. La oxitocina viaja a través de la corriente sanguínea hacia el seno, donde se combina con receptores específicos en las células mioepiteliales,

estimulándolas a contraerse y forzar la leche de los alveolos hacia los conductos mamarios y después hacia los senos. Si el infante está siendo lactado correctamente, el pezón y mucho de la areola son colocados en la boca del infante de manera que el pezón alcanzaría el paladar blando formado. Los senos mamarios se extienden dentro del pezón. La leche es removida no tanto por la succión como por la presión de la lengua contra el paladar duro el cual permite a la leche fluir del pezón a la boca del niño [121,122].

Los senos se rellenan por la acción continuada de la oxitocina que fuerza a la leche de los alveolos en los conductos.

Un sinnúmero de problemas puede producir un vaciamiento inadecuado de la leche. Estos incluyen la incapacidad del infante a desarrollar una succión suficientemente fuerte para estimular las terminales nerviosas aferentes en la areola y remover completamente la leche del seno.

El daño de algún nervio de la areola ocasionado por una cirugía o bien un estado emocional desfavorable en la madre interfiere con la secreción de oxitocina [123]. Si estos problemas no son resueltos es probable que la leche sea retenida en los alveolos produciendo la inhibición de la secreción.

FLUJO SANGUINEO MAMARIO.

En todas las especies donde ha sido medido, el flujo sanguíneo se incrementa marcadamente en la lactogénesis y

abarca una proporción importante del gasto cardiaco durante la lactancia. En la cabra y la vaca el flujo mamario está íntimamente relacionado con la producción láctea, de 400 a 500 litros de sangre circulan en la glándula mamaria por cada litro que es producido [124].

Estas mediciones no han sido realizadas en el humano, aunque la cantidad del drenaje venoso de los pechos tanto en el embarazo como en la lactancia sugiere una hiperemia en el seno de las mujeres desde las etapas tempranas del embarazo.

Algunos estudios empleando termometría de piel, muestran que el flujo sanguíneo mamario incrementa marcadamente durante el embarazo y se eleva después del parto. Existe una correlación entre el flujo sanguíneo y la producción de leche.

La naturaleza de los factores que controlan el tono vasomotor en la glándula mamaria ha recibido poca atención, aunque Linzell ha señalado que los vasos sanguíneos en la mama muestran una gran sensibilidad a la epinefrina, norepinefrina y en las cabras se observa un efecto vasoconstrictor de la serotonina [125]. La adenosina y la bradikinina mostraron un efecto vasodilatador. En cabras conscientes la oclusión breve de la arteria mamaria produjo un incremento del flujo mamario sugiriendo la acumulación de un vasodilatador durante el período que se redujo la perfusión del tejido.

La infusión de bromocriptina en la sangre evita los cambios en el flujo mamario que se observan durante el parto en esta especie, lo que da a entender que la prolactina no participa en la regulación del flujo mamario.

En resumen, el flujo sanguíneo mamario parece estar estrechamente relacionado con la velocidad de secreción de la leche y puede ser regulado por cambios en el gasto cardíaco o en el tono vasomotor local [125].

SINTESIS DE PROTEINAS, PROCESAMIENTO Y SECRECION EN LA GLANDULA MAMARIA.

Las proteínas mas importantes en la leche humana son la α -lactalbúmina (30% de la proteína total de la leche madura), la lactoferrina (10-20%), la caseína (40%) y la inmunoglobulina A (IgA, 10%). Otras proteínas de importancia incluyen a las IgG, la IgM, la lisozima y la albúmina sérica. Un grupo de proteínas de menor importancia incluyen proteínas que unen diferentes ligandos tales como son la proteína que une a la corticosterona, la proteína que une la vitamina B, la proteína que une al folato y hormonas tales como la prolactina, el factor de crecimiento epidérmico, así como las proteínas de la membrana de los glóbulos de grasa por citar algunos. En suma, mas de 30 enzimas han sido identificadas en la leche humana. La función de esas enzimas es desconocida excepto para la lactosa sintetasa y la lipasa activada por sales biliares. Mientras que algunas de estas enzimas provienen del resto del citoplasma presente en la leche;

otras como las glicosil transferasas, probablemente se originan en las vesículas del aparato de Golgi o son liberadas de las membranas de los glóbulos de grasa de la leche [126,127].

Las propiedades de las proteínas de la leche.

Caseína.- La caseína es la proteína mas importante de la mayoría de las especies y comprende varias familias de fosfoproteínas de peso molecular de 26,000 a 45,000. La leche humana contiene una concentración excepcionalmente baja de caseína (20% del total). Las caseínas α y β son moléculas lineales que contienen una gran proporción de prolina. Un extremo de estas moléculas contiene una alta densidad de carboxilos cargados negativamente y grupos fosfato, los cuales tienden a interaccionar con el calcio. El otro extremo está formado con aminoácidos hidrofóbicos los cuales promueven la asociación entre ellos. La caseína κ es una gran molécula y se conoce solo una parte de esa estructura. En presencia de concentraciones milimolares de calcio y fosfato, las moléculas de caseína se asocian para formar micelas de caseína. Este agregado único de proteína, con un diámetro de 140 nanómetros, contiene hasta 25,000 moléculas de caseína, uniendo en promedio 20 moléculas de iones calcio y 18 de iones fosfato por monómero de proteína, así la caseína parece ser un empaque altamente eficiente para el acceso de proteína y sales al infante [128,129].

α -LACTALBUMINA.

La α -lactalbúmina (peso molecular 14,081 en los humanos) parece ser derivada de la lisozima, está presente en la leche de todas las especies las cuales secretan lactosa. Actúa como un cofactor en la síntesis de lactosa.

Debido a que la leche humana tiene una concentración muy baja tanto de α -lactalbúmina y lactoferrina, éstas son fracciones nutricionales muy importantes de las proteínas de la leche humana [130].

Lactoferrina.

La lactoferrina ha sido llamada la proteína roja de la leche.

Fue encontrada primero como una proteína roja en la leche humana por Sorensen y Sorensen [131]. Es una unión de metal y proteína con un peso molecular de 76,000, cercanamente parecida a la transferrina. Cada molécula une dos iones férricos con dos aniones bicarbonato y puede también unir zinc. Está presente en altas concentraciones en el calostro de la mayoría de las especies así también como en las secreciones exocrinas tales como la saliva y el jugo pancreático.

En la mayoría de las especies la concentración de lactoferrina cae a niveles muy bajos en la leche madura (0.2 mg/ml en la vaca), pero se encuentran niveles relativamente altos durante la lactancia en el humano y los cobayos (2 mg/ml). La lactoferrina que es secretada en la leche humana

está saturada en un 5 a 10% con hierro.

La lactoferrina tiene actividad tanto bacteriostática como bactericida debido probablemente a que su avidéz de unión por el hierro la hace no disponible a la bacteria.

Se ha postulado que la lactoferrina juega un papel nutricional en la transferencia de hierro al neonato; sin embargo, su baja saturación de hierro, el hecho de que la forma saturada del hierro de la proteína es resistente a la hidrólisis proteolítica, y la observación de que los neonatos alimentados con pecho parecen tener normalmente un balance negativo de hierro, difiere de tal función. La síntesis de lactoferrina no ha sido estudiada en la glándula mamaria.

β -Lactoglobulina.

Esta proteína está presente en la leche de rumiantes y otras especies, que transfieren grandes cantidades de inmunoglobulina a su calostro. Sin embargo, su función es desconocida y no está presente en la leche de humanos, cobayos, ratas o ratones.

Inmunoglobulinas.

La inmunoglobulina secretora IgA está presente en altas concentraciones la primera semana después del nacimiento, disminuyendo a un nivel estable como de 2 mg/ml en la leche madura.

Las IgG e IgM son componentes menos importantes en la leche humana. En contraste, la IgG es la inmunoglobulina mas

importante en la leche de rumiantes y otras especies en las cuales las inmunoglobulinas de la leche atraviesan la mucosa intestinal y son importantes para la inmunidad pasiva del recién nacido. La vía para la secreción de esos componentes del plasma en la leche no se conoce.

Albumina sérica.

La albumina sérica está presente en una concentración de 2 mg/ml en el calostro disminuyendo a 0.5 mg/ml en la leche madura. Se origina del plasma y entra a la leche por la vía paracelular, aunque se han presentado evidencias que sugieren alguna síntesis de albumina sérica dentro de la glándula mamaria [132].

Las proteínas de la membrana de los glóbulos de grasa.

Durante su secreción, los glóbulos de grasa de la leche son cubiertos por la membrana apical del plasma que se separa del centro de los glóbulos de grasa por una capa densa de proteínas. Usando un gel de poliacrilamida para electroforesis, algunos autores pudieron separar 21 componentes proteicos de membranas de glóbulos de grasa de la leche de bovino bien lavados. Proteínas similares parecen estar presentes en humanos. Después de la remoción de la membrana y perder las proteínas asociadas, dos proteínas importantes están asociadas con el material residual filamentosos: la xantina oxidasa y la proteína de la banda 12 (peso molecular 76,000) para la cual se ha propuesto el

nombre de "butirofilina". Esta proteína ha mostrado por inmunofluorescencia estar concentrada en la superficie apical de las células epiteliales mamarias. No se encontró en otras células epiteliales o en otros tipos celulares en la glándula mamaria, lo que sugiere que está involucrada en la descarga vectorial de los glóbulos de grasa de la leche en la luz alveolar [133].

Los aminoácidos libres en la leche.

Los aminoácidos están presentes en concentraciones muy variadas en diferentes especies. En la mayoría de las especies, las cantidades totales son de 2 a 4 mM.

En la leche humana relativamente pobre en proteínas, los aminoácidos contribuyen con un 25% del nitrógeno total con niveles muy altos durante la lactancia temprana. La glutamina y el glutamato completan mas de la mitad de los aminoácidos totales, estando presentes en concentraciones de 1.4 y 0.3 mM respectivamente. La taurina está presente en altos niveles (0.3mM). La importancia nutricional de estas observaciones no es clara [134].

Los precursores de las proteínas- El transporte de aminoácidos en las células alveolares mamarias.

Las proteínas de la leche son sintetizadas a partir de aminoácidos derivados de la corriente sanguínea. Midiendo las concentraciones arterial, venosa y la del flujo sanguíneo de la mama, es posible determinar la proporción de aminoácidos

del plasma que son utilizados directamente en la síntesis de las proteínas de la leche. La metionina, la histidina, la fenilalanina, el triptófano y la tirosina parecen ser transferidos cuantitativamente a las proteínas de la leche mientras que la valina, la isoleucina, la lisina, la treonina y la arginina son oxidadas parcialmente dentro de las células alveolares.

El consumo de aminoácidos no esenciales es poco variable y muchos de los aminoácidos parecen ser sintetizados por la glándula. Se desconoce si el suministro de los aminoácidos es un factor limitante en la síntesis de la leche [135].

Los mecanismos por los cuales los aminoácidos libres entran a la leche no ha tenido un estudio sistemático. El alto nivel de glutamato en la leche humana así como la observación, hecha durante un estudio de la ingestión de glutamato monosódico en humanos, de que la concentración del glutamato en la leche no cambió aún cuando los niveles plasmáticos del glutamato variaron de 40 a 310 μM , indican que existe algún mecanismo para el transporte activo de este aminoácido hacia la leche. Por otro lado, un incremento en la fenilalanina en el plasma debido a la ingestión de un agente edulcorante, el metil ester de la aspartil-1-fenilalanina fué seguido por un incremento en los niveles de fenilalanina en la leche, sugiriendo que este tipo de aminoácidos encuentra una vía pasiva para ser transportado a la leche.

La síntesis y el procesamiento de las proteínas específicas de la leche.

Las investigaciones recientes sobre la síntesis y secreción de las proteínas de la leche incluyen algunas de las más importantes en este campo.

Dentro de la pasada década, se han podido utilizar los sistemas libres de células, en los cuales la síntesis y procesamiento de proteínas específicas pueden ser realizados bajo condiciones bien controladas. La aplicación de esas técnicas al estudio de la síntesis de proteínas de la leche, han mostrado que el producto inicial derivado de la traducción del RNAm de caseína y α -lactalbúmina contiene una secuencia extra de 16 a 28 aminoácidos principalmente hidrofóbicos en el extremo N-terminal llamado el péptido señal. Si se incluyen en los sistemas de síntesis fracciones de membrana que contienen retículo endoplásmico, se puede observar que las proteínas son procesadas al serle removido el péptido señal y las moléculas requeridas son secuestradas dentro de la cisterna de las vesículas membranosas.

Estas observaciones han sido interpretadas como que la secuencia señal inicia la unión del complejo RNAm-ribosomas a las membranas del retículo endoplásmico rugoso, iniciando la transferencia vectorial de la proteína naciente hacia las cisternas del retículo endoplásmico.

En vista de que la transferencia no ocurre, si las

membranas son adicionadas después de que concluyó la síntesis de proteína, el transporte parece coincidir con la traducción y es llamado un proceso cotraduccional. Ya que la secuencia señal es codificada por nucleótidos en el RNA_m y las bases complementarias en el DNA es obvio que tanto el destino como la estructura de las proteínas secretadas está bajo control genético [136,137].

Un segundo tipo de procesamiento, la N-glicosilación, o la transferencia de un oligosacárido rico en manosa, de un lípido acarreador a una arginina del polipéptido naciente (N-glicosilación) se realiza también en el retículo endoplásmico rugoso. De nuevo, la reacción parece ocurrir cuando la proteína cruza la membrana del retículo endoplásmico rugoso y es llamada a menudo centro de glicosilación. La adición de carbohidratos a las proteínas de la leche es específica para ciertas proteínas particulares y es variable entre las especies.

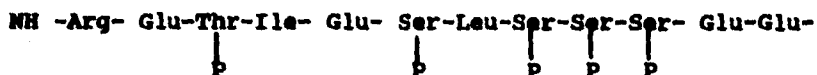
La caseína κ es la única caseína que contiene carbohidratos. La glicosilación *in vitro*, ha sido observada durante la síntesis de α -lactalbúmina y caseína en sistemas libres de células, sugiriendo que el centro de la glicosilación de las proteínas de la leche está en el retículo endoplásmico rugoso. Después de ser secuestradas en el retículo endoplásmico rugoso, las proteínas son rápidamente transferidas al sistema de Golgi, posiblemente a través de pequeñas vesículas de superficie lisa localizadas

alrededor de las membranas del aparato de Golgi [138].

Después del traslado del polipéptido al aparato de Golgi, se produce una modificación adicional que resulta en la pérdida parcial de unidades de manosa y la adición de otros monosacáridos entre la serina o la treonina y la N-acetil-galactosamina. Otras modificaciones, que se realizan en el sistema de Golgi incluyen la fosforilación y la formación de las micelas de la caseína. La caseína es fosforilada por una enzima, la caseína cinasa, asociada con la fracción membranal del Golgi. La reacción es:



y se ha mostrado que es catalizada por una cinasa independiente de AMPc. La secuencia de los primeros 12 aminoácidos en el extremo N-terminal de la β -caseína humana es:



Los grupos fosfato parecen ser esterificados a la treonina y la serina, dos aminoácidos localizados a la izquierda de cada glutamato o serina [139].

Nótese que la gran concentración de ácido glutámico y de los aminoácidos fosforilados da al extremo amino del polipéptido una fuerte carga negativa la cual es quizás responsable de la unión del calcio con las micelas de caseína. La fosforilación de la β -caseína humana es

heterogénea y en la leche humana han sido identificadas 6 formas de la proteína que contienen de 0 a 5 grupos fosfato, algunos autores han mostrado que la adición de los fosfato no es al azar, sino que ocurren en orden de 10 ó 9, después 8, 6 y 3. Los fosfatos 3,6 y 8 no son fosforilados por la caseína cinasa aislada de las glándulas mamarias del bovino, lo que sugiere que sea otra cinasa u otras cinasas las responsables de esta reacción en el humano.

El paso final en el procesamiento de la caseína es la formación de las micelas.

Aunque la base fisicoquímica de la formación es aún materia de controversia, está claro que en ellos se involucran las uniones hidrofóbicas entre los monómeros de caseína con las interacciones electrostáticas de los iones calcio y fosfato con aminoácidos ionizados. Waugh y Talbot han propuesto que las micelas de la caseína κ son estabilizadas por la adsorción a su superficie, una sugerencia que está de acuerdo con datos recientes que muestran que la fracción de la caseína κ en las micelas es directamente proporcional al área de la superficie [140].

Regulación de la síntesis de proteínas de la leche.

Bajo condiciones *in vivo*, la concentración de proteínas de la leche en la glándula mamaria se correlacionó con la cantidad presente de RNAs. Esto también parece ser el caso *in vitro*, en cultivos de explantes por períodos cortos, sugiriendo que mucho del control de la síntesis de proteínas

de la leche reside en el control de los niveles del RNAm. En esos sistemas, la acumulación del RNAm de la caseína, en presencia de la prolactina es el resultado tanto de un incremento en la velocidad de transcripción del RNAm como de una disminución en su velocidad de degradación.

Debido a que los niveles máximos de RNAm fueron observados en ausencia de la síntesis de caseína justo antes del nacimiento en ratas, es probable que los mecanismos de control de la traducción estén también presentes.

Se encontró que la caseína es degradada en explantes de glándula mamaria incubados en ausencia de hormonas, pero no cuando la insulina, la prolactina y el cortisol estuvieron presentes, sugiriendo que la degradación de proteína puede ser utilizada para regular la cantidad de proteína secretada. Parece, entonces que la regulación hormonal de la síntesis y la secreción de las proteínas de la leche puede realizarse a varios niveles incluyendo la transcripción y la degradación del RNAm así como la síntesis de proteínas y su degradación. El mecanismo por el cual estos procesos están coordinados es un desafío interesante para investigaciones futuras.

La secreción de las inmunoglobulinas.

Aunque la IgG está presente en altas concentraciones en el calostro de los rumiantes, la inmunoglobulina predominante en la leche humana es la IgA polimérica a la cual se une una proteína conocida como componente secretor. La evidencia sugiere que la IgA es sintetizada en las células plasmáticas

de los espacios intersticiales de las glándulas mamarias, en donde se combina con una forma transmembranal de alto peso molecular del componente secretor en la membrana basolateral de las células alveolares mamarias. Después de que el complejo se transporta a la membrana apical, la porción luminal del complejo es hidrolizada liberando el componente secretor maduro del complejo IgA. No es claro si la IgA secretora es liberada directamente en el lumen alveolar o si primero entra al Golgi para ser secretada con otras proteínas de la leche, por la vía de la exocitosis [141].

Conclusión.

Se conoce bien la estructura de las proteínas mas importantes de la leche tanto en los roedores como en los rumiantes y los mecanismos de su síntesis y secreción. En un futuro cercano, podemos esperar comparaciones estructurales entre las diferentes proteínas de la leche de varias especies para ofrecer conocimientos mas detallados que nos permitan conocer la evolución de los mamíferos.

Ya que los sitios activos de algunas de esas proteínas, actúan como enzimas, muestran una gran estabilidad durante la evolución, y la comparación de regiones específicas en sus secuencias de aminoácidos pueden permitir la correlación de tales sitios. Además, la disponibilidad de DNA complementario para la caseína, la α -lactalbúmina y las diferentes especies de RNAm permite estudiar la correlación entre la estructura de los genes de las proteínas de la leche y el control de sus

RNA mensajeros. Esta etapa augura un rápido progreso en la comprensión de los mecanismos genéticos que regulan la síntesis de las proteínas de la leche. Finalmente, existe evidencia suficiente de que la síntesis de las diferentes proteínas de la leche puede ser controlada independientemente.

Por ejemplo, la α -lactalbúmina es sintetizada en la glándula mamaria de los cobayos en el parto, pero la caseína no y el cortisol muestra efectos diferenciales en la acumulación de la α -lactalbúmina y la caseína en explantes cultivados de glándula mamaria de ratón en la mitad del embarazo [142]. El conocimiento de los mecanismos del control diferencial involucrado ofrecerá datos fascinantes de las bases moleculares de como ocurre la regulación de la síntesis y la secreción de las proteínas de la leche.

La síntesis de carbohidratos de la leche.

El disacárido lactosa, el carbohidrato mas importante de la leche, es sintetizado dentro de las vesículas secretoras del sistema de Golgi de las células alveolares. Este carbohidrato es sintetizado en bajas concentraciones en muy pocas plantas inferiores [143].

Debido a que la membrana del Golgi es impermeable a la lactosa, el disacárido drena agua osmóticamente en el espacio de la leche y en la mayoría de los mamíferos la velocidad de síntesis de la lactosa sirve como el control mas importante del volumen de leche producida.

Ciertas especies acuáticas del ártico secretan concentraciones muy bajas de lactosa, en tales especies el contenido calórico de la leche es proporcionado principalmente por los lípidos y el volumen de la leche lo determina principalmente la velocidad de secreción de lípidos y los iones monovalentes.

Además de la lactosa, la leche humana contiene pequeñas cantidades de monosacáridos y de oligosacáridos complejos. Los monosacáridos mas importantes son la glucosa y la galactosa, ambos presentes en concentraciones de 3 mM o menos. Mas de 50 oligosacáridos que contienen entre 3 y 8 o mas subunidades de monosacáridos han sido identificados y caracterizados en la leche humana [144].

Los componentes de estos oligosacáridos son la glucosa, la galactosa, la fucosa, la N-acetil glucosamina y el ácido siálico. La mayoría tienen una lactosa en el extremo reductor, sugiriendo que ellos son el resultado de la acción de las glicosil-transferasas del Golgi.

La estructura de los oligosacáridos en la leche humana varía con el tipo sanguíneo ABO o con el tipo sanguíneo individual de Lewis.

La utilización de la glucosa en la glándula mamaria.

En la glándula mamaria de no rumiantes, la glucosa sirve como el sustrato mas importante tanto para la lactosa como para la síntesis de lípidos. En los rumiantes, la glucosa parece ser usada solo en la síntesis de la lactosa y en la

vía de las pentosas fosfato para suministrar NADPH para la síntesis de los ácidos grasos. El acetato proporciona la mayoría de los átomos de carbono para la síntesis de los ácidos grasos así como también para el metabolismo energético.

La glucosa entra a las células alveolares desde el espacio extracelular utilizando mecanismos aún no bien definidos. Una parte de la glucosa que entra a las células va directamente al aparato de Golgi en donde se combina con la UDP-galactosa para formar la lactosa. El resto es convertido a glucosa-6-fosfato por la hexocinasa. La glucosa-6-fosfato tiene tres destinos posibles: la conversión a piruvato por la vía de la glucólisis, la vía de las pentosas fosfato y la formación de UDP-galactosa. El piruvato, que también puede ser formado del ácido láctico en la glándula, entra a la mitocondria donde puede ser oxidado a CO₂ en el ciclo de Krebs o bien ser transformado en citrato el cual regresa al citosol y sirve como un sustrato para la síntesis de los ácidos grasos [145].

La síntesis de UDP-galactosa.

Tres pasos son necesarios para la conversión de glucosa 6-fosfato a UDP-galactosa.

- 1) Glucosa- 6- fosfato ----> glucosa- 1- fosfato
- 2) Glucosa-1-fosfato + UTP --> UDP- glucosa + fosfato
- 3) UDP-glucosa -----> UDP-galactosa

Estas reacciones son catalizadas por la fosfoglucomutasa, la glucosa-1-fosfato uridiltransferasa y la UDP-glucosa-4-epimerasa, respectivamente. Esas reacciones están en equilibrio bajo las condiciones que prevalecen en el citosol, y no se consideran como reacciones que limiten la velocidad de síntesis de la lactosa.

La vía de la pentosa fosfato.

Esta vía, en la cual el carbono 1 de la glucosa es oxidado a CO₂ con la formación de NADPH, es muy activa en los tejidos que sintetizan ácidos grasos debido a que el NADPH es necesario para suministrar los equivalentes reductores. La ribulosa-5-fosfato formada en esta vía, es transformada a ribosa-5-fosfato la cual puede ser usada para la síntesis de nucleótidos o recombinarse por una compleja serie de transformaciones a glucosa-6-fosfato la cual puede ser reutilizada por alguna de las tres vías mencionadas.

La síntesis de lactosa.

La enzima lactosa sintetasa, localizada en el complejo de Golgi, cataliza la formación de la lactosa usando la reacción global:



El complejo consiste de 2 componentes, una enzima unida a la membrana, la galactosil transferasa, y una proteína reguladora, la α -lactalbúmina. La galactosil transferasa se localiza en las membranas del Golgi de muchos tejidos, donde

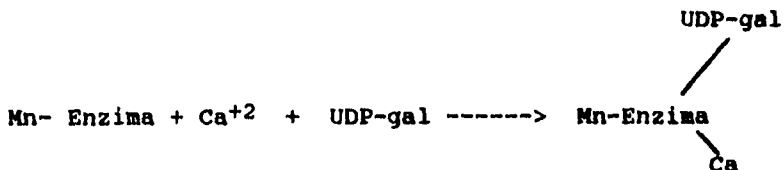
cataliza la transferencia de los grupos galactosilo de la UDP-galactosa a las fracciones carbohidrato de las glicoproteínas. Aunque es capaz de catalizar la formación de la lactosa, normalmente no lo hace debido a que su constante de Michaelis (K_m) para la glucosa es demasiado alta ($\sim 1M$). La unión de la α -lactalbúmina a la galactosil transferasa incrementa la afinidad de la enzima por la glucosa ($K_m \sim 1 mM$) de manera que la formación de la lactosa puede ocurrir bajo condiciones fisiológicas.

La galactosil transferasa se localiza en muchos tejidos; y es la presencia de la proteína específica de la leche, la α -lactalbúmina, la que le confiere propiedades específicas a las enzimas de la glándula mamaria, ya que se ha mostrado que la galactosil transferasa de la cebolla puede sintetizar lactosa en presencia de la α -lactalbúmina.

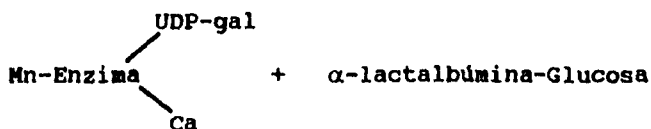
El mecanismo molecular de la síntesis de la lactosa ha sido objeto de un intenso estudio. La reacción es activada por iones metálicos, los cuales se unen a dos sitios en la galactosil transferasa. Los iones manganeso se unen con alta afinidad al sitio I estabilizando la conformación activa de la enzima.

El cobalto, el zinc y el cadmio pueden sustituir el manganeso en el sitio I pero no por el calcio.

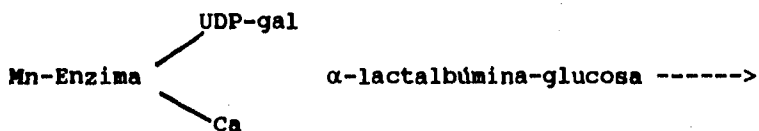
En condiciones *in vivo*, un segundo ion metálico probablemente el calcio y la UDP-galactosa se unen al sitio II a alguna distancia del primer sitio estructural.



El calcio forma probablemente un puente entre la enzima y el sustrato. La K_d para la unión del calcio al sitio II es de 2×10^{-3} M casi igual a la concentración del calcio dentro de las vesículas del Golgi. El manganeso puede ser sustituido por el calcio en este sitio y es generalmente usado como un activador en estudios *in vitro* de la galactosil transferasa. Sin embargo, la afinidad por el manganeso en el sitio II está en la región milimolar, sugiriendo que esta unión no se lleva al cabo bajo condiciones fisiológicas. En un paso final, la α -lactalbúmina y la glucosa se unen al complejo enzima UDP-galactosa aparentemente en un orden al azar, incrementando cada una en forma sinérgica la afinidad de la enzima.



La α -lactalbúmina también contiene 2 sitios de unión a metales que bajo condiciones fisiológicas probablemente están ligados con el calcio, ya que sus constantes de disociación son 3×10^{-9} mol y 3×10^{-5} M. Cuando todos los sustratos están presentes en la enzima, la galactosa y la glucosa son ligadas en una unión 1,4 glicosídica y la lactosa así formada, es liberada de la enzima seguida por la liberación de la α -lactalbúmina y después el calcio y el UDP:



El UDP producido es un buen inhibidor de la reacción.

La hipótesis de Brew de que la síntesis de la lactosa se realiza dentro de las cisternas del aparato de Golgi ha recibido una confirmación experimental por los estudios de Kunh y White en los cuales la mayoría de la lactosa sintetizada en fracciones "crudas particuladas" de las glándulas mamarias de la rata fue encontrada dentro de vesículas. En experimentos posteriores usando fracciones mas purificadas del Golgi, estos autores encontraron que una nucleosido difosfatasa de las vesículas, probablemente la tiamina difosfatasa, hidroliza el UDP a UMP y Pi. Se piensa

que esa reacción hace una doble función ya que reduce la concentración del UDP en el Golgi con lo que se evita la inhibición de la síntesis de la lactosa y convierte al UDP que es impermeable en UMP para el cual las membranas del Golgi son permeables. El UMP y el Pi así formados regresan al compartimento citoplásmico donde ellos son reutilizados en la síntesis de la UDP-galactosa [146,147].

La regulación de la síntesis de lactosa.

Aunque se producen pequeñas cantidades de lactosa en la glándula mamaria de algunas especies antes del parto, el inicio de la secreción de la leche es ocasionada por un rápido incremento en la síntesis de la lactosa.

Por esta razón y debido a que la regulación de la velocidad de síntesis de la lactosa, debe seguir una regulación día con día para la producción de leche, el control de la lactosa sintetasa ha sido un objeto de continuo interés. Actualmente se pueden sugerir varios mecanismos por los cuales la lactosa sintetasa puede ser regulada.

El contenido de lactosa y de α -lactalbúmina de la leche de varias especies guarda una proporción, sugiriendo que la concentración de α -lactalbúmina presente en la región del Golgi puede regular la velocidad de síntesis de la lactosa. Esto es apoyado por las observaciones de Nicholas y colaboradores quienes mostraron que durante los primeros 20 días de lactancia en la rata, se mantiene una correlación entre las concentraciones de lactosa y α -lactalbúmina de la

leche [148]. Sin embargo, en el destete al día 20, la concentración de la α -lactalbúmina se incrementa, mientras que la lactosa cae bruscamente, sugiriendo que la α -lactalbúmina no es el único factor que controla la síntesis de la lactosa.

Powell y Brew sugirieron que la concentración del calcio en las vesículas del Golgi puede regular la velocidad de síntesis de la lactosa [149]. Estudios, *in vitro* han mostrado que la galactosil transferasa requiere de 4 mM de calcio para alcanzar su actividad máxima. Para mantener concentraciones milimolares de calcio dentro del Golgi debe requerir de un transporte activo del calcio desde un citosol con menor concentración de calcio a través de un sistema de transporte dependiente de ATP.

Si la actividad del sistema de transporte estuviera sujeta a la regulación se piensa que actividad de la lactosa sintetasa puede ser controlada por la concentración del calcio dentro del Golgi. La concentración de la glucosa parece ser un factor limitante para la síntesis de lactosa. En experimentos realizados en cabras en ayuno, la velocidad de síntesis de la lactosa fue directamente proporcional a la concentración de glucosa en la leche. Debido a que las concentraciones de glucosa tanto en la leche como en las células alveolares, parecen ser iguales, estas observaciones sugieren que la síntesis de lactosa puede también ser regulada por la concentración intracelular de glucosa. No se

conoce como se podría llevar al cabo esta regulación.

Conclusión.

Los mecanismos bioquímicos de la síntesis de lactosa y su localización dentro del lumen de las membranas del Golgi han sido bien establecidas. Falta mucho por aprender sobre las interacciones moleculares involucradas en el control de la lactosa sintetasa. Ya que las concentraciones de la α -lactalbúmina, el calcio y la glucosa dentro del sistema de Golgi, permanecen como candidatos potenciales para la regulación de la velocidad de síntesis de lactosa, la posibilidad de que los tres interactuen para determinar la velocidad de síntesis de la lactosa bajo condiciones fisiológicas debe ser seriamente considerado.

La secreción del calcio, el fosfato y el citrato en la leche.

Existe buena evidencia de que el calcio, el fosfato y el citrato llegan a la leche vía el sistema de Golgi.

Se desconoce como muchas otras sustancias son secretadas vía el sistema de Golgi, aunque se ha sugerido que podría ser la fuente principal de los nucleótidos en la leche. Se sabe que la leche es una fuente rica en calcio y fosfato.

Sin embargo, es en la última década que se han profundizado en los mecanismos por los cuales estos elementos llegan a la leche. Un tiempo en el cual se han realizado una gran cantidad de estudios del metabolismo del calcio en

varios tipos de células. Ambas sustancias existen en dos formas una soluble y otra unida a la caseína. Esta última puede ser separada por ultracentrifugación. El calcio soluble puede ser más subdividido en calcio libre y el calcio que forma complejos con los iones citrato y fosfato. En la mayoría de las especies, la humana es una de las pocas excepciones, la mayor proporción del calcio y el fosfato está unida a la caseína. Sin embargo, la leche humana tiene muy poca caseína y solo el 40% del calcio y del fosfato en la leche humana, está unido a la caseína.

La leche humana también tiene el más bajo contenido de calcio y fosfato en relación con otras especies.

Por otro lado, análisis recientes sugieren que el calcio ionizado en la leche humana (3 a 4 mM) es el doble de la concentración de la leche de bovino (2mM). Estudios longitudinales en mujeres muestran una clara disminución en el contenido total de calcio y de fósforo con la duración de la lactancia. Se ha observado que en mujeres que han lactado por más de 18 meses hay una disminución de un 30 a 40% [150].

El papel de las vesículas secretoras del Golgi en la secreción de calcio.

La observación de que una gran proporción de calcio y fosfato en la mayoría de las leches están unidos a las micelas de caseína sugiere que la mayoría de estas sustancias puede ser secretada por los mismos mecanismos de exocitosis que se emplean para la secreción de la caseína. Aunque se ha

inferido que la membrana del Golgi es permeable al fosfato no existen estudios que muestren el transporte del fosfato en este sistema. Las evidencias fisiológica, morfológica y bioquímica apoyan la hipótesis de que la secreción de calcio es mediada por el sistema de Golgi. En experimentos realizados en cabras, se mostró que tanto la secreción del calcio como del fosfato se realizan a través de exocitosis. La reunión de las micelas de caseína dentro de las vesículas secretoras derivadas del Golgi fue observada con el microscopio electrónico al inicio de los años 70's.

Debido a que la formación de las micelas requiere de concentraciones milimolares de calcio, se puede inferir que el sistema de Golgi en la glándula mamaria contiene una concentración de calcio 3 veces mayor que en el citoplasma, lo cual es probablemente menos de 1 μM .

La primera evidencia bioquímica de que en las membranas del Golgi exista un mecanismo de transporte activo para el calcio, el cual mueve al calcio contra gradiente fue obtenido por Baumrucker y Keenan en fracciones de membrana de la glándula mamaria de bovino. Trabajos posteriores han confirmado la acumulación de calcio, dependiente de ATP en vesículas derivadas del Golgi, en ratones y ratas.

El transporte de calcio parece ser el resultado de una ATP asa activada por calcio, la cual tiene una K_m para el calcio en el rango micromolar. Como sucede con otras enzimas similares del retículo liso y de las membranas de los

eritrocitos, la actividad depende del magnesio. El mecanismo de reacción parece involucrar un intermediario fosforilado con un peso molecular aproximado de 100,000 daltones [151].

Posibles actividades reguladoras del calcio en la glándula mamaria.

Se conoce en una gran variedad de células secretoras que un incremento en el calcio citosólico se asocia con una secreción generada por estímulos [152]. Sería razonable postular que un pequeño incremento en el calcio citosólico libre acompaña el inicio de una copiosa secreción de leche en el parto. Sin embargo, no existen estudios en la glándula mamaria, que permitan evaluar esta hipótesis.

Es claro que por lo menos dos enzimas del sistema del Golgi, la galactosil transferasa y la caseína cinasa, requieren concentraciones milimolares de calcio para su activación, aumentando la posibilidad de que ciertos aspectos de la síntesis de la leche puedan estar regulados por la concentración de calcio transportado hacia las vesículas del Golgi [153].

La secreción de lípidos en la leche.

Los lípidos en la leche proveen los ácidos grasos esenciales y otros factores liposolubles, y hacen una contribución importante al contenido energético de la leche.

Aproximadamente el 4% del contenido de grasa de la leche humana proporciona cerca del 40% del total de calorías. El

98% de los lípidos de la leche son triacilgliceroles contenidos en gotas de grasa rodeados por una membrana llamados glóbulos de grasa de la leche. Otros lípidos de la leche son el colesterol, los fosfolípidos, las vitaminas A, E, D y un gran número de lípidos menores. La mayoría de estos, son localizados también en los glóbulos de grasa. La mitad o dos tercios de los fosfolípidos de la leche se encuentran en la membrana de los glóbulos de grasa, el resto están asociados a proteínas de la crema de la leche.

Los ácidos grasos y el glicerol para la síntesis de los triacilgliceroles son obtenidos del flujo sanguíneo o sintetizados por las células alveolares usando las vías que se señalan a continuación. La proporción de los ácidos grasos que son sintetizados en la glándula mamaria está influenciada fuertemente por la dieta. En mujeres que ingieren una dieta occidental normal, en la cual el 40% o mas de las calorías corresponde a grasa, solo el 20% de los ácidos grasos de la leche son sintetizados por la glándula mamaria. El resto son tomados de la dieta y su composición refleja la composición de la dieta. Por otro lado, con una dieta rica en carbohidratos, el 40% o mas de los ácidos grasos de la leche son sintetizados por la glándula mamaria, muchos de los cuales tienen cadena intermedia como son el ácido láurico y el ácido mirístico [154].

La composición de la grasa de la leche.

Los lípidos de la leche son la fuente principal de sustratos de alta energía para los infantes de la mayoría de los mamíferos, proporcionando cerca de 500 kcal/g de la grasa de la leche. Aunque las proteínas y los carbohidratos son secretados con suficiente agua para contribuir iso-osmóticamente con el plasma, proporcionan solo de 30 a 65 kcal/g de leche. La proporción de la grasa de la leche varía de especie a especie y se ha observado una relación inversa entre el contenido de grasa y de lactosa de varias leches[155].

En mamíferos acuáticos del ártico, un alto contenido de grasa de la leche permite la transferencia de una gran cantidad de energía de la madre a la cría sin la transferencia de cantidades de agua que acompañarían el paso de estas calorías en la forma de lactosa o proteínas. Esto es importante en un ambiente acuoso marino, donde los fluidos isotónicos del cuerpo de la madre deben ser mantenidos a expensas del metabolismo. Por otro lado, se puede argumentar que la gran cantidad de agua necesaria para la secreción de la leche humana con su alto contenido de lactosa representa una adaptación a la gran pérdida de agua transpirada por los infantes en los ambientes tropicales donde se cree que la especie humana se originó.

El contenido de grasa es el constituyente mas variable de la leche humana, cambiando con la alimentación y en forma

circadiana. Se piensa que la grasa de la leche se secreta continuamente, pero la leche frontal tiene un contenido mas bajo de grasa (1 a 2 g/100ml) que la leche escondida (4g/100ml). Este cambio en el contenido de grasa puede resultar de la adsorción de los glóbulos de grasa a las paredes de los alveolos con el desplazamiento solo cuando la glándula se vacía.

Las variaciones diurnas y en periodos largos observados por Hytten en el contenido de grasa de la leche pueden ser debidas a cambios en la velocidad de secreción [155]. Existen datos que sugieren que el contenido de grasa de la leche disminuye en madres mal nutridas. Aunque probablemente, la mala nutrición tiene un efecto mas pronunciado sobre el volumen de la leche que sobre su composición.

La composición de ácidos grasos de los lípidos de la leche varía tanto con la especie como con la dieta. Con una dieta normal, en una nación occidental, los dos ácidos grasos que predominan en la leche humana son el palmítico (de 16 carbonos), y el ácido oleico (de 18 átomos de carbono). La leche del elefante y del conejo contiene una gran proporción de ácidos grasos de cadena media (C_8 y C_{10}) y en la leche de los ruminantes la proporción mayor es de ácidos grasos de cadena corta (C_4 y C_6) [128].

En una serie de experimentos en la cabra, Linzel y sus colaboradores mostraron que todos los ácidos grasos con cadena carbonada de 14 átomos o menos así como una porción de

los ácidos grasos de 16 átomos de carbono son sintetizados en la glándula mamaria mientras que cadenas mas grandes de ácidos grasos son obtenidos del plasma. Esta parece ser la regla en todas las especies donde ha sido estudiada. La dieta afecta la composición de los ácidos grasos de la leche humana en tres formas: 1) Con dietas con alto contenido en grasa, la relación de ácidos grasos saturados a insaturados refleja la misma relación de estos ácidos grasos en la dieta.

Por ejemplo, una dieta con aceite de maíz contiene una mayor proporción de ácidos grasos insaturados lo que produce un incremento en los ácidos grasos insaturados de la leche si se compara con una dieta alta en grasa animal. 2) Con dietas bajas en calorías, la composición de los ácidos grasos de la leche refleja la composición de los lípidos almacenados en el cuerpo, los cuales son movilizados para suministrar sustratos para la síntesis de triacilgliceroles en la glándula mamaria.

3) Con una dieta isocalórica, alta en carbohidratos y baja en grasa, la proporción de ácidos grasos de cadena media en la leche es mayor, reflejando un aumento en la síntesis de ácidos grasos dentro de la glándula mamaria y una disminución en el uso de grasa corporal o de la dieta como fuente de "triacilgliceroles" de la leche.

La alta proporción de ácidos grasos de cadena media en la leche de mujeres mal nutridas debe considerarse como parte de una adaptación normal a las dietas bajas en lípidos, mas que un síntoma de una dieta inadecuada [155,156].

Es interesante anotar que, con el reciente incremento en el uso de aceite vegetal y otras fuentes de ácidos grasos poliinsaturados en la dieta de los Estados Unidos, la proporción de ácidos grasos poliinsaturados en la leche parece haber incrementado de un 8% en 1959 a un 16% en 1977.

Se desconoce si esta alteración producirá algún efecto en la nutrición.

La síntesis de los ácidos grasos en la glándula mamaria.

Los ácidos grasos son sintetizados a partir de la acetil CoA por una serie de reacciones catalizadas por la acetil-CoA carboxilasa y la sintetasa de los ácidos grasos. Las reacciones requieren ATP y equivalentes reductores en la forma de NADPH. En esta parte se resumirán las vías que generan acetil CoA y NADPH y analizaremos la tioesterasa característica de la glándula mamaria, las cuales son responsables de la presencia de ácidos grasos de cadena media en la leche. Finalmente, se tratará brevemente la regulación de la síntesis de los ácidos grasos.

Las fuentes de Acetil-CoA para la síntesis de ácidos grasos.

En la mayoría de los no rumiantes, la fuente principal de átomos de carbono para la síntesis de Acetil-CoA es la glucosa, la cual es transformada a piruvato a través de la glicólisis o de la vía de las pentosas fosfato.

El piruvato entra a la mitocondria, probablemente en

recambio con el citrato y es transformado en acetil-CoA por el complejo de la piruvato deshidrogenasa. Debido a que la acetil-CoA no puede atravesar la membrana mitocondrial, entra al primer paso del ciclo del ácido tricarboxílico formando citrato el cual entra al citoplasma para ser mas tarde transformado por la ATP citrato liasa a acetil CoA. El lactato, la leucina y la alanina también pueden ser usados como fuentes de átomos de carbono [157].

En los rumiantes y en otras especies como en los conejos, donde las porciones del tracto gastrointestinal son muy grandes y permiten la fermentación bacteriana de los carbohidratos, el acetato es el sustrato predominante para la síntesis de los ácidos grasos, siendo activado a acetil-coA en el citosol de las células epiteliales mamarias.

La generación de NADPH.

La sintetasa de los ácidos grasos tiene un requerimiento absoluto por equivalentes reductores en la forma de NADPH. Las tres vías diferentes que generan al NADPH son: la vía del ácido 6 fosfogluconico, el ciclo de transhidrogenación del malato y la isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP+ en el tejido mamario de los roedores, las dos primeras vías parecen ser las mas importantes con la vía del fosfogluconato suministrando al menos la mitad de los equivalentes reductores necesarios para la síntesis de los ácidos grasos.

La vía del isocitrato muestra mayor actividad en aquellas especies, donde se usa el acetato como una fuente de

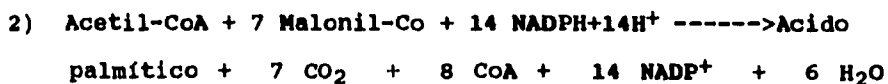
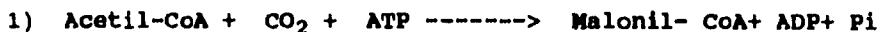
átomos de carbono para la síntesis de ácidos grasos [158].

El tiempo de paso del citrato a la leche, en la cabra, es similar al tiempo de paso de la lactosa, sugiriendo que estas sustancias son secretadas a través del aparato de Golgi. Una demostración reciente de que las membranas del Golgi son permeables a este anión apoya esta hipótesis. Los estudios realizados en cabras muestran que la concentración de citrato en la leche es inversamente proporcional a la velocidad de síntesis de ácidos grasos de la glándula mamaria, ya que el citrato es usado para proporcionar equivalentes reductores para la síntesis de ácidos grasos[159].

El significado de la relación inversa es que los niveles de citrato en el citosol son mas altos cuando el NADPH no se ha formado y esto se refleja en los niveles de citrato de la leche.

La síntesis de los ácidos grasos a partir de la Acetil-CoA.

Principalmente participan dos enzimas, la acetil-CoA carboxilasa (reacción 1) y la sintetasa de los ácidos grasos. (reacción 2).



La acetil CoA carboxilasa cataliza la formación de

malonil CoA de la acetil-CoA y como tal, realiza el primer paso comprometido en la síntesis de ácidos grasos. La sintetasa de los ácidos grasos involucra una secuencia de siete o más reacciones, las cuales en total adicionan dos carbonos, derivados de la malonil CoA, a una cadena de ácido graso. La reacción es iniciada por la unión de la acetil-CoA o de la butiril-CoA al complejo enzimático, seguida por la adición de malonil CoA [160].

La cadena permanece covalentemente unida a la enzima al final de cada ciclo y queda lista para la siguiente adición de dos unidades de carbono más de malonil-CoA. Cada ciclo requiere de dos moléculas de NADPH [161].

En el hígado y en el tejido adiposo, cuando los ácidos grasos alcanzan un tamaño de 16 carbonos o mayor, la síntesis es terminada por una desacilasa, la tioesterasa I. Esta parte integral del complejo de la sintetasa de los ácidos grasos termina la síntesis por la liberación de la molécula de la enzima. El citosol de las células epiteliales mamarias de la rata, el ratón y el conejo es único en contener una aciltioester hidrolasa, para cadena intermedia (la Tioesterasa II) la cual termina la síntesis de los ácidos grasos después de la adición de 8 a 14 carbonos. Las sintetetasas de los ácidos grasos de los rumiantes así como las de los conejos y los cobayos también sintetizan ácidos grasos de cadena corta, como el butirato y el hexanoato [162].

La regulación de la síntesis de ácidos grasos.

Debido a que la síntesis de ácidos grasos es cara energéticamente, no es una sorpresa que esté sujeta a varios tipos de regulación. Adaptaciones de largo plazo involucran la modulación de la cantidad de enzimas presentes en la célula.

Cerca del parto, por ejemplo, la cantidad de las enzimas clave como la piruvato deshidrogenasa, la ATP citrato liasa, la acetil CoA carboxilasa y la sintetasa de los ácidos grasos incrementan varias veces para cubrir las demandas lipogénicas de la formación de la leche.

Los estudios de la sintetasa de los ácidos grasos en explantes en cultivo mostraron que la combinación de prolactina, cortisol e insulina no solo incrementan la velocidad de síntesis de la enzima sino que también disminuyen la velocidad de su degradación, sugiriendo un mecanismo de control múltiple tanto para la síntesis de las proteínas como para la degradación [163].

Las diferentes enzimas involucradas en la síntesis de los ácidos grasos en la glándula mamaria parecen ser reguladas independientemente. Por ejemplo, el nivel de la tioesterasa II se incrementa dramáticamente durante la gestación en la rata, pero alcanza su máximo antes del parto, mientras que los niveles de la sintetasa de los ácidos grasos empiezan a incrementarse solo después del parto. Entender la diferencia entre los mecanismos que regulan los niveles de

estas dos enzimas permitiría adentrarse en los mecanismos moleculares por los cuales las hormonas regulan la síntesis de proteínas durante la diferenciación mamaria.

La síntesis de lípidos en la glándula mamaria decrece rápidamente por el ayuno, así como por cambios en los niveles plasmáticos de prolactina e insulina. La regulación a corto plazo depende probablemente de la modulación tanto de efectos alostéricos como de ciclos de fosforilación y desfosforilación.

La piruvato deshidrogenasa y la acetil CoA carboxilasa han recibido atención considerable como posibles sitios para tal regulación. Ambas son inactivadas por la fosforilación y en el caso de la piruvato deshidrogenasa, la disminución en la actividad observada después de 24 horas de ayuno en las ratas, muestran una buena correlación con los niveles de fosforilación de la enzima. El papel de los reguladores alostéricos y la disponibilidad de los sustratos en estas adaptaciones rápidas deben ser críticamente valoradas en el futuro [164,165].

La lipoproteína lipasa y la extracción de lípidos del plasma.

Los triacilgliceroles plasmáticos son la fuente de casi el 80% de los lípidos de la leche humana. Los mecanismos por los cuales los ácidos grasos y el glicerol que componen a los triacilgliceroles son extraídos del plasma, han sido ampliamente estudiados por Scow y colaboradores [166,167].

Los lípidos son transportados a través del flujo sanguíneo principalmente en la forma de quilomicrones, partículas esféricas de 0.5 μm de diámetro que contienen cerca de un 92% de triacilgliceroles y cantidades menores de esteres del colesterol, fosfolípidos y colesterol asociado con lipoproteínas. Después de que los quilomicrones se unen a una enzima de las células del endotelio capilar, la lipoproteína lipasa, la cual está localizada en la superficie del endotelio vascular, hidroliza los ácidos grasos de las posiciones 1 y 3 de los tri, di y monoacilgliceroles. Los ácidos grasos libres pueden entrar al torrente sanguíneo o bien difundir por el espacio subendotelial en las células mamarias. El diacilglicerol es hidrolizado a 2 monoacilgliceroles y un ácido graso libre.

Ambos entran en el espacio subendotelial y son tomados por los lactocitos donde son utilizados para la síntesis posterior de los triacilgliceroles.

La lipoproteína lipasa está presente, en grandes cantidades, en las glándulas mamarias de las ratas lactantes; su actividad disminuye rápidamente con un destete forzado o con la hipofisectomía. La actividad puede ser restablecida en las ratas hipofisectomizadas si se les inyecta prolactina, mostrando que la enzima está bajo control hormonal. Parece existir una relación recíproca entre la actividad de la lipoproteína lipasa de la glándula mamaria y la del tejido adiposo en ratas lactando, de manera que el tejido adiposo

pierde mucho de su capacidad de consumir lípidos del plasma durante la lactancia [168].

Síntesis de triacilgliceroles.

Los precursores mas importantes para la síntesis de los triacilgliceroles son el glicerol 3-fosfato, los monogliceroles y la acil-CoA. El glicerol 3 fosfato se origina en la glucólisis por la reducción de la dihidroxiacetona fosfato o por la fosforilación del glicerol.

El primer paso en la formación de los triacilgliceroles es la acilación de los grupos hidróxilo libres en el glicerol-3-fosfato con dos moléculas de acil-CoA. El ácido fosfatídico resultante es después desfosforilado para dar un diacilglicerol. El diacilglicerol se combina después con una tercera molécula de acil-CoA para dar el triacilglicerol. Los monogliceroles se originan de la hidrólisis parcial de los triacilgliceroles y pueden ser acilados directamente sin la formación de ácido fosfatídico.

La secreción de colesterol en la leche.

El tejido mamario tiene la capacidad para la síntesis *de novo* del colesterol, sin embargo, se desconoce que proporción del colesterol lácteo se origina *de novo* y que proporción deriva del plasma. Long y colaboradores concluyeron que solo un 20% del colesterol de la leche en la cabra, fue sintetizado en la glándula, el resto se deriva del plasma. Por otro lado, experimentos en ratas, sugieren que el

colesterol de la leche es principalmente sintetizado en la glándula mamaria de estas especies [169].

El contenido de colesterol de la leche humana muestra una gran variación y se desconoce si su origen es plasmático o proviene de la dieta. En la rata, tanto el colesterol del plasma como el de la leche se incrementan con dietas altas en colesterol, en cambio en estas mismas condiciones el contenido de colesterol de la leche humana es relativamente constante. Mellies y colaboradores informaron del caso de una mujer con hipercolesterolemia familiar homocigota en donde se observó un incremento en el contenido de colesterol de la leche de 16 veces. Los autores sugieren que esto puede explicarse por un aumento en la extracción del colesterol plasmático o bien por la ausencia de mecanismos que regulen la síntesis del colesterol en la glándula. Obviamente se requiere determinar el colesterol de la leche bajo una variedad de condiciones antes de sugerir algunas conclusiones sobre la regulación de los niveles del colesterol en la leche[170].

Fosfolípidos.

Una proporción importante de los fosfolípidos de la leche se localizan en la membrana de los glóbulos de grasa de la leche y parecen originarse de la síntesis de novo en la glándula mamaria [171].

Lipasas de la leche.

La leche humana contiene cantidades substanciales de una

lipasa, que es inactiva en la leche fresca pero que es activada por las sales biliares. Hernell y colaboradores han mostrado que una lipasa activada por sales biliares, localizada solo en la leche del humano y del gorila, es responsable de esa actividad. Esta lipasa, con un peso molecular de 90,000 daltones constituye cerca de 1% de la proteína de la leche humana [172].

Tanto su peso molecular como su inhibición por el diisopropil fosfofluorato identifican a esta enzima como una lipasa distinta de la lipasa pancreática y de la lipoproteína lipasa.

Se ha sugerido que la lipasa activada por sales biliares tiene una participación importante en la digestión de lípidos en el neonato ya que su actividad es suficientemente elevada en presencia de las sales biliares lo que permite producir en 30 minutos la hidrólisis total de los lípidos de la leche a ácidos grasos libres y glicerol [173]. Se piensa que la activación de esta enzima ocurre en el duodeno en interacción con las sales biliares que también dan a la enzima resistencia a las proteasas intestinales. La enzima es inactivada por la pasteurización.

La lipoproteína lipasa (LPL) está también presente en la leche humana a concentraciones variables. Esta enzima puede ser distinguida de la lipasa activada por las sales biliares ya que la LPL es estimulada por el suero e inhibida por el NaCl y la protamina. Se ha descrito, recientemente y en gran

concentración una lipasa que no es estimulada por las sales biliares, en la leche de cinco mujeres cuyos hijos muestran ictericia por la leche del pecho [174]. Los autores han sugerido que los ácidos grasos liberados por esta enzima en el estómago del neonato inhiben el metabolismo de la bilirrubina en el intestino del infante.

Conclusiones.

Las vías metabólicas involucradas en la síntesis de lípidos son bien conocidas y han sido resumidas previamente. Tanto la regulación a corto y largo plazo de la síntesis de lípidos de la leche son de interés general, el primero debido a que parecen participar ciclos de fosforilación y desfosforilación y el segundo debido a que la regulación de la síntesis de proteína es un tópico de gran interés. Ya que el contenido de lípidos y la composición de la leche son afectados por la dieta, la dilucidación de los mecanismos de control involucrados puede ser de gran valor práctico para desarrollar dietas óptimas para las mujeres lactantes. Otro aspecto importante es la participación de la secreción y la digestión de los lípidos en la regulación de las lipasas, tanto para llevar ácidos grasos a la célula mamaria como en la digestión de lípidos por el infante.

La secreción de iones monovalentes y agua en la leche.

Aunque la leche es iso-osmótica con el plasma, la transferencia de agua del plasma a la luz de los alveolos es

directamente proporcional a la transferencia de soluto.

Se ha discutido previamente que la secreción de la lactosa constituye $2/3$ de la osmolaridad de la leche humana y constituye la mayor proporción del agua transferida hacia la secreción mamaria. Un $1/6$ de la osmolaridad es proporcionada por los iones monovalentes (cuya secreción discutiremos enseguida) y el resto por las proteínas y otras sustancias osmóticamente activas tales como el citrato, el magnesio, la glucosa y otras.

Transporte transcelular de los iones.

Los experimentos, realizados principalmente en cabras, han mostrado que disacáridos tales como la sacarosa y la lactosa así como los iones divalentes calcio y fosfato, no se mueven libremente entre los espacios plasmáticos [165].

Estas observaciones ofrecen fuerte evidencia de que durante la lactancia máxima, la formación de la leche es un proceso transcelular. Como tal es probable que la secreción de los iones monovalentes hacia la leche esté mediada por las células epiteliales. Las mediciones cuidadosas del sodio, el potasio y las concentraciones de cloruro en la glándula mamaria del cuyo y de otras especies, muestran que, como en la mayoría de las células, las células mamarias tienen un alto contenido intracelular de potasio y concentraciones bajas de sodio y cloruro. Aunque el contenido de sodio de los lactocitos parece ser mas alto que en la mayoría de las células, la concentración de cationes monovalentes parece ser

controlada por la ATPasa Na/K probablemente localizada en la membrana basolateral de las células alveolares mamarias[175].

Debido a que la concentración de los iones en las células alveolares es diferente a la de la leche, la secreción de iones a la leche es controlada probablemente por procesos que ocurren en la membrana apical de las células alveolares y en las membranas del Golgi.

La comprensión de estos procesos descansa, en inferencias obtenidas de mediciones indirectas. Por ejemplo, se puede suponer que la membrana apical es permeable a los iones monovalentes debido a que isótopos de esos iones, difunden al pezón en la cabra y desaparecen mas tarde en la leche.

Que esos iones pueden cruzar pasivamente la membrana ha sido inferido de las observaciones de que cuando soluciones isotónicas de carbohidratos son infundidas en el pezón de las cabras, los iones difunden en favor del gradiente de concentración hacia el espacio de la leche.

Debido a que el movimiento de estos iones parece ser mas rápido que su secreción durante la formación de la leche, es probable que se logre un equilibrio a través de la membrana apical. Finalmente, se ha medido en la cabra y el ratón, potencial electronegativo de -15 a 40 mV entre el espacio de la leche y la sangre, sugiriendo que el potencial eléctrico a través de las membranas apical y basolateral de las células alveolares mamarias son diferentes.

Estos resultados han sugerido una marcada diferencia en la permeabilidad y/o los procesos de bombeo electrogénico en las dos membranas.

Peaker ha presentado un modelo el cual sugiere que las concentraciones iónicas de la leche se logran de la siguiente manera: como la lactosa es sintetizada y secretada, el agua es drenada a las vesículas de Golgi y a la luz alveolar para mantener la isotonicidad. El sodio, el potasio y el cloruro tienden a disminuir su gradiente de concentración, sin embargo, el movimiento iónico es limitado [105].

En el caso de los cationes, el potencial eléctrico apical se opone al flujo hacia el espacio de la leche de manera que el equilibrio es logrado al disminuir concentraciones del sodio y el potasio en la célula. Una bomba de cloruro en la membrana apical regresa el cloruro de los alveolos hacia la célula, manteniendo baja la concentración de cloruro en la leche.

Este modelo predice que la proporción del sodio y el potasio en la leche es igual a su relación en el citoplasma de las células alveolares mamarias, una predicción que parece realizarse en varias especies [102,105].

Otra prueba de esta hipótesis necesitó el desarrollo de modelos en los cuales la membrana apical pudiera ser sujeta a observaciones mas directas. Un modelo que promete ser útil es el cultivo de monocapas de células mamarias en geles flotantes de colágeno. Bisbee ha sido capaz de realizar

mediciones eléctricas en esos sistemas, y ha obtenido potenciales entre -10 y -25 mV en el lado negativo apical, los cuales se modifican con la prolactina [176].

Sin embargo, estos cultivos no secretan lactosa y por lo tanto es difícil relacionar las mediciones de Bisbee con los mecanismos fisiológicos de la secreción de iones en la leche[176]. Wicha y sus colaboradores han desarrollado un cultivo para el tejido mamario en el cual se logra un alto grado de función, incluyendo la síntesis de lactosa, lo cual se logra cultivando los alveolos mamaros en una matriz extracelular derivada de la misma glándula mamaria. Este logro puede representar un gran adelanto para estudiar el transporte transepitelial en un modelo funcional *in vivo*.

El transporte paracelular de los iones.

La composición iónica del calostro humano es diferente de la leche madura, el calostro contiene de 50 a 60 mM de sodio y cloruro mientras que la leche madura contiene solo 6 mM de sodio y 12 mM de cloruro. Las concentraciones de estos dos iones están inversamente relacionadas con la concentración de lactosa.

Varias evidencias sugieren que la vía de transporte paracelular es la responsable del alto contenido de sodio y de cloruro en el calostro:

1) En las cabras, la transferencia de disacáridos entre la leche y la sangre puede ser medida durante el embarazo pero no durante la lactancia.

2) No se encontraron diferencias en el potencial eléctrico entre la sangre y el espacio de la leche durante el embarazo en la cabra.

3) En el período postparto temprano existe una correlación positiva entre la velocidad de entrada del potasio y de la lactosa a la secreción mamaria.

Peaker ha mostrado que esa correlación positiva es esperada cuando las uniones herméticas están abiertas [177]. Después en la lactancia, cuando las uniones se cierran, se observa una correlación negativa.

4) Durante la lactancia temprana, se encontró en el plasma de las mujeres altas concentraciones de una proteína específica de la leche, la α -lactalbúmina, sugiriendo que la proteína pasa del espacio de la leche a la sangre por la vía paracelular.

La concentración de α -lactalbúmina en el plasma cae entre los días 3 y 10 de la lactancia, cuando la composición de la leche toma las características de la verdadera: esta observación es consistente con el cierre de la uniones en este tiempo.

5) Estudios al microscopio electrónico con la técnica de la criofractura de los complejos de las uniones intercelulares entre las células alveolares mamarias están de acuerdo con las uniones intercelulares debilitadas durante el embarazo y las uniones herméticas durante la lactancia.

Así, quedan bien establecidas las regiones de "escape"

entre las células durante el embarazo y los primeros pocos días del puerperio.

Los mecanismos por los cuales la permeabilidad de la vía paracelular es controlada están empezando a ser explorados.

Ha sido observado en ovejas y cabras que una ordeña antes del parto trae como consecuencia un cambio en la composición de la secreción mamaria parecida a la leche verdadera. Ya que el ambiente hormonal de la glándula mamaria no cambia por este proceso, la observación sugiere que algún factor en la secreción mamaria secuestrado dentro de la luz alveolar mantiene los espacios en las uniones durante el embarazo. Este factor puede acumularse durante las infecciones de la mama y cuando la leche no es removida del seno por un tiempo largo se produce el regreso a una secreción parecida al calostro.

La naturaleza de este factor es desconocida, puede ser de naturaleza física, por ejemplo, el aplanamiento de las células epiteliales por productos de secreción atrapados o bien puede ser químico.

Maule Walker encontró que la infusión de una prostaglandina estable en la ubre de una cabra parturienta evita el cierre de las uniones complejas y sugiere que la función de grandes cantidades de $PGF_{2\alpha}$ secretadas en la glándula mamaria pueden regular las uniones complejas[95,177].

Neville y Peaker encontraron que la infusión de quelatos

de calcio en la ubre de cabras lactando trae como consecuencia un rápido incremento en la permeabilidad de la vía paracelular, aumentando la posibilidad de que el calcio tenga también una función de regulación [178,179].

Aunque algunos estudios *in vivo* ofrecen alguna idea, es claro que se requieren estudios *in vitro* para aclarar los mecanismos involucrados en la regulación de la permeabilidad de las uniones complejas.

Conclusiones.

Los mecanismos que mantienen la composición iónica de las secreciones de la glándula mamaria presentan un sinnúmero de interesantes desafíos.

Sin embargo, el material experimental disponible, hasta muy recientemente, no permite el tipo de experimentos requeridos para la investigación directa de las propiedades de la membrana apical. Si se dispusiera de un cultivo de tejido mamario con capacidad para secretar leche logrado sobre un gel de colágeno, el empleo de técnicas clásicas nos permitiría obtener nuevas ideas. Por otro lado, técnicas más sofisticadas empleando microelectrodos aplicadas *in vivo* a las glándulas de especies que contienen pequeñas cantidades de tejido conectivo, como en el ratón, permitirá estudios más precisos. Es obvio que se requieren técnicas más avanzadas para obtener progresos importantes en esta área.

La secreción de elementos traza en la leche.

El contenido de elementos traza en la leche está bien balanceado si se compara con otros alimentos, haciendo a la leche una fuente de alta calidad de estos nutrientes. Aunque el contenido de minerales de la leche ha sido medido repetidamente, poca atención ha sido dada a los mecanismos celulares involucrados en su secreción. La mayoría de las investigaciones han sido dirigidas a aquellos elementos de los cuales se han observado deficiencias en los infantes alimentados con el pecho o en infantes alimentados por largos períodos con fórmulas lácteas, por ejemplo, el hierro, el cobre y el zinc. El yodo también ha sido estudiado debido a que el contenido de yodo en la leche puede ser excesivo si se consumen dietas con alto contenido en él.

Hierro.

El contenido de hierro de la leche humana es bajo en relación a los requerimientos nutricionales y en los neonatos se cree que es obtenido de las reservas presentes al nacimiento [180].

El hierro que está presente en la leche humana está fuertemente unido a la proteína lactoferrina. La unión a otras proteínas tales como la caseína y la transferrina pueden ser cuantitativamente más importantes en algunas especies. La alta afinidad para el hierro y la relativa insaturación de la lactoferrina significa que en la leche se encontrarán concentraciones muy bajas de hierro libre.

Aunque la lactoferrina parece ser sintetizada en las

células alveolares, los mecanismos de transferencia del hierro de las proteínas del suero a las proteínas de la leche no han sido investigados.

Zinc

El zinc es el mas abundante de los elementos traza en la leche, haciéndola una fuente dietaria excelente. Sin embargo, el contenido de zinc del calostro humano es 8 veces mayor que el de la leche madura. La posibilidad de que se presente una deficiencia de zinc en los infantes prematuros fue sugerida por Dauncey quien encontró que los infantes alimentados con leche de seno humano mostraron un balance negativo hasta el decimosexto día de vida [181].

El estudio del contenido de zinc de la leche fue estimulado por una rara enfermedad genética la acrodermatitis enteropática en la cual la deficiencia resulta de la incapacidad de los infantes a absorber el zinc de la leche de vacas. Los síntomas pueden ser aliviados por una dieta suplementada con sulfato de zinc o leche humana. Un ligando unido al zinc de bajo peso molecular, encontrado en la leche humana, parece incrementar la biodisponibilidad del zinc por mimificar la actividad de un factor normalmente secretado en el intestino, pero que está ausente en infantes prematuros y en pacientes con acrodermatitis enteropática. La naturaleza de este ligando ha sido sujeto de controversia.

Cousins y Smith propusieron que el zinc de la leche está preferentemente unido a proteínas de alto peso molecular que

se saturan a los niveles de zinc presentes en la leche. El exceso de zinc se une con muy baja afinidad a varias sustancias de bajo peso molecular. Ya que el contenido total de zinc de la leche humana es similar al de la leche de bovino, la diferencia en la biodisponibilidad del zinc puede resultar de que el zinc unido a la caseína bovina puede estar menos disponible para su absorción [182].

Ha sido reportado un síndrome similar a la acrodermatitis en 2 infantes alimentados al pecho cuyas madres secretaron bajas cantidades de zinc en la leche [183]. En esas madres la concentración de zinc de la leche no se incrementó como respuesta a una dieta alta en zinc, como había sido observado en animales, aunque el alto consumo de zinc dió como resultado un incremento en el zinc del suero. Las diferencias en el sistema de transporte de zinc en las glándulas de esas madres sugiere la existencia de un sistema de transporte específico para el zinc en la glándula mamaria. El transporte activo del zinc de la sangre a la leche es también sugerido cuando se compara en los dos fluidos la concentración ultrafiltrable. Aunque los niveles de zinc en el suero y la leche humanos son similares a los 4 meses de lactancia, (84 ± 13 y 80 ± 10 g/dl respectivamente) solo el 2% del zinc del plasma es ultrafiltrable mientras que mas del 12% del zinc de la leche está en esta forma. Sin embargo, el mecanismo de transporte a través del epitelio mamario no ha sido estudiado.

Yodo.

Se han efectuado estudios de la secreción de yodo en la leche de animales que se han alimentado con pasto contaminado por lluvia radiactiva, así como el exceso de yodo en la leche de animales que están bajo tratamiento por alguna enfermedad. La acumulación activa de yodo en la leche es evidente por su concentración. La proporción del yodo entre la leche y el plasma varía desde 1.8% en las vacas hasta 39% en las ovejas.

En el hombre y en los animales de laboratorio, la concentración de yodo en la leche es 20 a 30 veces mas alta que en el plasma. En el plasma el 58% del yodo está unido a proteínas, mientras que en la leche de vaca solo el 13 % está unido a proteínas [184].

El transporte de yodo en la leche es inhibido por aniones los cuales inhiben la bomba de yodo en la tiroides, como son el perclorato, el fluoroborato y la tiourea. La acumulación de yodo en la leche no depende de la continua secreción de la leche, tal como se mostró en un experimento, donde la mitad de la ubre de vacas no fue ordeñada por 24 horas, interrumpiendo la secreción de la leche, ya que 8 horas después de la inyección intravenosa de una dosis de yodo 131 el yodo total e intercambiado en la leche del lado no ordeñado, fue mayor que en el lado secretante. Esto sugiere que exista en la membrana basolateral una bomba de yoduro, semejante a la presente en la tiroides, que bombea el ion contra un gradiente de concentración [185].

El yodo podría entrar a la leche por una transferencia directa a través de la membrana apical.

Algunos trabajos *in vitro* indican que el yodo se une a la tirosina en la proteína de la leche contenida en la ubre debido a la oxidación enzimática del yoduro.

Algunas drogas del tipo del tiouracilo, las cuales bloquean la yodinación de la tirosina, no evitan que se establezcan y mantengan altas proporciones de yodo en la leche con respecto a la del plasma, proporcionando la evidencia de que la yodinación de la tirosina no es importante en la secreción de la leche.

Selenio.

El selenio que normalmente está presente en la leche, se encuentra unido principalmente a la caseína o a otras proteínas, sin embargo, se desconoce en que forma química se encuentra.

El selenio puede ser adicionado a las proteínas de la leche durante su síntesis y procesamiento o puede ser transportado a través de las células alveolares mamarias con la posterior adición a las proteínas preformadas. Las proteínas de la leche se unirían a formas reducidas del selenio (hidruro de selenio) las cuales probablemente son similares al estado de oxidación del selenio del plasma. El anión selenito, un componente más oxidado del selenio no se une a la leche bajo condiciones fisiológicas de temperatura y pH.

Si se observa con el tiempo su secreción después de una dosis intravenosa de selenito "marcado" ésta es consistente con la hipótesis de que el hígado limpia rápidamente el selenito de la sangre, lo reduce, y lo resecretora en una forma que es tomada por la glándula mamaria y lo une a la proteína de la leche en el aparato de Golgi y en las vesículas secretoras.

Mucho del selenio en los vegetales está en la forma de análogos de los aminoácidos azufrados, la selenocisteína y la selenometionina. Aunque la glándula mamaria podría utilizar estos compuestos de manera similar a la cisteína y a la metionina, el bajo contenido y su distribución desigual en las proteínas de la leche, hace poco probable que los selenoamino ácidos sean los principales componentes del selenio en la leche [186,187].

Azufre

El azufre puede ser transportado principalmente en la forma de aminoácido, aunque existen otros compuestos del azufre de importancia en la leche. El dimetil sulfuro, un catabolito de los aminoácidos azufrados en algunos organismos, es transferido a la leche y es el responsable del sabor agrio de la leche de bovino [188].

Cobalto.

La única función biológica conocida del cobalto en los mamíferos es como el centro catabólico de las coenzimas de la vitamina B₁₂.

El transporte de vitamina B₁₂ en la leche parece estar controlado por una proteína de unión específica, la cual se acumula en la glándula mamaria antes de la lactogénesis, se presenta en altas concentraciones en el calostro y disminuye durante la lactancia tardía. Este patrón corre paralelo a la concentración de la vitamina B₁₂ en la leche [189].

Conclusión.

Se ha mostrado, durante la lactancia (o entre el calostro y la leche verdadera) una disminución en la concentración del zinc, el cobre, el manganeso y otros elementos traza, sugiriendo que una proteína de unión específica o no específica, puede ser importante en los mecanismos de transporte de muchos de estos elementos traza en la leche. Aún aquellos elementos, que se localizan asociados con la grasa de la leche (hierro, cobre y el molibdeno) son probables componentes de proteínas en las membranas de los glóbulos de la grasa de la leche. Los minerales en la fase acuosa de la leche están en equilibrio con las formas unidas a las proteínas y otros ligandos pequeños. Así, con la posible excepción del zinc y del yodo, el mecanismo primario de transporte de los minerales traza hacia la leche, probablemente sea por su unión a proteínas acarreadoras específicas o no específicas. Considerando la importancia de los minerales en la calidad nutricional de la leche, se requiere mucho trabajo que intente aclarar los mecanismos de transporte en las diferentes membranas del

lactocito.

La secreción de la leche, preguntas para el futuro.

Los eventos bioquímicos responsables de la síntesis y la secreción de muchos de los componentes mas importantes de la leche han sido firmemente establecidos durante la década pasada.

Así, las enzimas y las vías bioquímicas involucradas en la síntesis de las proteínas, los lípidos y la lactosa de la leche son bien conocidas.

Las áreas de interés actual son el control genético de la síntesis de la leche, la definición de los mecanismos moleculares por los cuales las hormonas y otros agentes reguladores ejercen su control y los mecanismos por los cuales muchos de los productos sintetizados son transferidos desde un compartimento intracelular a otro. Actualmente se dispone de técnicas para resolver la mayoría de estos problemas de manera que se espera un progreso sustancial en la próxima década.

Para los constituyentes minerales de la leche, la situación es menos clara. Sin un sistema experimental que permita el acceso directo a la membrana apical de las células alveolares, ha sido difícil aproximarse a los mecanismos de secreción de los iones monovalentes. Se conoce algo mas del calcio y el fosfato, pero de nuevo las aproximaciones han sido indirectas. Por otro lado, se desconoce casi todo de los mecanismos de secreción del magnesio y del bicarbonato. Los

avances en esta área dependen del desarrollo de nuevos modelos experimentales.

Finalmente, cuando uno considera los constituyentes menores de la leche, los elementos traza, las vitaminas, las hormonas y los cofactores, se hace evidente la carencia de datos reales de composición, aunque todas estas sustancias son de gran importancia nutricional. De primera importancia en esta área es el estudio longitudinal bien orientado de los componentes menores durante el curso de la lactancia humana. Es importante también determinar los mecanismos, por los cuales estas sustancias son secretadas en la leche.

Las consecuencias prácticas de esos logros serán enormes: Será posible determinar y posiblemente resolver las deficiencias específicas de los componentes menores de la leche. Sin embargo, podrán identificarse los mecanismos por los cuales las drogas y los contaminantes ambientales entran a la leche, permitiendo un estudio racional de la terapia en mujeres que amamantan.

CAPITULO V

Bioenergética.

En 1861 Pasteur publicó el descubrimiento histórico de que por gramo de glucosa mas levadura es formada en presencia de aire que en su ausencia. Fue la primera demostración de que el metabolismo aeróbico es mas eficiente que el metabolismo anaeróbico. Además, Pasteur también observó que en presencia de aire, la glucosa desaparece mas lentamente que en condiciones anaeróbicas, lo cual muestra que existe un mecanismo de control que mas tarde fue llamado el "efecto Pasteur"[190].

En 1938, cuando Burk resumió las docenas de hipótesis que habían sido propuestas para explicar el efecto Pasteur, fue aparente que ninguna de ellas tenía algún sentido.

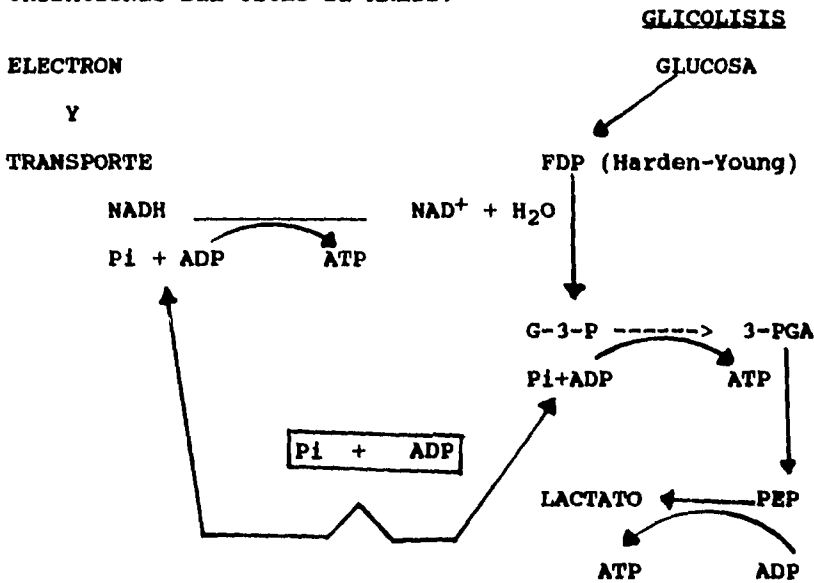
Por ejemplo, varias de las hipótesis daban un papel regulador para el oxígeno. Esta posibilidad fue descartada por la observación de Burk de que el 2,4 dinitrofenol, aún en presencia de oxígeno, libera la inhibición de la utilización de la glucosa [191]. Sin embargo, el modo de acción del dinitrofenol fue un misterio hasta 1938 y poca atención fue puesta a esta observación. La primera contribución significativa a nuestro conocimiento del efecto Pasteur fue hecha en 1941, independientemente por Lynen en Alemania y Johnson en los Estados Unidos, quienes propusieron un papel clave para el fosfato inorgánico (Pi). Harden mostró que el Pi era utilizado para la fermentación y Warburg mostró que la oxidación del gliceraldehído 3 fosfato requiere Pi, acoplado

el proceso de la glicólisis a la formación del ATP.

Lynen y Johnson propusieron que el efecto Pasteur es la consecuencia de una competencia por el Pi entre la glicólisis y las oxidaciones aeróbicas [192]. Mas tarde el ADP fue también incluido en la hipótesis de la competencia como se muestra en la siguiente figura:

MITOCONDRIA.

OXIDACIONES DEL CICLO DE KREBS.



Pi= Fosfato inorgánico

FDP= Fructosa-1,6-difosfato

G-3-P= Gliceraldehído 3-fosfato

3PGA= 3-fosfoglicerato

PEP=fosfoenolpiruvato

Por razones fisiológicas, esta explicación del efecto Pasteur fue aceptada a pesar de que era inadecuada. En 1941, los bioquímicos midieron la glicólisis por la desaparición de glucosa ya que Warburg introdujo nuevos métodos manométricos que permitieron medir la formación de ácido láctico y otros productos finales de las fermentaciones.

Tiene perfecto sentido que sin el fosfato inorgánico la producción de ácido láctico o de dióxido de carbono cesaría.

Harden-Young hicieron experimentos con extractos de levadura, en los cuales no se observó un verdadero efecto Pasteur, debido a que la glucosa fue rápidamente convertida a fructosa 1,6 difosfato.

Más tarde se propuso la existencia de "inhibidores específicos del efecto Pasteur" que controlan la utilización de la glucosa. La glucosa-6-fosfato un conocido inhibidor de la actividad de la hexocinasa, fue propuesta en 1954 como el primer candidato para tal función, el segundo candidato fue el mismo ATP, el cual a altas concentraciones mostró inhibir la actividad de la fosfofructocinasa. Sin embargo, se observó que el fosfato inorgánico neutraliza la inhibición de la glucosa 6 fosfato de la hexocinasa. Esto explicó la curiosa observación de que el fosfato inorgánico estimuló la utilización de la glucosa [193].

El efecto Pasteur representa una cascada de mecanismos de control. Primero existe una limitación en la disponibilidad del Pi y el ADP produciéndose una competencia

entre la mitocondria y la glicólisis. Así, el ATP es formado en exceso y el Pi llega casi a desaparecer. Ambos eventos limitan la actividad de la fosfofructocinasa, ya sea directamente o a través de la formación de inhibidores secundarios del efecto Pasteur como son el citrato, o el fosfoenolpiruvato y resultando en la acumulación de la glucosa 6-fosfato produciendo con ello la inhibición de la hexocinasa.

La fosforilación a nivel del sustrato.

Warburg y sus colaboradores mostraron que la oxidación del aldehído por la deshidrogenasa del gliceraldehído-3-fosfato requiere la presencia del Pi. El producto de la reacción es el 1,3-difosfoglicerato, el cual dona el grupo fosforilo al ADP en presencia de la cinasa del 3-fosfoglicerato. El propuso que el gliceraldehído 3-fosfato interactúa con el Pi para formar un aducto químico, un fosfoaldehído intermedio que es oxidado directamente por la enzima del fosfoanhidrido [194].

Reconstitución de la glicólisis y la función de la ATP asa.

Entre los años 1940 y 1950, en los laboratorios de Warburg, Meyerhof y Cori, las enzimas individuales de la glicólisis fueron aisladas (la mayoría de ellas en forma cristalina) y sus modos de acción fueron investigados extensamente. La primera observación de estos experimentos fue que la glicólisis no puede ser mantenida en un estado

estacionario sin la adición de una cantidad adecuada de ATPasa, un hecho apoyado por los experimentos de Meyerhof, realizados con extractos crudos de levadura. En una segunda observación se encontró que la producción del ácido láctico fue inhibida en presencia de mitocondrias que consumían el Pi y el ADP, pero la fosforilación de la glucosa no fue inhibida[195].

La reconstitución de un verdadero efecto Pasteur, por ejemplo, la inhibición de la utilización de la glucosa, fue lograda varios años mas tarde usando la hexocinasa de los mamíferos en vez de la hexocinasa de levadura junto con cantidades limitadas de fosfofructocinasa.

Aunque podemos decir que las reacciones biosintéticas en muchas células de mamíferos juegan una función menor en el presupuesto energético y los procesos de transporte de iones son los mas importantes consumidores de ATP, aún se tiene poca información acerca de la distribución del gasto energético celular [196,197].

La historia de la fosforilación oxidativa.

Los principales descubrimientos de los componentes de la cadena respiratoria fueron hechos por Otto Warburg y David Keilin [198]. Mientras que Keilin en 1925 describió el abc del sistema de los citocromos, Warburg en 1930 aisló las deshidrogenasas, las flavoproteínas e identificó sus coenzimas. La historia de la fosforilación oxidativa empezó en 1930 con los estudios de Engelhardt en Rusia quien

reconoció que los eritrocitos nucleados catalizan un proceso aeróbico ligado a la fosforilación. Pero no fue hasta que Herman Kalckar publicó sus importantes descubrimientos, realizados con preparaciones de células de riñón, que el proceso de transporte de electrones ligado a la formación de ATP y a la fosforilación glicolítica estuvieron físicamente separados [199]. En la siguiente década se hicieron importantes avances en las evaluaciones cuantitativas.

En 1941, dos importantes análisis, realizado uno por Fritz Lipmann y el otro por Herman Kalckar introdujeron consideraciones termodinámicas y el concepto mal interpretado de los "intermediarios de alta energía". Estas publicaciones influyeron el campo de la Bioenergética por toda la década [200,201].

Belitser y Tsibakova así como Severo Ochoa hicieron las primeras mediciones cuantitativas y establecieron que la relación P:O es mayor que la unidad. Ochoa reconoció que la ATPasa interfería en sus preparaciones, con las determinaciones exactas de la formación de ATP y en un elegante experimento, él usó un sistema glicolítico de control interno corrigiendo la actividad de la ATPasa.

Ochoa concluyó que para la oxidación del piruvato a CO_2 y H_2O el cociente de P:O es igual a 3. Estos experimentos han tenido dos importantes consecuencias: primero, ellos plantearon ciertos problemas termodinámicos y estimularon los estudios de la regulación de la energía libre de la

hidrólisis del ATP que un poco después cae de un valor de 12,000 kcal a casi 8,000 kcal, y segundo ellos propusieron un paso de oxidación del NADH y promovieron ensayos para localizar los tres sitios de la fosforilación oxidativa[202,203].

La observación directa de que el NADH es el verdadero sustrato de la fosforilación oxidativa fue apoyada por Lehninger y sus colaboradores. Ellos mostraron que la mitocondria es el centro de la fosforilación oxidativa, introdujeron un ensayo sensible utilizando P^{32} , y demostraron que el paso de la oxidación del ácido ascórbico al citocromo c está ligado a la formación de ATP [204]. Los estudios realizados por Chance, Green, Hunter, Lardy y Lehninger localizaron los tres sitios de la fosforilación oxidativa[205,206,207].

La oxidación del NADH a citocromo c representa el sitio I, del citocromo b al citocromo c es el sitio II, del citocromo c al oxígeno es el sitio III.

Basados en el descubrimiento del control respiratorio, Chance y Williams desarrollaron un método polarimétrico de medición de la fosforilación oxidativa y definieron las ahora clásicas etapas de la cadena respiratoria. Durante esa década, se obtienen contribuciones importantes de los laboratorios de David Green, quien fue uno de los primeros en mostrar que se puede trabajar en gran escala.

En 1945, Henry Lardy propuso que el dinitrofenol

estimula la desfosforilación en preparaciones de tejido crudo picado.

Evidencias convincentes en favor de esta observación fueron obtenidas por Lardy y colaboradores cuando demostraron que la oligomicina inhibe, a bajas concentraciones, tanto la actividad de la ATPasa como la fosforilación oxidativa.

En brillantes e innovadores experimentos, Mildred Cohn y Paul Boyer descubrieron reacciones de intercambio. El oxígeno del agua cambia con el oxígeno del Pi, así también como del ATP. El p^{32} intercambia con el ATP. Estos experimentos establecieron las bases para los estados del mecanismo de la fosforilación oxidativa [208].

Slater reconoció las semejanzas entre la glicólisis y la fosforilación oxidativa mitocondrial y propuso un mecanismo para ésta presentando después el modo de acción de la deshidrogenasa del gliceraldehído 3-fosfato. Él propuso que el transporte de electrones en la cadena respiratoria conduce a la formación de intermediarios de alta energía (X-Y) que se asocian a la fosforilación en la producción de (Y-P), seguida por la transfosforilación a ADP para formar ATP. Durante los años siguientes aparecieron una gran cantidad de especulaciones y controversias pero no fueron evidencias convincentes para los que apoyaban la teoría de los intermediarios químicos, aunque varios investigadores exigían que tales compuestos debían de ser aislados[209].

La hipótesis quimiosmótica.

En 1961, 100 años después del clásico postulado de Pasteur, Peter Mitchell publicó una pequeña nota de gran importancia histórica. El propuso un mecanismo quimiosmótico para la fosforilación oxidativa con intermediarios no químicos; una cadena respiratoria asimétrica catalizaba el transporte de electrones que estaba asociado con una translocación vectorial de protones, aumentando el gradiente electroquímico de protones consistente de dos componentes-un potencial de membrana y uno de pH. Este gradiente, llamado mas tarde fuerza motriz de protones, era utilizado por el complejo de la ATPasa mitocondrial para generar ATP. Unos años mas tarde, Mitchell resumió la evidencia experimental substancial que el había obtenido en favor de su hipótesis. El mostró que el transporte de electrones así como la hidrólisis del ATP estaban asociados con la translocación de protones [210].

Aunque se estableció rápidamente que la cadena transportadora de electrones era en efecto asimétrica, como lo requería la hipótesis quimiosmótica, la formulación de Mitchell encontró fuerte resistencia. Los bioquímicos querían intermediarios químicos y no una dudosa "fuerza motriz de protones", particularmente cuando los experimentos para establecer un importante potencial de pH, o medir un potencial de membrana en la mitocondria utilizando microelectrodos habían fallado.

Jagendorf y Uribe mostraron en 1966 que en los cloroplastos un gradiente de pH generado artificialmente produce ATP en ausencia de luz [211]. Sin embargo, cuando estos experimentos fueron citados en favor de una función directa para el gradiente de proteínas, se presentaron objeciones. Según los oponentes de esa hipótesis la mitocondria podía utilizar el gradiente de K^+ para generar ATP y que cada protón podía ser canalizado en X-Y, el verdadero intermediario de la oxidación y la fosforilación.

Pero la importancia del movimiento de protones fue ahora reconocida y constituye un apoyo adicional, procedente de muchos laboratorios, para la hipótesis quimiosmótica.

Una de las características mas importantes de la formulación de Mitchell fue el concepto de que el complejo de la ATPasa mitocondrial y la cadena transportadora de electrones están físicamente separados, con el flujo de protones sirviendo como el único "transmisor" de energía.

Se logró la separación física de la ATPasa de la cadena respiratoria y su incorporación en los liposomas reveló que este complejo cataliza una ATP que maneja la translocación de protones. La citocromo oxidasa y los otros complejos de la cadena respiratoria fueron reconstituidos en los liposomas. Ellos mostraron el fenómeno del control respiratorio, el cual como predice la hipótesis quimiosmótica, fue liberado solo cuando la K^+ valinomicina y la nigericina estuvieron presentes colapsando el potencial de membrana y el pH

respectivamente.

Finalmente, los tres sitios de la fosforilación oxidativa fueron reconstituidos con los complejos de la cadena respiratoria y el complejo de la ATPasa mitocondrial.

Sin embargo, estos experimentos no excluyen realmente la "hipótesis conformacional" propuesto por Boyer, que requería de la interacción directa entre un miembro activado de la cadena transportadora de electrones y el complejo de la ATPasa [212,213].

Mitocondria.

La mitocondria ocupa una fracción substancial del citoplasma de todas las células eucariotas, y aunque son suficientemente grandes para ser observadas en los microscopios ópticos, fueron primero identificadas en la década de los años 90's. El progreso real en el conocimiento de sus funciones dependió de los procedimientos de aislamiento de mitocondrias desarrollados en 1948. Por razones técnicas, la mayoría de los estudios bioquímicos han sido llevados al cabo con mitocondrias purificadas de hígado, el cual contiene aproximadamente de 1000 a 2000 mitocondrias, que ocupan casi un quinto del volumen celular.

Las mitocondrias se representan generalmente como cilindros largos y rígidos con un diámetro de 0.5 a 1 μ que recuerda a las bacterias. Pasado algún tiempo, la microcinematografía de células vivientes muestra que las mitocondrias son organelos plásticos y móviles que cambian constantemente su forma y se fusionan unas con otras para separarse después.

Su movimiento en el citoplasma, está asociado con microtúbulos, los cuales pueden determinar la orientación y distribución de las mitocondrias en los diferentes tipos de células. Así, las mitocondrias de algunas células forman largos filamentos o cadenas mientras en otras permanecen arregladas en una posición en la cual proveen ATP directamente a un sitio de alto consumo de éste, empaquetadas entre las miofibrilas adyacentes en las células del músculo

cardiaco, por ejemplo, o envueltas estrechamente alrededor del flagelo en un espermatozoide.

Cada mitocondria está limitada por dos membranas altamente especializadas que juegan un papel crucial en sus actividades.

Juntas, ellas crean dos compartimentos mitocondriales separados: el espacio interno de la matriz y un reducido espacio intermembranoso.

Si purificamos mitocondrias, las fraccionamos en forma cuidadosa y después se separan sus componentes, se puede analizar la composición bioquímica de cada una de las dos membranas y de los espacios encerrados por ellas. Cada una contiene una colección única de proteínas[214].

La membrana externa contiene muchas copias de una proteína transportadora llamada "porina", la cual forma grandes canales acuosos a través de la bicapa lipídica. Esta membrana es permeable a todas las moléculas de 10,000 daltons o menos. Tales moléculas pueden entrar al espacio intermembranal pero la mayoría de ellas no pueden pasar la membrana interna. Así mientras el espacio intermembranal es químicamente equivalente al citosol con respecto a las moléculas pequeñas que contiene, el espacio de la matriz contiene moléculas pequeñas muy seleccionadas.

La membrana interna es altamente especializada, contiene una alta proporción de un fosfolípido, la cardiolipina, la cual coopera para hacer a la membrana impermeable, a los

iones.

También contiene una variedad de proteínas transportadoras que la hacen selectivamente permeable a moléculas pequeñas que son metabolizadas o requeridas por las muchas enzimas mitocondriales concentradas en la matriz. Las enzimas de la matriz incluyen a las actividades que metabolizan al piruvato y a los ácidos grasos para producir acetil CoA y a las que oxidan a la acetil CoA en el ciclo del ácido cítrico. Los principales productos finales de esta oxidación son el CO_2 , el cual es liberado de la célula y el NADH el cual es la fuente principal de electrones para el transporte a lo largo de la cadena respiratoria.

Las enzimas de la cadena respiratoria están embebidas en la membrana interna mitocondrial, y son esenciales para el proceso de la fosforilación oxidativa, el cual genera la mayoría del ATP de las células animales.

Matriz.- La matriz contiene una mezcla altamente concentrada de cientos de enzimas, incluyendo las que se requieren para la oxidación del piruvato y los ácidos grasos así como para llevar al cabo el ciclo del ácido cítrico. La matriz también contiene varias copias idénticas del genoma del DNA mitocondrial, ribosomas mitocondriales especiales, tRNA y varias enzimas requeridas para la expresión de los genes mitocondriales.

Espacio intermembranal. Este espacio contiene varias enzimas que usan el ATP para salir de la matriz a fosforilar

otros nucleótidos.

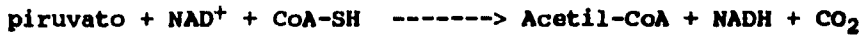
Membrana externa.- Debido a que contiene un gran canal formado por la proteína llamada porina, la membrana externa es permeable a todas las moléculas de 10,000 daltons o menos. Otras proteínas en esta membrana incluyen enzimas involucradas en la síntesis mitocondrial de lípidos y enzimas que convierten los sustratos lipídicos en otras formas que son posteriormente metabolizadas en la matriz.

Membrana interna. La membrana interna está plegada en numerosas crestas, las cuales incrementan grandemente su área total. El número de crestas es tres veces mas grande en las mitocondrias de las células del músculo cardíaco que en las mitocondrias de las células del hígado, debido probablemente a las diferencias morfológicas en los diferentes tipos de células, aunque el significado de estas diferencias se desconoce aún. La membrana interna contiene proteínas con tres tipos de funciones:

- 1) Las que llevan al cabo reacciones de oxidación de la cadena respiratoria, 2) una enzima compleja llamada ATP sintetasa que fabrica ATP en la matriz y 3) proteínas transportadoras específicas que regulan el paso de metabolitos dentro y fuera de la matriz. Aunque el gradiente electroquímico que maneja a la ATP sintetasa se establece a través de esta membrana por la cadena respiratoria, es importante que la membrana sea impermeable a la mayoría de los iones.

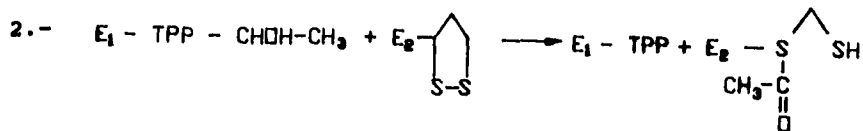
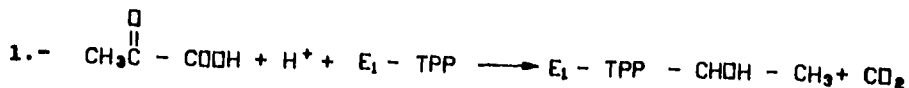
Ciclo del ácido cítrico.

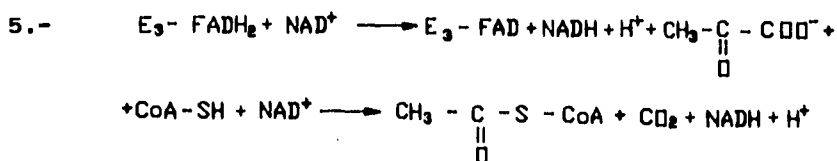
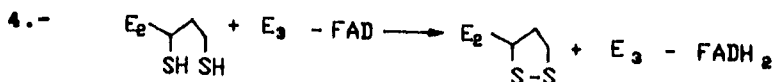
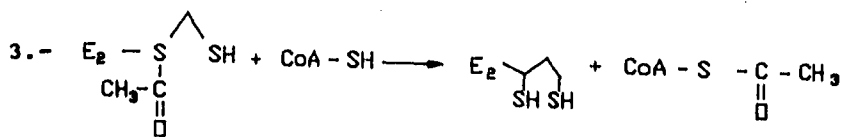
El piruvato que se deriva de la glucosa a través de la glucólisis, se descarboxila produciendo acetil-CoA (acetil coenzima A) mediante una agrupación de enzimas llamada el complejo de la piruvato deshidrogenasa.



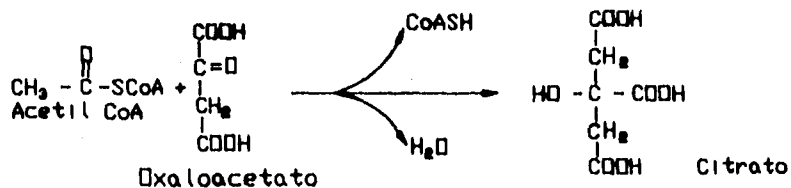
La deshidrogenación y descarboxilación combinadas del piruvato hasta que se transforma en acetil-CoA requiere de la acción secuencial de tres enzimas diferentes, la deshidrogenasa del piruvato (E_1) la transacetilasa del ácido dihidrolipoico (E_2) y la deshidrogenasa del dihidrolipoico (E_3) así como de cinco coenzimas o grupos prostéticos diferentes, pirofosfato de tiamina (TPP), dinucleótido de flavina y de adenina (FAD), coenzima A (CoA), dinucleótido de nicotinamida y de adenina (NAD^+) y ácido lipoico.

Etapas de la descarboxilación oxidativa del piruvato.

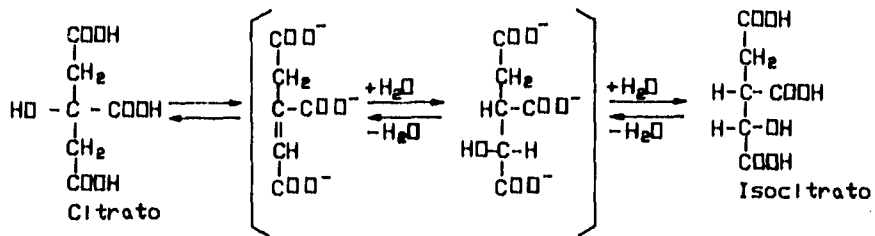




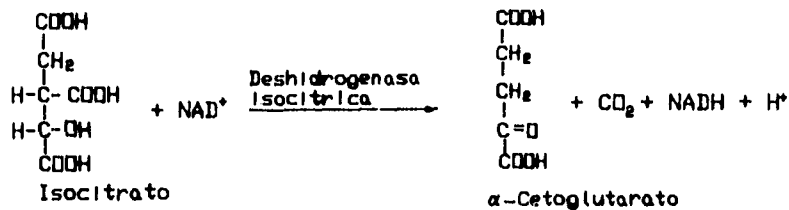
2.- Formación del citrato por condensación de la acetil-CoA con el oxalacetato.



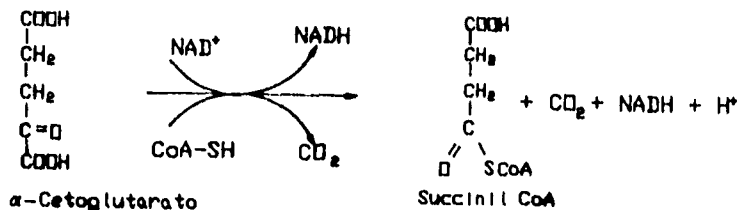
3.- El citrato se convierte en isocitrato a través del cis-aconitato. La enzima aconitasa cataliza la transformación reversible del citrato en isocitrato, a través de la formación de un intermediario que es el cis-aconitato. Ocurre la adición de H₂O al enlace doble del cis-aconitato.



4.- El isocitrato produce α -cetoglutarato por una descarboxilación espontánea.



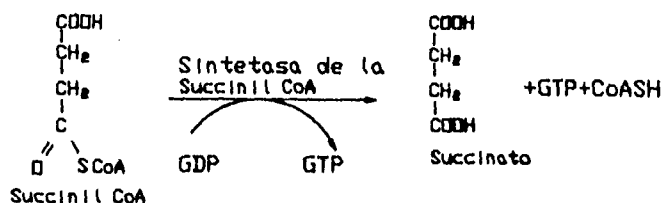
5.- El α -cetoglutarato se oxida a succinil CoA y a CO_2 ya que experimenta una descarboxilación oxidante por la acción del complejo de la deshidrogenasa del α -cetoglutarato que cataliza la reacción.



6.- Conversión del succinil CoA en succinato.

La succinil CoA es un compuesto con alto contenido energético. En las células la succinil CoA no pierde su grupo CoA por una sencilla hidrólisis, lo cual

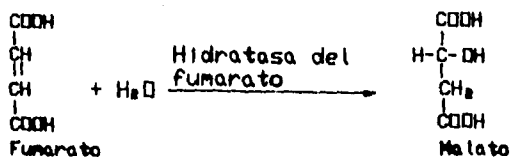
constituiría un desperdicio de energía, por lo que experimenta una reacción acoplada en la que la ruptura del enlace tioéster va acompañada de la fosforilación del difosfato de guanosina (GDP) a trifosfato de guanosina (GTP).



7.- Deshidrogenación del succinato a fumarato.



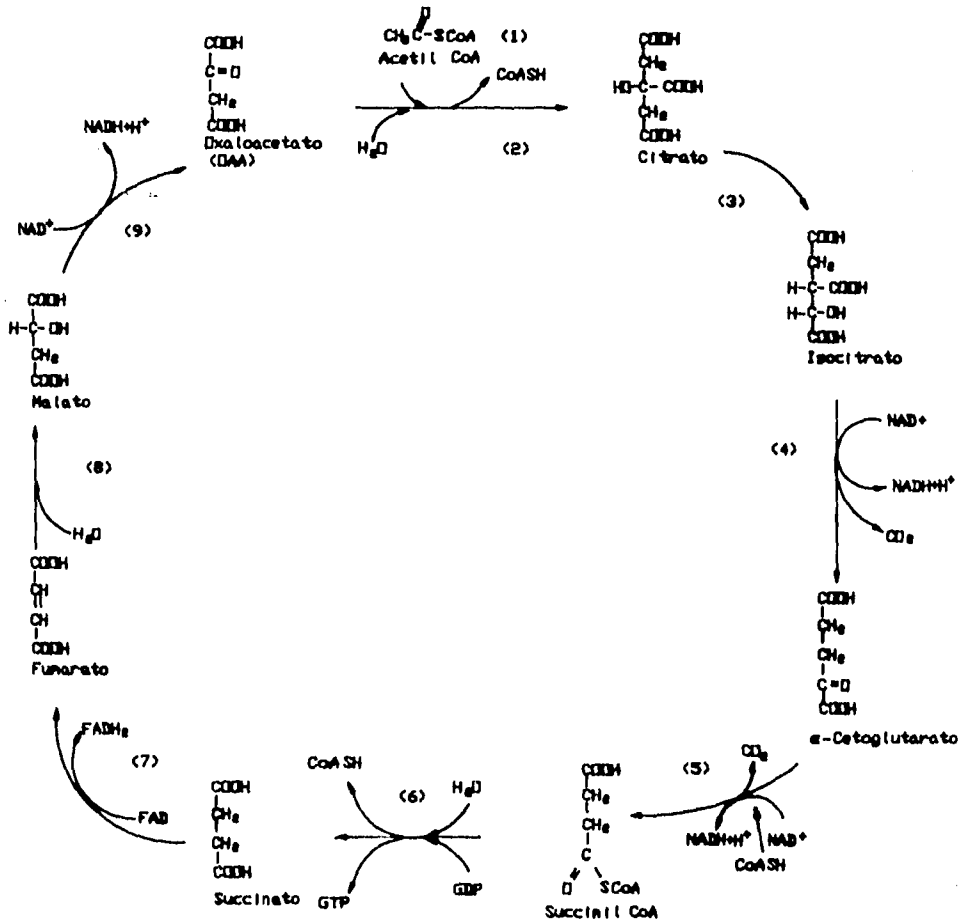
8.- El fumarato se hidrata y forma malato.



9.- Deshidrogenación del malato.



CICLO DE KREBS



La contribución mas importante del ciclo del ácido cítrico al metabolismo es la producción de electrones de alta energía durante la oxidación de dos átomos de carbono de la acetil CoA hasta CO₂. Estos electrones son fácilmente transferidos al NADH y al FADH₂ y después son pasados a la cadena respiratoria en la membrana interna mitocondrial.

Transporte electrónico, fosforilación oxidativa y regulación de la producción de ATP.

La cadena respiratoria contiene tres grandes complejos enzimáticos embebidos en la membrana interna:

1.- El complejo de la NADH deshidrogenasa con un peso de 800,000 daltones. Acepta electrones del NADH y los pasa a través de una flavina a la ubiquinona, una pequeña molécula lipídica que transfiere estos electrones a un segundo complejo respiratorio, el complejo b - c₁ .

2.- El complejo b-c₁ contiene un mínimo de 8 diferentes polipeptidos, cada monómero contiene tres grupos hemo unidos a los citocromos y a una proteína con hierro. Este complejo acepta electrones de la ubiquinona y los pasa al citocromo c, un pequeña proteína que acarrea sus electrones al complejo de la citocromo oxidasa.

3.- El complejo de la citocromo oxidasa está compuesto de un mínimo de ocho diferentes cadenas polipeptídicas y es aislada como un dímero de casi 300,000 daltons; cada monómero contiene dos citocromos y dos átomos de cobre. El complejo acepta electrones del citocromo c y los pasa al oxígeno.

En la fosforilación oxidativa, un máximo de tres moléculas de ATP pueden ser sintetizadas por cada molécula de NADH oxidada.

Un proceso quimiosmótico convierte la energía de oxidación en ATP en la membrana mitocondrial.

Aunque el ciclo del ácido cítrico constituye parte del metabolismo aeróbico, ninguna de las reacciones que llevan a la producción de NADH y FADH₂ hacen uso directo del oxígeno molecular; solo las reacciones catabólicas finales que toman lugar en la membrana interna mitocondrial lo hacen.

Cerca de toda la energía disponible, desde la combustión de carbohidratos, lípidos y otros alimentos en los estados tempranos de la oxidación, es inicialmente conservada en la forma de electrones de alta energía acarreados por el NADH y el FADH₂. Después estos electrones, los cuales han sido removidos de los sustratos por el NAD⁺ y el FAD, son combinados con el oxígeno molecular vía la cadena respiratoria. Debido a que la gran cantidad de energía liberada es almacenada por las enzimas en la membrana interna para manejar la conversión del ADP + Pi en ATP, el término fosforilación oxidativa es usado para describir estas últimas reacciones.

La generación de ATP, a través de la cadena respiratoria, depende de un proceso quimiosmótico, que fue propuesto en 1961 por el bioquímico inglés Peter Mitchell.

Según la hipótesis quimiosmótica, los intermediarios de

alta energía son reemplazados por una unión entre un proceso químico y un proceso de transporte. Como los electrones de alta energía de los hidrógenos en el NADH y en el FADH₂ son transportados descendentemente en la cadena respiratoria en la membrana interna mitocondrial, la energía liberada cuando ellos pasan de una molécula acarreadora a la siguiente es usada para bombear protones (H⁺) a través de la membrana interna desde la matriz mitocondrial al espacio intermembranal. Esto crea un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana interna mitocondrial, y el flujo de protones genera un gradiente que es usado a su tiempo para activar a una enzima unida a la membrana, la ATP sintetasa, la cual cataliza la conversión de ADP + Pi en ATP, completando el proceso de la fosforilación oxidativa.

Acoplamiento quimiosmótico.

La hipótesis quimiosmótica, como se propuso en el año de 1960, consistió de cuatro postulados independientes. En términos de la función mitocondrial, son como sigue:

1.- La cadena respiratoria mitocondrial en la membrana interna está translocando protones y bombea H⁺ fuera del espacio de la matriz cuando los electrones son transportados a lo largo de la cadena.

2.- El complejo mitocondrial de la ATP sintetasa también transloca protones a través de la membrana interna: siendo reversible, puede usar la energía de la hidrólisis del ATP para bombear H⁺ a través de la membrana, pero si se presenta

un mayor gradiente, los protones fluyen en la dirección contraria a través del complejo y llevan al cabo la síntesis de ATP.

3.- La membrana interna mitocondrial es impermeable a H^+ , OH^- y generalmente a aniones y cationes.

4.- La membrana interna mitocondrial está equipada con una clase de proteínas acarreadoras que median la entrada y salida de metabolitos esenciales y de iones inorgánicos seleccionados. El complejo enzimático llamado sintetasa del ATP o ATPasa F_0F_1 posee dos componentes principales, F_0 y F_1 (F indica Factor). El componente F_1 adopta la forma de la perilla de una puerta y se proyecta en la matriz desde la membrana interna mitocondrial, se halla unido, mediante un tallo, a F_0 el cual se encuentra embebido en la membrana interna, a cuyo través se extiende. El subíndice de F_0 no indica cero, sino la letra O, que es la inicial de la oligomicina, lo que indica que es la porción de la ATPasa que se une a este antibiótico, el cual es un potente inhibidor de esta enzima y por lo tanto de la fosforilación.

F_1 fue extraído de la membrana interna mitocondrial y purificado por Efraim Racker y sus colaboradores [215]. El factor F_1 no puede sintetizar ATP por sí solo, a partir de ADP y P_i , pero puede hidrolizar el ATP para formar ADP y P_i , por ello recibe el nombre de ATPasa F_1 . Cuando se preparan vesículas invertidas de la membrana interna mitocondrial y se separa cuidadosamente el factor F_1 , las vesículas todavía

contienen las cadenas respiratorias intactas y pueden catalizar el transporte de electrones. Sin embargo como ya no contienen los grupos F_1 tal como confirma la microscopía electrónica, ya no pueden sintetizar ATP. El F_1 se ha aislado recientemente en forma pura y cristalizada, posee un peso molecular de 380,000 daltones, contiene nueve subunidades que son cadenas polipeptídicas, de cinco clases diferentes y posee también varios sitios de unión para el ATP y el ADP.

La ATPasa F_0F_1 recibe este nombre porque en su forma aislada hidroliza el ATP y libera ADP y P_i , no obstante, su función biológica en la mitocondria intacta es la de sintetizar ATP a partir de ADP y P_i y por ello resulta mas apropiado llamarla sintetasa del ATP.

Este complejo enzimático consiste de dos partes: una parte hidrofílica, F_1 , la cual contiene el sitio catalítico de la síntesis de ATP y una parte membranal, F_0 , la cual es la responsable de la translocación de protones a través de la membrana. F_1 tiene cinco subunidades: $\alpha_3 \beta_3 \gamma \delta \epsilon$ [216].

BIOENERGETICA Y LACTANCIA.

La glándula mamaria durante el inicio de la lactancia es un sistema excelente para el estudio de la proliferación y diferenciación celular bajo un control hormonal.

Antes del inicio de la lactancia, la capacidad de conservación de energía del tejido se incrementa para permitir que la glándula produzca una gran cantidad de compuestos de alta energía necesarios para la síntesis de los componentes de la leche. Esto se refleja en un drástico incremento en el metabolismo oxidativo, el cual se observa al inicio de la lactancia.

Durante la proliferación epitelial y la diferenciación se produce una población celular que tiene una gran capacidad oxidativa, por ejemplo la actividad mitocondrial.

Wellings y colaboradores han descrito, por estudios de microscopía electrónica cambios morfológicos, que ocurren durante los varios estados del desarrollo y la lactancia en la glándula mamaria de la ratona, especialmente en la población mitocondrial. En la ratona virgen se observaron pocas mitocondrias pobremente desarrolladas, mientras que en la glándula mamaria durante la etapa final del embarazo, las mitocondrias incrementaron su número por célula y sus estructuras aparecen bien desarrolladas.

En la glándula lactante, las células epiteliales contienen más mitocondrias que en la etapa prelactante y estas fueron más grandes con crestas y matrices densas bien

definidas.

Debido a este gran incremento en el número mitocondrial y la actividad previa al parto y en la lactancia temprana, la glándula mamaria parece proveer una excelente oportunidad para delinear el mecanismo de la biogénesis mitocondrial en un sistema de mamíferos.

Usando técnicas de cultivo de la glándula mamaria de ratón es posible inducir específicamente varias fases de la replicación y desarrollo mitocondrial, aunque la proliferación celular y su diferenciación pueden ser producidas *in vitro* por adición de varias hormonas combinadas a los experimentos.

Para empezar, se realizaron los experimentos para estudiar sobre la formación y el desarrollo mitocondrial durante el ciclo embarazo-lactancia de la glándula mamaria del ratón. Aunque un estudio bioquímico *in vivo* en los estados funcionales en la glándula mamaria de la ratona fue necesario seguir primero con ciertos parámetros de la división y el crecimiento celulares a través del ciclo embarazo-lactancia. Uno de los pocos estudios de esta naturaleza en el ratón fue reportado por Lewin, en esos experimentos la actividad de la xantina oxidasa fue seguida durante el crecimiento normal y durante el crecimiento de un tumor maligno en la glándula mamaria del ratón y se relacionó con varios parámetros del desarrollo [217].

El número de células, el fosfato del DNA y el fosfato

del DNA por núcleo fue determinado empezando el embarazo y continuando hasta la involución. Una etapa estacionaria se muestra con el número celular y el fosfato del DNA que fue observado desde el día 8 del embarazo hasta un poco después del parto. El peso total de la glándula y el nitrógeno total siguen perfiles similares durante ese período. Parece, sin embargo, que la proliferación empieza temprano en el embarazo y continua hasta un poco después del parto.

Se ha establecido por lo tanto que el incremento mas importante en la proteína mitocondrial y en la actividad ocurre durante la lactancia temprana, subsiguiente a la proliferación celular.

Todos los experimentos descritos proveen evidencias de que durante el embarazo hay un incremento gradual y lineal en la actividad mitocondrial con un precipitado de 2 a 3 veces mas grande el cual ocurre durante los primeros pocos días de la lactancia.

El rápido incremento en los parámetros mitocondriales ocurre durante un período posterior a la proliferación epitelial aunque se demostró que el contenido de DNA celular total fue mayor durante el parto.

Esto indica que esos incrementos abruptos son debidos a cambios en el parénquima individual celular.

Esto es sugerido por los experimentos realizados en parénquimas celulares aislados, en los cuales la actividad mitocondrial por célula se incrementó lentamente durante el

final del embarazo pero rápidamente durante los primeros cuatro días de la lactancia.

Aunque el contenido del DNA es tomado como un reflejo del número celular, parece ser que el incremento en la masa del tejido se debe a un estado estacionario de la proliferación celular durante este período. En el caso de la proteína total, el aumento durante el embarazo es principalmente un reflejo de la proliferación epitelial y su diferenciación, en la cual el aumento continua después del parto y se debe aparentemente a la diferenciación epitelial.

Se puede observar que la variabilidad de los datos en cada uno de los tres perfiles es mas grande durante la lactancia que durante el embarazo. Esto puede ser debido a la diferencia en el número de células y a la masa de la glándula como resultado de la variación en la demanda de leche de las diferentes camadas.

Tucker y Reece reportaron que el contenido del DNA por cada núcleo de la glándula mamaria de rata no es significativamente diferente desde el día 12 del embarazo hasta el día 21 de la lactancia y pueden ser usados como una medida válida del número celular durante este periodo [218].

Simpson y Schmidt sin embargo, informaron que la cantidad de DNA en la glándula mamaria de la rata es significativamente mas baja durante la involución cuando se compara con el embarazo y la lactancia y esas variaciones en el contenido del DNA por núcleo entre la glándula ocurre

durante el embarazo, la lactancia y la involución [219].

En los estudios de la glándula de ratón realizados por Lewin, el DNA incrementa paralelamente al incremento en el número celular total y el contenido del DNA por núcleo permanece constante. Sin embargo, el DNA total parece ser un criterio válido para los números celulares en la glándula mamaria del ratón.

Rees y Eversole han determinado la composición del tejido de la glándula mamaria en los estados virgen y lactante [220]. En la glándula virgen, las células epiteliales constituyen poco menos del 5% de la población celular total mientras que las células adiposas y conectivas comprenden aproximadamente el 95%. En la glándula lactante, las células epiteliales comprenden del 70 al 80% de la población total con células adiposas y conectivas comprendiendo del 1 al 4 % y del 20 al 30% del total respectivamente. Un incremento tan grande en la población epitelial indica que la gran mayoría de las células formadas en el período anterior a la lactancia son epiteliales.

La determinación de la proteína total de una fracción mitocondrial es útil solo como una estimación de la proteína total mitocondrial aunque el daño durante la centrifugación y la contaminación por otros organelos disminuyen la precisión.

Este método puede, sin embargo, reflejar adecuadamente los cambios gruesos en la proteína mitocondrial.

Aunque la masa mitocondrial contiene los organelos de

todos los tipos celulares mamarios, el incremento al inicio de la lactancia es atribuido a cambios en las mitocondrias de las células epiteliales diferenciadas, ya que estas células experimentan los cambios mas significativos durante este período.

La proteína mitocondrial por célula parece disminuir lentamente durante la proliferación celular pero se incrementa 2 veces durante los primeros días de la lactancia.

Estos resultados parecen reflejar los cambios en las células del parénquima.

La succinato oxidasa y la citocromo oxidasa, son enzimas características de la mitocondria y han sido empleadas como marcadores de la actividad mitocondrial. En adición, la formación de ATP ligada a succinato, el cual es un marcador inequívoco de la actividad mitocondrial, fue usada como un tercer criterio. El perfil de la formación del ATP provee una clara evidencia de que la actividad de la succinato oxidasa varía en respuesta a cambios en los estados funcionales.

En estos experimentos, la succinato oxidasa y la formación de ATP ligada a succinato fueron criterios mas sensibles de los cambios en la función mitocondrial que la citocromo oxidasa.

Se necesita hacer una distinción entre la biogénesis mitocondrial o replicación y la maduración mitocondrial. En la glándula mamaria del ratón los dos eventos no pueden ocurrir simultáneamente. En estos estudios hemos establecido

que el incremento mayor en la proteína total mitocondrial y en las actividades enzimáticas ocurre después del parto, pero no hemos demostrado si esto involucra la biogénesis de nuevos organelos o simplemente la maduración y el aumento de los ya preexistentes.

En los experimentos de Wellings y colaboradores, mencionados anteriormente, la población mitocondrial mostró un crecimiento estable en su número por célula y en el tamaño y la complejidad durante la secuencia de proliferación y diferenciación [221].

Esos estudios sugieren que el período principal de la replicación mitocondrial es durante la proliferación epitelial a la mitad del embarazo tardío, aunque el número de organelos por célula se incrementa mientras las células epiteliales tuvieron un incremento máximo. Aunque nuestros resultados sugieren que este no es el período de producción máxima de la proteína mitocondrial y la actividad se incrementa, los cambios observados en los precipitados pueden reflejar la maduración de los organelos y su crecimiento pero no la replicación.

Una secuencia razonable de los eventos durante la biogénesis mitocondrial completa, involucra durante la proliferación epitelial, una etapa de replicación en la cual son formados, por división, pequeños organelos inmaduros. Estos organelos cuando maduran aumentan en número lentamente hasta el inicio de la lactancia y con el tiempo incrementan

rápidamente en tamaño y maduración llegando a ser mas grandes, también aumentan su forma y actividad que son características de las células alveolares funcionales.

Si esta hipótesis es valida, sería posible demostrar los incrementos máximos paralelos al incremento en el número total de mitocondrias y del DNA mitocondrial durante el período de proliferación epitelial.

Composición química de la mitocondria de la glándula mamaria.

Las células de los acinis de la glándula mamaria sintetizan y eecretan cantidades substanciales de proteínas, carbohidratos, pricipalmente lactosa y lípidos. La secreción de estos productos parece involucrar a la membrana. Esto parecería hacer al tejido mamario un sistema ideal para el estudio de diferenciación de membrana y transferencia. El reporte inicial del sistema de membrana de la glándula mamaria presenta detalles del aislamiento y la caracterización de las mitocondrias, esos resultados sirven como una base para la comparación con membranas de otros órganos, sin embargo en vista de los altos requerimientos de energía necesariios para la actividad sintética de la glándula mamaria es importante comparar el nivel de los componentes involucrados en el transporte de electrones en la mitocondria en relación a otros órganos. La glándula mamaria es rica en colágeno y por lo tanto esto ofrece gran dificultad para la homogenización, por lo que el método de homogenización mas

utilizado es el homogenizador Polytron que permite procesar rápidamente grandes cantidades de tejido. Huang y Keenan obtuvieron un gramo de proteína mitocondrial de 9 Kg de peso seco de tejido mamario bovino. La fracción purificada fue monitoreada con microscopía electrónica observándose que sus crestas fueron mas cortas y menos numerosas en comparación con las micrografías de las mitocondrias de corazón y de riñón de bovino. Estas mitocondrias mostraron la presencia de la NADH citocromo c reductasa. Sin embargo sus niveles y los del citocromo a + a₃ son mas bajos que en el corazón pero mas altos que en el hígado y en el riñón [222]. Los datos se muestran en la tabla A. Se determinaron en la fracción mitocondrial purificada marcadores enzimáticos para la mitocondria y las membranas microsomales. Como era de suponerse la succinato reductasa estuvo concentrada en la fracción mitocondrial mostrando un incremento de ocho veces la actividad del homogeneizado. La distribución subcelular de esas enzimas en el tejido mamario es muy parecida a la distribución observada en las células del hígado. La tabla B muestra la distribución de los marcadores enzimáticos mencionados.

Tabla A.- La composición de las mitocondrias del tejido mamario.

Constituyente	Contenido
Lípidos totales mg/mg proteína	0.35
Fosfolípidos % de total de lípidos	84.75
Lípidos neutros % de lípidos totales	15.25
Colesterol µg/mg proteína	15.40
Coenzima Q, mµ moles /mg proteína	1.43
Acido ribonucleico µg/mg proteína	31.00

Tabla B.- Actividad específica.
(µmoles de Pi/hr/mg de proteína)

Enzima	Homogenado	Mitocondria	Microsomas
Succinato reductasa	1.68	13.56	0.20
Glucosa 6 fosfatasa	4.20	0.20	5.88
5'nucleotidin			
tiamina pirofosfatasa	0.18	No detectada	

Metabolismo intermedio de la glándula mamaria.

Los estudios de los cambios respiratorios de la glándula mamaria han sido hasta ahora limitados al tejido de los rumiantes en los cuales, la medición arterio venosa puede ser aplicada a la ubre. Los datos del flujo sanguíneo son difíciles de obtener ya que es necesario convertir las diferencias arterio-venosa de oxígeno y dióxido de carbono en valores absolutos para el consumo y la salida respectivamente

y así poder calcular el cociente respiratorio (C.R). Los resultados obtenidos en la cabra por Graham, Houchin, Peterson y Turner y en las vacas por Petersen y Shaw, en 1942, muestran un C.R mayor que la unidad para la ubre lactante, lo cual ha sido interpretado como un indicador de la formación de grasa de la leche, mas específicamente de los ácidos grasos de cadena corta a partir de carbohidratos.

Muchas de estas determinaciones en animales se han realizado en animales no anestesiados, lo que ocasiona valores individuales muy variables.

Estos problemas fueron eliminados por los estudios de Folley y French en el tejido de bovino y caprino, en los cuales evitaron la variabilidad anestesiando a los animales y comparando la actividad de las muestras en una atmósfera de dióxido de carbono. Esto produjo cocientes respiratorios uniformes de 1.25 ± 0.12 para bovino y de 1.09 para caprino[223].

El tejido mamario de la rata muestra un consumo apreciable y mantenido de oxígeno en ausencia de sustrato pero que se incrementa en presencia de glucosa.

El tejido mamario de las ratas en la lactancia da un cociente de oxígeno (Q_{O_2}) de aproximadamente $-9\mu\text{l}/\text{mg}$ de peso seco final/hora que es del mismo orden del hígado pero menor que en otros tejidos como son la retina y el riñón. La actividad de los tejidos de varias especies está relacionado inversamente con el tamaño del cuerpo como sigue: ratón,

rata, cuyos, conejos y vacas.

En presencia de glucosa, el cociente respiratorio (C.R) del tejido del ratón, la rata, el cuyo y el conejo se encuentra arriba de la unidad, pero en los tejidos de los ruminantes (cabra, vaca) es menor que la unidad.

El bajo C.R obtenido en ausencia de sustrato en la rata sugiere la oxidación de los lípidos almacenados.

Varios carbohidratos fueron probados como sustratos, incluyendo la galactosa, la fructosa y la lactosa pero solo la manosa y la glucosa fueron oxidadas por las rebanadas de la glándula mamaria de ratas lactantes.

La producción aeróbica de ácido láctico por rebanadas de la glándula mamaria de la rata en presencia de glucosa, no es alta, pero bajo condiciones anaeróbicas, es considerable.

Este tejido muestra un efecto Pasteur muy marcado.

Las rebanadas de la glándula mamaria de ratas adrenalectomizadas en el día 40. de la lactancia o per ayuno parcial, muestran una disminución del cociente de oxígeno (Q_{O_2}) y del cociente respiratorio (C.R). El daño en la función celular se ve acompañado por una disminución en el efecto Pasteur, evidenciado por un incremento significativo en la glicólisis aeróbica aparente.

Folley y French han mostrado que las rebanadas de tejido mamario lactante respiran activamente en un medio conteniendo glucosa. En la rata la actividad de la glándula mamaria es menor que en los tejidos nervioso y renal pero es del mismo

orden que el del hígado.

Por otro lado, en el tejido húmedo, no hubo diferencia en la "velocidad metabólica" al final del embarazo y en los primeros 20 días de la lactancia, debido a que el contenido de material seco de la glándula es mucho más alto en el embarazo que en la lactancia.

El metabolismo respiratorio y la producción de ácido de las rebanadas de glándula mamaria de la rata, en presencia y ausencia de glucosa, han sido estudiados durante el embarazo, la lactancia y el destete.

El $-Q_{O_2}$ es bajo (1.3) al final del embarazo pero se incrementa considerablemente en el día posterior al parto (4.4); después, los valores alcanzan un valor cercano a 10 a la mitad de la lactancia. La interpretación de estos cambios se complica por los cambios en el contenido del material seco del tejido, el cual por la mitad de la lactancia ha caído a un valor menor al 50% del valor obtenido al final del embarazo [224].

Solo en el tejido lactante se observa un incremento en la respiración como respuesta a la adición de glucosa. El cociente respiratorio en presencia de glucosa está por debajo de la unidad al final del embarazo, pero llega a la unidad al día siguiente al parto y alcanza un máximo de aproximadamente 1.6, el cual es mantenido durante el resto de la lactancia. En ausencia de sustrato el C.R. permanece debajo de la unidad durante la lactancia.

La glándula lactante muestra un Q_{O_2} mas alto que la glándula al final del embarazo; el incremento es sin embargo, debido principalmente a los cambios en el contenido de peso seco del tejido.

El destete es seguido por una caída en la respiración, el cambio en el $-Q_{O_2}$ es también atribuido al incremento en el contenido de material seco del tejido, lo cual ocurre a este tiempo. Se ha observado en varias especies, predominantemente en conejo y cuyo, que durante la lactancia hay un incremento en algunas enzimas mitocondriales como son la succinato deshidrogenasa y la citocromo oxidasa.

El gran incremento en la actividad mitocondrial parece ser el resultado de varios cambios en el desarrollo, primero hay un gran incremento en el número total de células como resultado de la proliferación de células epiteliales, esto provee una expansión total de la población mitocondrial.

Segundo, los cambios en la composición celular son totales y predominantemente epiteliales.

Tercero, parece ser que hay un aumento en el número de mitocondrias por célula epitelial.

La biogénesis de la mitocondria.

La biogénesis mitocondrial en el parénquima celular de la glándula mamaria del ratón ocurre en dos fases distintas: la replicación durante la proliferación celular y la maduración durante la diferenciación celular.

Un estudio de la fase de maduración mitocondrial en la

glándula del ratón por medio de un gradiente isopícnico de sacarosa demuestra un incremento en la densidad del organelo durante la transición desde el embarazo tardío al día 8 de la lactancia. La fragilidad de este organelo en altas concentraciones de sacarosa o cambios en su composición lipídica no explican el incremento en su densidad.

Cuando la densidad de los organelos fue medida por centrifugación en un gradiente iso-osmótico de Ficoll y sacarosa 0.25 M, las mitocondrias de las glándulas de ratas embarazadas fueron mas densas que las obtenidas de las glándulas de ratas lactantes. Las dos poblaciones mitocondriales mostraron respuestas diferentes a los cambios en la concentración de sacarosa en los gradientes de Ficoll.

La densidad de las mitocondrias de las glándulas de ratas embarazadas como de las glándulas lactantes se incrementó no linealmente al aumentar la concentración de sacarosa, sin embargo, este incremento fue mayor en los organelos de la glándula lactante.

En esta investigación, en la cual se emplean gradientes de sacarosa y de Ficoll, se observó una sola banda mitocondrial. En ambos tipos de gradientes la banda mitocondrial de la glándula a la mitad de la lactancia fue poco difusa, lo cual parece reflejar una población bastante homogénea de mitocondrias. Por otro lado, la banda mitocondrial obtenida desde el embarazo tardío a la lactancia temprana fue mas difusa, indicando una población heterogénea

durante ese período de transición.

Al estudiar la densidad mitocondrial en gradientes de sacarosa, se observó un incremento en la transición del embarazo tardío a la mitad de la lactancia. Esto refleja un cambio en las propiedades físicas de la mitocondria al tiempo que se observa un incremento drástico en las demandas de energía del tejido.

Con el uso de modelos matemáticos, Rosano y colaboradores interpretaron la diferente respuesta como un cambio en la densidad y en la actividad osmótica del compartimiento mitocondrial interno (membrana interna mas el espacio de la matriz). Se ha propuesto que los cambios observados durante la transición reflejan una gran expansión de la membrana interna mitocondrial y quizá del material de la matriz [225].

La densidad de la mitocondria está relacionada a la composición del gradiente medio de densidad por la relación siguiente:

$$\rho_p = \frac{\rho_w \rho_d + (\rho_d + \rho_m \beta) m}{\rho_d \alpha + \rho_w (1 + \beta) m}$$

donde ρ_p es la densidad de la mitocondria, ρ_d es la masa de la partícula privada de solvente ρ_m es la densidad de la sacarosa en el gradiente medio, ρ_w es la densidad del solvente (agua pura), m es la molaridad de la solución de sacarosa, α es la cantidad de sustancias osmóticamente activas en el interior de la partícula y β es la fracción de

la partícula que es libremente accesible a la sacarosa.

Los valores relativos para ρ_d mostraron que la densidad de la mitocondria (componentes sólidos) fue mas grande durante la lactancia que durante el embarazo. Valores similares para β (20% mas altos durante el embarazo) representan cambios pequeños en el tamaño relativo del espacio de la sacarosa.

Los cambios observados en la actividad osmótica y en la densidad podrían ser explicados de varias formas. Una de ellas podría ser la expansión de la membrana interna acompañada de un incremento en la cantidad y organización del material de la matriz.

Aunque la sacarosa cruza la membrana externa pero no la membrana interna, el efecto de la deshidratación se produciría principalmente sobre la membrana interna. Un incremento en la membrana mitocondrial interna y en el material de la matriz podría causar un incremento en la densidad del organelo.

Aunque los cambios estructurales en la mitocondria son respuesta a las grandes demandas de energía de la lactancia, parece razonable que durante la transición en la lactancia se produzca un incremento de la membrana interna y del material de la matriz (sitios donde se ubican las enzimas del ciclo de Krebs, del transporte de electrones y de la fosforilación oxidativa). El sistema de enzimas oxidantes ha sido investigado por Greenstein y colaboradores en la glándula

mamaria. La presencia de concentraciones relativamente altas de citocromo c en el tejido mamario activo hace suponer la presencia de deshidrogenasas no identificadas, las cuales requieren del sistema de citocromos como un mecanismo de transporte de hidrógeno.

El porcentaje metabólico del tejido conectivo activo se reduce durante el embarazo tardío y la lactancia, mientras que el del parénquima más activo se incrementa, y así las actividades enzimáticas pueden ser atribuidas a cambios anatómicos. Sin embargo, parecería que el incremento en la actividad de la succinato oxidasa se asocia más con las etapas funcionales del ciclo mamario que con el crecimiento. Esa enzima permanece relativamente baja durante la primera mitad del embarazo aumentando después hasta alcanzar los niveles óptimos al lograrse el desarrollo completo de la glándula.

Con el inicio de la secreción de la leche, cerca del parto, la actividad enzimática se incrementa grandemente. Este dramático aumento en la actividad de la succinato oxidasa parece ser controlada por los cambios hormonales que ocurren en ese tiempo.

El incremento en la actividad de la succinato oxidasa en el parto correlaciona bien con la observación hecha por Folley y French en relación a que el CO_2 producido por el tejido mamario aumenta desde 1.3 en el día 20 del embarazo hasta 4.4 en el primer día de la lactancia (un período de

solo dos días). Conforme se acerca el fin del embarazo, hay un incremento en la diferenciación y especialización de las células mamarias asociadas con la secreción de la leche. Esa especialización se relaciona con un incremento en la capacidad de movilización de la energía.

Es interesante que el fumarato puede ser lentamente oxidado por una preparación del tejido mamario la cual no oxida al malato. Aunque en ese trabajo no se sugiere un mecanismo para esta oxidación parecería que el fumarato está siendo oxidado por las enzimas que participan en la formación del malato.

Debido a la alta concentración del citrato en la leche, el tejido mamario lactante no oxida a ese sustrato.

El sistema de la succinato oxidasa, el cual está asociado con la mitocondria, está presente en el tejido mamario no lactante y durante la gestación pero se incrementa marcadamente cerca del parto. Cuando el ATP y el Mg son adicionados a la cicloforasa mamaria de cuyos, el succinato, el oxaloacetato y el α -cetoglutarato son rápidamente oxidados, mientras que el fumarato es lentamente oxidado. El malato y el citrato son oxidados solo cuando se adicionan nucleótidos de piridina. La actividad de la citocromo oxidasa (un marcador de la membrana mitocondrial interna) de la glándula mamaria del ratón se encontró incrementada de 5 a 6 veces desde el embarazo tardío hasta el día 8 de la lactancia, mientras que la monoamino oxidasa (un marcador de

la membrana externa) incrementó solo un 25%. La actividad específica de la monoamino oxidasa decrece 5 veces. Esto muestra que la citocromo oxidasa se incrementa a una velocidad mayor que la actividad de la monoamino oxidasa. Algunos experimentos sugieren la posible remoción de un inhibidor que produce los cambios en la actividad enzimática.

La proporción entre la citocromo oxidasa y la monoamino oxidasa fue seguida durante el ciclo embarazo-lactancia en homogeneizados mamarios totales en células aisladas del parénquima mamario y en mitocondrias mamarias aisladas.

En cada preparación el patrón fue muy similar con pequeños cambios en la velocidad hasta el embarazo tardío, y después se presenta un incremento de 3 a 4 veces hasta que los valores alcanzaron un valor máximo por el día 8 de la lactancia. Estos experimentos fueron interpretados como una demostración de que los cambios enzimáticos observados son un reflejo de alteraciones en la población mitocondrial de las células del parénquima mamario. Se obtuvieron fotografías del microscopio electrónico de las células del parénquima a la mitad del embarazo y a la mitad de la lactancia observándose en ellas cambios marcados en la morfología mitocondrial.

El cambio mas significativo es el incremento en el número de crestas de la membrana interna y un incremento en la densidad de la matriz en las mitocondrias de las células de la glándula lactante. Por lo tanto ambos estudios, el enzimático y el morfológico apoyan el concepto de una

expansión de la membrana interna mitocondrial de las células del parénquima mamario durante la diferenciación presecretora.

Una explicación para la diferencia en el comportamiento de las mitocondrias de la glándula mamaria de la ratona embarazada y lactante, hecho por centrifugación en un gradiente isopícnico, es una expansión de la membrana interna durante la transición desde el embarazo a la lactancia. Rossano y colaboradores han demostrado, en un estudio anterior, que varias enzimas asociadas con la membrana interna mitocondrial incrementan su actividad casi 5 veces durante los primeros días de la lactancia [226].

El período en el que se observa el incremento enzimático corresponde exactamente al tiempo en el que se incrementa la densidad mitocondrial estudiada en gradientes de centrifugación con sacarosa.

Varios investigadores han mostrado que el número de mitocondrias por célula del parénquima mamario se incrementa durante el embarazo y en la lactancia temprana, ya que está bien establecido que la población celular del parénquima incrementa grandemente desde el embarazo temprano hasta aproximadamente el momento del parto. Es obvio, que el número total de mitocondrias en el tejido mamario se incrementa durante este período de proliferación celular.

Rosano ha mostrado que existen incrementos significativos en la capacidad oxidativa de los organelos

individuales debido a la expansión de la membrana interna.

Esta expansión, sin embargo, no corresponde al período de mayor replicación celular y mitocondrial pero está directamente relacionada a los cambios celulares, los cuales se presentan poco antes de la actividad secretora. Esto parece mostrar un tipo de maduración del organelo o su diferenciación.

Rosano ha sugerido dos esquemas generales para explicar las modificaciones en la actividad y morfología de la membrana mitocondrial interna. El primero, sugiere la producción de una nueva población de mitocondrias durante la transición en la lactancia. Esta nueva población tendría un tamaño diferente y una estructura interna mas compleja que el organelo que predomina durante los estados virgen y el embarazo temprano. Con base en este mecanismo se podría esperar un mínimo de dos poblaciones mitocondriales diferentes coexistentes durante el período de transición. Una población poseería las propiedades características de un organelo de la glándula no lactante, por ejemplo, menos denso con una estructura externa simple y una baja relación de citocromo oxidasa/monoamino oxidasa. La nueva población sería mas densa y tendría una estructura interna mas compleja y mostraría una alta relación citocromo oxidasa/monoamino oxidasa. La segunda posibilidad es que la población mitocondrial entera madura durante su diferenciación en la transición embarazo-lactancia. Esta maduración involucraría

una expansión de la membrana interna. Con cada posibilidad, esperaríamos encontrar un incremento en la relación de las actividades de la citocromo oxidasa y la monoamino oxidasa alrededor del momento del parto. Se podrían diferenciar las dos hipótesis ya que si coexisten dos poblaciones diferentes de mitocondrias durante el período de transición, sería posible resolverlo en dos bandas distintas en un gradiente de sacarosa. Se ha observado, sin embargo, una sola banda y esta banda incrementó su densidad durante el período de transición.

En suma, no se encontró evidencia por microscopía electrónica de heterogeneidad morfológica significativa en algún estado del desarrollo de la glándula. Parece, sin embargo, que nuestros descubrimientos tienden a apoyar el concepto de la maduración total del organelo durante la diferenciación celular mas que al desarrollo de una nueva, población mitocondrial mas activa.

Estos estudios muestran que existen cambios importantes en la composición física, enzimática y estructural de la población mitocondrial dentro de las células del parénquima mamario durante el cambio fisiológico de la célula. Por lo tanto, el sistema genético de las células parece tener la habilidad para producir un organelo a la medida para cubrir las demandas metabólicas específicas.

Esto aumenta su capacidad oxidativa en general. Estos cambios actúan en conjunto para proveer la energía que

demanda la producción de la leche.

En artículos previos Folley y Grenbaum (1946) han demostrado que la glándula mamaria de la rata lactante muestra una actividad apreciable de arginasa y posiblemente es la segunda fuente mas alta de arginasa del cuerpo. Se piensa que la arginasa está relacionada probablemente con la síntesis de los constituyentes de la leche, por lo tanto decidieron estudiar los cambios en el contenido de arginasa del tejido mamario de la rata durante las diferentes etapas del crecimiento y las funciones características del embarazo, la lactancia y la involución [227].

También fué estudiado el contenido de arginasa del hígado debido a que en el embarazo y la lactancia se impone una considerable presión sobre el metabolismo del cuerpo, el cual puede ser reflejado con cambios en los niveles de la arginasa hepática.

Otra enzima conocida que está presente en el tejido mamario es la fosfatasa alcalina, sin embargo se desconoce su función. En este trabajo se estudiaron los cambios en la actividad de la fosfatasa del tejido mamario en las diferentes etapas de crecimiento y actividad. También se determinó la fosfatasa del riñón para comparar la actividad con la de la fosfatasa mamaria, como un posible indicador de cambios en los niveles generales de fosfatasa del cuerpo.

El contenido de arginasa del hígado durante el embarazo y después del destete no depende de controles excepto al día

15 del embarazo cuando se observan los valores mas bajos. En el período de lactancia la arginasa del hígado incrementó significativamente arriba de estos valores.

La actividad de la arginasa en la glándula mamaria se incrementó lentamente durante el embarazo y los primeros días de la lactancia pero aumentó dramáticamente entre los días 5 y 10 de la lactancia. Alcanzando un máximo al día 20 de la lactancia, decayendo precipitadamente después del destete hasta alcanzar al nivel de los primeros días del embarazo.

El contenido de fosfatasa alcalina de la glándula mamaria incrementa rápidamente durante el embarazo, alcanzando un máximo al parto y permaneciendo al mismo nivel durante la lactancia, disminuyendo después a un nivel intermedio entre los valores de la lactancia y los primeros días del embarazo. El contenido de fosfatasa alcalina del riñón permanece constante durante el embarazo, la lactancia y la involución.

Los resultados indican que la arginasa en la glándula mamaria se relaciona con la desaminación de los aminoácidos y el incremento en su contenido, durante la fase final de la lactancia en las ratas, se debe a un incremento de esqueletos hidrocarbonados para la síntesis de los constituyentes de la leche. Los autores sugieren que sus resultados son consistentes con la observación de que la fosfatasa alcalina de la glándula mamaria puede estar relacionada con la síntesis de nucleoproteínas durante la fase de crecimiento y

posiblemente con la síntesis de caseína y la captura de moléculas de carbohidratos del flujo sanguíneo durante la lactancia.

Durante la lactancia en la rata, el contenido tanto de la arginasa como de la fosfatasa del riñón fué 2 a 9 veces mayor que en la glándula mamaria, por ejemplo, durante el embarazo, la relación de actividad riñón/glándula mamaria es aproximadamente 34.

La arginasa del hígado en la rata decrece después de la adrenalectomía y en las ratas lactantes la arginasa de la glándula mamaria se comporta en forma semejante. Es posible que esta disminución de la lactancia por la adrenalectomía tenga alguna relación con la disminución en la arginasa mamaria, ya que este sistema enzimático juega un papel importante en el metabolismo de la glándula mamaria lactante.

Aunque la adrenalectomía es seguida por una marcada reducción en el consumo de alimento, los autores deseaban conocer si los niveles deprimidos de la arginasa en los tejidos de los animales adrenalectomizados era una consecuencia primaria de la anorexia postoperatoria, que sucedería en las ratas lactantes, en las cuales el consumo de alimento aumenta rápidamente y se estabiliza cerca de los primeros 17 días del período de lactancia a un valor aproximadamente 3 veces mayor al de los valores del embarazo[228].

Los niveles de arginasa del hígado, el riñón y la

glándula mamaria, de las ratas adrenalectomizadas en el día 4 de la lactancia y sacrificadas el día 17, fueron significativamente mas bajas que los obtenidos durante el experimento con ratas lactantes operadas sin adrenalectomía (sham). El contenido de arginasa por gramo de tejido húmedo fue afectado mas en la glándula mamaria (a 1/7) que en el riñón (a 1/2). Los niveles de arginasa del tejido de ratas lactantes falsamente operadas con alimentación y de ratas adrenalectomizadas no fueron significativamente mas bajos que los obtenidos en las ratas operadas y alimentadas ad libitum (ad lib), salvo en el caso de la arginasa total en el hígado y las glándulas mamarías abdominales, reducción debida a una disminución en el tamaño de la glándula o las glándulas de interés.

Los autores concluyeron que los resultados mostraban una relación entre los corticoides y la arginasa de la glándula mamaria y el riñón que sería el caso si la disminución en la concentración de la enzima fuera debida primeramente a una anorexia postoperatoria. Los datos sugieren que la disminución en la actividad de la arginasa en el hígado después de la adrenalectomía no es debida a la anorexia.

Una reevaluación de la actividad relativa de la arginasa de la glándula mamaria, en relación a la de otros tejidos en la rata lactante intacta, muestra que el hígado contiene 9 veces la cantidad encontrada en el tejido mamario y 28 veces la cantidad del riñón.

CONCLUSION.

La leche materna es esencial para la continuidad de las diferentes especies de mamíferos, ya que las necesidades nutricionales del infante se satisfacen con la leche materna.

La leche materna contiene energía y nutrientes que se pierden del cuerpo materno al extraer la leche, por lo que el proceso de síntesis de los componentes de la leche requiere de energía y de nutrientes adicionales. Por ejemplo, la leche humana está compuesta aproximadamente de un 4.5% de grasas, 1.1 % de proteínas, 7.0% de carbohidratos, 7% de minerales y un 87.5% de agua. En mujeres con desnutrición crónica se produce un volumen menor de leche con un contenido proteico semejante a la producida por las mujeres bien nutridas. Esta adaptación incluye una mayor eficiencia en la absorción, en la utilización y el agotamiento de las reservas corporales, por esto la lactancia representa el mayor estrés nutricional impuesto por un proceso fisiológico.

Esto incluye una mayor eficiencia de los procesos metabólicos, lo que lleva a pensar que la mitocondria de la glándula mamaria es muy eficiente en la producción de una gran cantidad de energía, necesaria para la síntesis de los componentes de la leche y el mantenimiento de ésta durante el período de lactancia.

Debido a esta gran demanda de energía durante la lactancia, la población alveolar de la glándula mamaria incrementa su actividad del metabolismo oxidativo, lo que significa un incremento durante la función mitocondrial

debido a un aumento en el número de mitocondrias y en sus propiedades oxidativas.

Este trabajo describe el aumento en las actividades enzimáticas mitocondriales que ocurre en la glándula mamaria durante la transición a la lactancia. Estas actividades están relacionadas directamente a la expansión de la membrana interna mitocondrial y de la matriz que ocurre al mismo tiempo.

Existen evidencias de la expansión mitocondrial respecto a los cambios en los marcadores de la membrana interna y de la membrana externa, en los cuales cada mitocondria lleva al cabo un tipo de "diferenciación" en el cual la membrana interna y la matriz se expanden aumentando su capacidad oxidativa con lo que se incrementa la síntesis de ATP para cubrir las demandas de la lactancia.

Un área de interés futuro será la determinación del control genético así como los mecanismos moleculares y de regulación del complejo de la ATP sintetasa en la generación y conservación de energía para cubrir el gran costo energético que implica la síntesis de los constituyentes de la leche.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.-Beal VA.(1983)Lactancia en Nutrición en el ciclo de vida. Uteha- Noriega Editores, México pp 195-233.
- 2.-Grulee CG, Sanford HN, Herron PH. (1934) Breast and artificial feeding. JAMA 103:735-748
- 3.-American Academy of Pediatrics Committee on Nutrition. (1976)Commentary on breast feeding and infant formulas including proposed standars for formulas. Pediat 57:278-285
- 4.- Guthrie H, Guthrie G. (1966) The resurgence of natural child feeding. Clin Pediat 5: 481-484.
- 5.- Jackson EB, Wilkin LC, Auerbach H. (1956) Statistical report on incidence and duration of breast feeding in relation to personal-social and hospital maternity factors. Pediat 17:700-715
- 6.- Robertson WO. (1961) Breast feeding practices: Some implications of regional variations. Am J Pub Health 51:1035-1042.
- 7.- Hohnson JD. (1975). Neonatal nonhemolytic jaundice. N Engl J Med 292:194-197
- 8.-Gould SF.(1983) Anatomy of the breast in Lactation, Physiology, nutrition and breast-feeding (Neville Mc, Neifert eds) Plenum Press, New York pp. 23-47.
- 9.- Farina MA, Newby BG, Alani H. (1980) Innervation of the nipple-areola complex. Plast Reconstruct Surg 66:497-501.
- 10.- Miller MR, Kasahara M (1959). The cutaneous innervation of the human female breast. Anat Rec 135: 153-157.

- 11.- Turner-Warwick RT.(1959) **The lymphatics of the breast.** Br J Surg 46:574-582. Referido en el número 8.
- 12.- Arey LB.(1965) **Developmental Anatomy** 7th. Ed. Saunders, Philadelphia pp. 449-453.
- 13.- Daniel CW, Silberstein GB.(1987) **Postnatal development of the rodent mammary gland in The mammary gland, development, regulation and function** (Neville MC, Charles WD, eds) Plenum Press. New York pp. 3-36.
- 14.- Masters JR, Drife JO, Scarisbrick. (1977) **Cyclic variations of DNA synthesis in human breast epithelium.** J Natl Cancer Inst 58:1263-1265.
- 15.- Tanner JM. (1962) **The development of the reproductive system. Growth at Adolescence** Blackwell Scientific. Oxford pp. 28-39.
- 16.- Tobon H, Salazar, H. (1974) **Ultrastructure of the human mammary gland. I.- Development of the fetal gland throughout gestation.** J Clin Endocrinol Metab 39:443-456.
- 17.- Russo J, Russo IH. (1987) **Development of the human mammary gland in The mammary gland, development, regulation and fuction** (Neville MC, Charles WD, eds) Plenum Press. New York pp. 67-93.
- 18.- Ferguson DPJ, Anderson TJ. (1981) **Morphological evaluation of cell turnover in relation to the menstrual cycle in the "resting" human breast.** Br J Cancer 44: 177-181.
- 19.- Ingleby H, Gershon-Cohen J. (1960) **The normal breast in Comparative Anatomy, Pathology and Roentgenology of the**

breast. University of Press, Philadelphia pp. 3-119.

20.- Hicken N. (1937) **Mammography: The roentgenographic diagnosis of breast tumors by means of contrast media.** Surg Gynec Obstet 64: 593-603. Referido en el número 8..

21.- Pourcho R, Bernstein M, Gould S. (1978) **Malachite green: Applications in electron microscopy.** Stain Tech 53: 29-35.

22.- Pitelka D. (1978) **Cell contacts in the mammary gland, in Lactation: A comprehensive treatise, Volume IV** (B.L Larson and V.R Smith, ed) Academic Press, New York, pp.41-66.

23.- Lascelles A, Lee CS.(1978) **Involution of the mammary gland in Lactation. A comprehensive treatise, Volume IV** (B.L Larson and V.R Smith,ed) Academic Press, New York pp 115-177.

24.- Levin ML, Sheehe PR, Graham S, Glidewell O. (1964) **Lactation and menstrual function as related to cancer of the breast.** Am J Public Health 54:580-587.

25.- Mc. Williams, Boime I. (1980) **Cytological localization of placental lactogen messenger ribonucleic acid in syncytiotrophoblast layers of human placenta.** Endocrinology 107: 761-765.

26.- Bern HA. (1975) **Prolactin and osmoregulation.** Am Zool 15: 937-948.

27.- Kleinberg DL, Todd J. (1980) **Evidence that human growth hormone is a potent lactogen in primates.** J Clin Endocrinol Metab 51: 1009-1013.

28.- Wallis M (1975). **The molecular evolution of pituitary hormones.** Biol Rev 50:35-98.

- 29.- Cooke NE, Coit D, Shine J, Baxter JD, Martial JA. (1981) **Human prolactin cDNA structural analysis and evolutionary comparisons.** J Biol Chem 256: 4007-4016.
- 30.- Owerbach D, Rutter WJ, Martial JA, Baxter JD, Shows TB. (1980) **Genes for growth hormone, chorionic somatomammotropin and growth hormone like gene are on chromosome 17 in humans.** Science 209:289-292.
- 31.- Del Pozo E, Brownell J. (1979) **Prolactin I. Mechanisms of control, peripheral actions and modification by drugs.** Horm Res 10: 143-172.
- 32.- Goldsmith PC, Cronin MJ, Weiner RI. (1979) **Dopamine receptor sites in the anterior pituitary.** J Histochem Cytochem 27: 1205-1207.
- 33.- Labrie F, Ferland L, Di Paolo T, Veilleux R. (1980) **Modulation of prolactin secretion by sex steroids and thyroid hormones,** in: Central and Peripheral regulation of Prolactin Function (R. Macleod and U. Scapagnini, eds) Raven Press, New York, pp. 97-113.
- 34.- Potter E, Nicolaisen AK, Ong ES, Evans RM, Rosenfeld MG. (1981) **Thyrotropin-releasing hormone exerts rapid nuclear effects to increase production of the primary prolactin mRNA transcript.** Proc Natl Acad Sci USA 78: 6662-6666.
- 35.- Teyssot B, Houdebine LM. (1980) **Role of PRL in the transcription of β -casein and 28 S ribosomal genes in the rabbit mammary gland.** Eur J Biochem 110 : 236-272.
- 36.- Teyssot B, Houdebine LM. (1981) **Induction of casein**

synthesis by prolactin and inhibition by progesterone in the pseudopregnant rabbit treated by colchicine without any simultaneous variations of caseins mRNA concentration. Eur J Biochem 117: 563-568.

37.- Houdebine LM. (1977) Distribution of casein mRNA between free and membrane-bound polysomes during induction of lactogenesis in the rabbit. Mol Cell Endocrinol 7:125-135.

38.- Wilde CJ, Paskin SJ, Mayer RJ.(1980)Protein degradation during terminal cytodifferentiation. Biochem J 192: 311-320.

39.- Ways J, Markoff E, Ogren L, Talamantes F.(1979) Lactogenic response of mouse mammary explants from different days of pregnancy to placental lactogen and pituitary prolactin. In vitro 15 : 891-894.

40.- Nolin JM, Witorsch RJ.(1976) Detection of endogenous immunoreactive prolactin in rat mammary epithelial cells during lactation. Endocrinology 99: 949-958.

41.- Nolin JM. (1979) The prolactin incorporation cycle of the milk secretory cells. J Histochem Cytochem 27:1203-1204.

42.- Suard YML, Kraehenbuhl JP, Aubert ML. (1979) Dispersed mammary epithelial cells: Receptors of lactogenic hormones in virgin, pregnant, and lactating rabbits. J Biol Chem 254:10466-10475.

43.- Djiane J, Houdebine LM, Kelly PA. (1981) Prolactin-like activity of anti-prolactin receptor antibodies on casein DNA synthesis in the mammary gland. Proc Natl Acad Sci USA 78:7445-7448.

- 44.- Houdebine LM, Djiane J. (1980) Effects of lysomotropic agents, and of microfilament and microtubule-disrupting drugs on the activation of casein-gene expression by prolactin in the mammary gland. Mol Cell Endocrinol 17: 1-15.
- 45.- Teyssot B, Houdebine LM, Djiane J. (1981) Prolactin induces release of a factor from membranes capable of stimulating β -casein gene transcription in isolated mammary cell nuclei. Proc Natl Acad Sci USA 78 : 6729-6733.
- 46.- Josimovich JB, McLaren JA. (1962) Presence in the human placenta and serum of a highly lactogenic substance immunologically related to pituitary growth hormone. Endocrinology 71: 209-220.
- 47.- Li CH, Grumbach MM, Kaplan SL, Josimovich JB, Friesen H, Catt KL. (1968) Human chorionic somato-mammotropin (HCS) proposed terminology for designation of a placental hormone. Experientia 24: 1288.
- 48.- Vigneri R, Squatrito S, Pezzino V, Cinquerui E, Proto S, Montoneri C. (1975) Spontaneous fluctuations of human placental lactogen during normal pregnancy. J Clin Endocrinol Metab 40: 506-509.
- 49.- Bigazzi M, Ronga R, Lancranjan I, Ferraro S, Branconi F, Buzzoni P, Martorana V, Scarselli GF, Del Pozo E. (1979) Pregnancy in an acromegalic woman during bromocriptine treatment: Effects on growth hormone and prolactin in the maternal, fetal and amniotic compartments. J Clin Endocrinol Metab. 48: 9-12.

- 50.- Beck P, Daughaday WH.(1967) Human placental lactogen: Studies of its acute metabolic effects and disposition in normal man. J Clin Inves 46:103-110
- 51.- Neville MC. (1983) Cellular and molecular aspects of the hormonal control of mammary function in Lactation, Physiology, nutrition and breast feeding (Neville MC Neifert MR eds) Plenum Press, New York pp. 141-177.
- 52.- Hertz J, Andersen AN, Larsen JF. (1978) Correlation between prolactin and progesterone, oestradiol 17 β and oestriol during early human pregnancy. Clin Endocrinol 9:97-100.
- 53.-Lippman MM, Bolan G, Huff K. (1976) The effects of estrogens and antiestrogen on hormone-responsive human breast cancer in long-term tissue culture. Cancer Res 36: 4595-4601.
- 54.- Allegra JC, Lippman ME. (1978) Growth of a human breast cancer cell line in serum-free hormone-supplemented medium. Cancer Res 38: 3823-3828.
- 55.- Sirbasku DA. (1978) Estrogen induction of growth factors specific for hormone-responsive mammary pituitary and kidney tumor cells. Proc Natl Acad Sci USA 75: 3786-3790.
- 56.- Shymala G, Nandi S.(1972) Interactions of 6,7 3 H-17 β estradiol with the mouse lactating mammary *in vivo* and *in vitro*. Endocrinology 91: 861-867.
- 57.- Haslam SZ, Shymala G. (1981) Relative distribution of estrogen and progesterone receptors among the epithelial, adipose, and connective tissue components of the normal

mammary gland. Endocrinology 108:825-830.

58.- Bohnet HG, Gomez F, Friesen HG. (1977) PRL and estrogen binding sites in the mammary gland of the lactating and non-lactating rat. Endocrinology 101:1111-1121.

59.- Maule Walker FM, Peaker M. (1978) Production of oestradiol- 17 β by the goat mammary gland during late pregnancy in relation to lactogenesis. J Physiol 284: 71P.

60.- Nolin JM, Bogdanove EM. (1980) Effects of estrogen on prolactin incorporation by lutein and milk secretory cells and on pituitary prolactin secretion in the post-partum rat: Correlations in target cell responsiveness to prolactin. Biol. Reprod. 22:393-416.

61.- Topper YJ, Freeman CS. (1980) Multiple hormone interactions in the developmental biology of the mammary gland. Physiol Rev 60:1049-1106

62.- Stoudemire GA, Stumpf WE, Sar M. (1975) Synergism between prolactin and ovarian hormones on DNA synthesis in rat mammary gland. Proc Soc Exp Biol Med 149:189-192.

63.- Kuhn NJ. (1977) Lactogenesis: The search for trigger mechanisms in different species, in Comparative Aspects of Lactation (M.Peake, ed)Academic Press, New York, pp. 165-192.

64.- Kuhn NJ. (1969)Progesterone withdrawal as the lactogenic trigger in the rat. J Endocrinol 44: 39-54.

65.- Turkington RW, Hill RL.(1969)Lactose synthetase: progesterone inhibition of the induction of α -lactalbumina. Science 163: 1458-1460.

- 66.- Teyssot B, Houdebine LM. (1981) Role of progesterone and glucocorticoids in the transcription of the β -casein and 28-S ribosomal genes in the rabbit mammary gland. Eur J Biochem 114: 597- 608.
- 67.- Haslam SZ, Shymala G. (1979) Progesterone receptors in normal mammary glands of mice: Characterization and relationship to development. Endocrinology 105: 786-795
- 68.- Mohla S, Clem-Jackson N, Hunter JB. (1981) Estrogen receptors and estrogen-induced gene expression in the rat mammary glands and uteri during pregnancy and lactation: Changes in progesterone receptor and RNA polymerase activity. J Steroid Biochem 14:501-508.
- 69.- Shymala G, McBalin WA. (1979) Distinction between progestin and glucocorticoid-binding sites in mammary glands. Biochem J 178:345- 352.
- 70.- Haslam SZ, Shymala G. (1980) Progesterone receptors in normal mammary gland: Receptor modulations in relation to differentiation. J Cell Biol 86: 730-737.
- 71.- Lloyd RV. (1979) Studies on the progesterone receptor constant and steroid metabolism in normal and pathological human breast tissues. J Clin Endocrinol Metab 48: 585-593.
- 72.- Cowie AT, Lyons WR. (1959) Mammatogenesis and lactogenesis in hypophysectomized, ovariectomized, adrenalectomized rats. J Endocrinol 19: 29-32.
- 73.- Shymala G. (1973) Specific cytoplasmic glucocorticoid hormone receptors in lactating mammary glands. Biochemistry

12: 3085-3090

74.- Ganguly R, Ganguly N, Mehta NM, Banerjee. (1980) **Absolute requirement of glucocorticoid for expression of the casein gene in the presence of prolactin.** Proc Natl Acad Sci USA 77: 6003-6006.

75.- Klevjer-Anderson P, Buehring GC. (1980) **Effect of hormones on growth rates of malignant and nonmalignant human mammary epithelia in cell culture.** In vitro. 16: 491-501.

76.- Ray DB, Horst IA, Jansen RW, Mills NC, Kowal J. (1981) **Normal mammary cells in long term culture. II. Prolactin, corticosterone, insulin, and triiodothyronine effects on α -lactalbumin production.** Endocrinology 108: 584-590.

77.- Devinoy E, Houdebine LM, Delouis C. (1978) **Role of prolactin and glucocorticoids in the expression of casein genes in rabbit mammary gland organ culture. Quantification of casein mRNA.** Biochim Biophys Acta 517: 360-366.

78.-Devinoy E, Houdebine LM.(1977) **Effects of glucocorticoids on casein gene expression in the rabbit.** Eur J Biochem 75:411-416.

79.- Ono M, Oka T. (1980) **α -lactalbumin-casein induction in virgin mouse mammary explants; Dose-dependent differential action of cortisol.** Science 207: 1367-1369.

80.- Ono M, Oka T.(1980)**The differential actions of cortisol on the accumulation of α -lactalbumin and casein in midpregnant mouse mammary gland in culture.** Cell 19: 473-480.

81.- Oka T, Perry JW. (1974) **Spermidine as a possible**

mediator of glucocorticoid effect on milk protein synthesis in mouse mammary epithelium in vitro. *J Biol Chem* 249:7647-7652.

82.- Bolander FF Jr, Topper YJ. (1979) Relationships between spermidine, glucocorticoid and milk proteins in different mammalian species. *Biochem Biophys Res Comm* 90: 1131-1135.

83.- Peters JM, Van Marle J, Ariens ATH. (1979) Hormonal effects on rat mammary gland in vitro. *Acta Endocrinol* 92: (Suppl 228)1-190.

84.- Walters E, McLean P. (1968) Effect of alloxan diabetes and treatment with anti-insulin serum on pathways of glucose metabolism in lactating rat mammary gland. *Biochem J* 109: 407-417.

85.- Vonderhaar BK. (1977) Studies on the mechanism by which thyroid hormones enhance α -lactalbumin activity in explants from mouse mammary glands. *Endocrinology* 100: 1423-1431.

86.- Robinson AM, Girard JR, Williamson DH. (1978) Evidence for a role of insulin in the regulation of lipogenesis in lactating rat mammary gland. *Biochem J* 176: 343-346.

87.- Aguis L, Rollis BJ, Rowe EA, Williamson DH. (1980) Impaired in mammary glands of lactating rats fed on cafeteria diet. *Biochem J* 186: 1005-1008.

88.- Field B, Coore HG. (1976) Control of rat mammary gland pyruvate dehydrogenase by insulin and prolactin. *Biochem J* 156:333-337.

89.- Baxter MA, Coore HG. (1978) The mode of regulation of

- pyruvate dehydrogenase of lactating rat mammary gland. Effects of starvation and lactation. *Biochem J* 174: 533-561.
- 90.- Vonderhaar BK, Greco A. (1979) Lobulo-alveolar development of mouse mammary glands is regulated by thyroid hormones. *Endocrinology* 104:409-418.
- 91.- Hart IC, Morant SV. (1980) Roles of prolactin, growth hormone, insulin and thyroxine in steroid-induced lactation in goats. *J Endocrinol* 84: 343-351.
- 92.- Vonderhaar BK. (1975) A role of thyroid hormones in differentiation of mouse mammary gland in vitro. *Biochem Biophys Res Comm* 67: 1219-1225.
- 93.- Vonderhaar BK. (1979) Lactose synthetase activity in mouse mammary glands is controlled by thyroid hormones. *J Cell Biol* 82: 675-681.
- 94.- Houdebine LM, DeLouis C, Devinoy E. (1978) Post transcriptional stimulation of casein synthesis by thyroid hormone. *Biochimie* 60: 809-812.
- 95.- Maule Walker FM, Peaker M. (1980) Local production of prostaglandin in relation to mammary function at the onset of lactation in the goat. *J Physiol* 309: 65-79.
- 96.- Vorherr H, Vorher UF. (1979) Effect of prostaglandins ($F_{2\alpha}$, E_1 , and E_2) on blood pressure and oxytocin-induced intramammary pressure responses in rats. *Endocrinology* 104:989-995.
- 97.- Sapag-Hagar M, Greenbaun AL. (1974) Adenosine 3:5'-monophosphate and hormone interrelationships in the mammary

gland of the rat during pregnancy and lactation. Eur J Biochem 47: 303-312.

98.- Speake BK, Dils R, Mayer RJ.(1976) Regulation of enzyme turnover during tissue differentiation. Interactions of insulin, prolactin and cortisol in controlling the turnover of fatty acid synthesis in rabbit mammary gland in organ culture. Biochem J 154: 359-370.

99.- Lozzi R, Amato P.(1978) Ultrastructural changes in lactating guinea pig mammary gland slices associated with theophylline inhibition of lactose synthesis. Cytobios 22:47-65. Referido en el número 51.

100.- Wilde CJ, Kuhn NJ.(1981) Lactose synthesis and the utilization of glucose by rat mammary acini. Int J Biochem 13: 311-316.

101.- Yang J, Guzman R, Richards J, Imagawa W, McCormick K, Nandi S. (1980) Growth factor and cyclic nucleotide-induced proliferation of normal and malignant mammary epithelial cells in primary culture. Endocrinology 107:35-41.

102.- Peaker M. (1977) The aqueous phase of milk; Ion and water transport in: Comparative Aspects of Lactation (M. Peaker, ed) Academic Press, New York. pp. 113-134.

103.- Smith GH, Vonderhaar BK. (1981) Functional differentiation in mouse mammary gland is attained through DNA synthesis, inconsequent of mitosis. Dev Biol 88: 167-179.

104.- Kurosumi K, Kobayashi Y, Baba N.(1968) The fine structure of mammary glands of lactating rats with special

- reference to the apocrine secretion. *Exp Cell Res* 50:177-192.
- 105.- Peaker M. (1978) Ion and water transport in the mammary gland in: *Lactation: A comprehensive Treatise* (M Peaker Ed) Academic Press, New York pp.437-462.
- 106.- Linzell JL, Parker M. (1975) The distribution and movement of carbon dioxide carbonic acid and bicarbonate between blood and milk in the goat. *J Physiol London* 244: 771-782.
- 107.- Mostov KE, Kraehenbuhl JP, Blabel G. (1980) Receptor-mediated trans-cellular transport of immunoglobulin: Synthesis of secretory component as multiple and larger transmembrane forms. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 7257-7261.
- 108.- Rothman JE. (1981) The Golgi apparatus: Two organelles in tandem. *Science* 213: 1212-1219.
- 109.- Morre DJ, Kartenbeck J, Franke WW. (1979) Membrane flow and interconversions among endomembranes. *Biochem Biophys Acta* 559: 71-152.
- 110.- Franke WW, Luder MR, Kartenbeck J, Zerban H, Keenan TW. (1976) Involvement of vesicle coat material in casein secretion and surface regeneration. *J Cell Biol* 69: 173-195.
- 111.- Powell JT, Jarlfors U, Brew K. (1977) Enzymatic characteristics of fat globule membranes from bovine colostrum and bovine milk. *J Cell Biol* 72: 617-627.
- 112.- Kulski JK, Hartmann PE. (1981) Changes in human milk composition during the initiation of lactation. *Aust J Exp*

Biol Med Sci 59:101-114.

113.- Ramadan MA, Salah MM, Eid SZ.(1972) **Effect of breast infection on the composition of human milk.** Int J Biochem 3: 543-548.

114.- Conner AE.(1979) **Elevated levels of sodium and chloride in milk from mastitic breast.** Pediatrics 63: 910-911.

115.- Hartmann PE, Kulski JK.(1978) **Changes in the composition of the mammary secretion of women after abrupt termination of breast feeding.** J Physiol 275: 1-11.

116.- Ho FCS, Wong RLC, Lawton JWM. (1979) **Human colostrum and breast milk cells, a light and electron microscopic study.** Acta Pediatr Scand 68: 389-396.

117.- Brooker E. (1980) **The epithelial cells and cell fragments in human milk.** Cell Tissue Res 210: 321-332.

118.- Helminen HJ, Ericson JLE. (1968) **Studies on mammary gland involution** J Ultrastruct Res 25:202-239.

119.- Seelig LL Jr., Beer AE.(1978) **Transepithelial migration of leukocytes in the mammary gland of lactating rats.** Biol Reprod 17: 736-744.

120.- Seelig LL Jr, Beer AE.(1981) **Intraepithelial leukocytes in the human mammary gland.** Biol Reprod 22: 1157-1163.

121.-Ardran GM, Kemp FH, Lind JA. (1958) **A cineradiographic study of bottle feeding.** Br J Radiol 31: 11-22.

122.- Newton M, Newton NR. (1948) **The let-down reflex in human lactation.** J Pediatr 33: 698-704.

123.- Hanwell A, Linzell JL. (1973) **The effects of**

engorgement with milk and of suckling on mammary blood flow in the rat. *J Physiol* 233: 111-125.

124.- Linzell JL. (1974) Mammary blood flow and methods of identifying and measuring precursors of milk in Lactation. A comprehensive, treatise, Volume I (B.L Larson and V.R Smith, ed) Academic Press New York pp. 143-225.

125.- Linzell JL.(1960) Mammary-gland blood flow and oxygen, glucose and volatile fatty acid uptake in the conscious goat. *J Physiol* 153: 492-509.

126.- Anderson NG, Powers MT, Tollaksen SL. (1982) Proteins of human milk. I. Identification of major components. *Clin Chem N.Y.* 28: 1045-1055.

127.- Bezkorovainy A.(1977) Human milk and colostrum proteins: A review. *J Dairy Sci* 60: 1023-1037.

128.-Jenness R. (1974) The composition of human milk in Lactation. A comprehensive Treatise Volume III.(B.L. Larson and V.R. Smith eds) Academic Press. New York pp. 3-107.

129.- Farell HM Jr.(1976) Models for casein micelle formation. *J Dairy Sci* 56:1195-1206.

130.- Mercier JC, Chobert JM, Addeo F. (1976) Comparative study of the aminoacid sequences of the caseinomacropeptides from seven species. *FEBS Lett* 72: 208-214.

131.-Neville MC, Allen JC, Watters C.(1983)Mechanisms of milk secretion in Lactation, Physiology, nutrition and breast feeding (Neville MC Neifert MR eds) Plenum Press, New York pp. 49-102.

- 132.-Phillippy BO, Mc Carthy RD. (1979) Multi-origins of milk serum albumin in the lactating goat. *Biochim Biophys Acta* 584: 298-303.
- 133.- Franke WW, Heid HW, Grund C, Winter S, Freudenstein C, Schmid EJ, Keenan TW.(1981) Antibodies to the major insoluble milk fat globule membrane-associated protein: Specific location in apical regions of lactating epithelial cells. *J Cell Biol* 89: 485-494
- 134.- Rassin DK, Sturman JA, Gaull GE. (1978) Taurine and other free aminoacids in milk of man and other mammals. *Early Human Dev* 2: 1-13
- 135.- Linzell JL. (1967) The magnitude and mechanisms of the uptake of milk precursors by the mammary gland. *Nutr. Soc. Symp. Proc.* 27: 44-52
- 136.- Lingappa VR, Lingappa JR, Prasad R, Ebner KE, Bolbel G.(1978) Coupled cell-free synthesis, segregation and core glycosylation of a secretory protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 2338-2342.
- 137.- Jolles P, Fiat AM.(1979) The carbohydrate portions of milk glycoproteins. *J Dairy Res* 46: 187-191
- 138.- Greenberg R, Groves ML, Peterson RF.(1976) Amino terminal sequence and location of phosphate groups of the major human casein. *J Dairy Sci.* 59: 1016-1018.
- 139.- McGann TCA, Donnelly WJ, Kearney RD, Buchheim W.(1980) Composition and size distribution of bovine casein micelles. *Biochim Biophys Acta* 630: 261-270.

- 140.- Wilde CJ, Paskin N, Saxton J, Mayer RJ. (1980) Protein degradation during terminal cytodifferentiation. *Biochem J* 192: 311-320.
- 141.- Fisher MM, Nagy B, Bazin H, Underdown BJ. (1979) Biliary transport of IgA: Role of secretory component. *Proc Nat Acad Sci USA* 76: 2008- 2012.
- 142.- Ono M, Oka T.(1980) The differential actions of cortisol on the accumulation of α -lactalbumin and casein in midpregnant mouse mammary gland in culture. *Cell* 19:473-480.
- 143.- Brew K, Hill RL. (1975) Lactose Biosynthesis *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 72:103-158.
- 144.- Chaiyabutr N, Faulkner A, Peaker M. (1980) The utilization of glucose for the synthesis of milk components in the fed and starved lactating goat in vivo. *Biochem J* 186: 301-308.
- 145.- Lehninger AC.(1975)*Biochemistry*, Worth, New York pp.47.
- 146.- Brew K. (1969) Secretion of α -lactalbumin into milk and its relevance to the organization and control of lactose synthetase. *Nature* 222: 671-672.
- 147.- Kuhn NJ, White A.(1977) The role of nucleoside diphosphatase in a uridine nucleotide cycle associated with lactose synthesis in rat mammary gland Golgi apparatus. *Biochem J* 168: 423-433.
- 148.- Nicholas KR, Hartmann PE, Mc Donald BI.(1981) α -lactalbumin, and lactose concentrations in rat milk during lactation. *Biochem J* 194: 149-154.

- 149.-Powell JT, Brew K. (1976) Metal Ion-activation of galactosyltransferase. J Biol Chem 251: 3645-3652.
- 150.- Neville MC, Peaker M. (1979) The secretion of calcium, and phosphorus into milk. J Physiol 290: 59-67.
- 151.- Linzell JL, Mepham TB, Peaker M. (1976) The secretion of citrate into milk. J Physiol 260: 739-750.
- 152.- Neville MC, Selker F, Semple K, Watters C. (1981). ATP-dependent calcium transport by a Golgi-enriched membrane fraction from mouse mammary gland. J Membr Biol 61: 97-105.
- 153.- Carafoli E, Crompton M. (1978) The regulation of intracellular calcium. Curr Topics Membr Trans 10: 151-216.
- 154.- Bauman DE, Davis CL.(1974) Biosynthesis of milk fat in Lactation, Volume II (B L. Larson and V.R. Smith, eds) Academic Press, New York pp. 31-75.
- 155.- Hytten FE. (1954) Clinical and chemical studies in human lactation Br Med J 2: 175-182.
- 156.- Jensen RG, Clark RM, Ferfi AM. (1980) Composition of the lipids in human milk. A review. Lipids 15: 345-355.
- 157.- Crawford MA, Laurance BM, Munhambo AE. (1977) Breast feeding and human milk composition. Lancet 1:99-100.
- 158.- Guthrie HA, Picciano MF, Sheehe D. (1977) Fatty acid patterns of human milk. J Pediatr 90: 39-41.
- 159.- Robinson AM, Williamson DH.(1977) Comparison of glucose metabolism in the lactating mammary gland of the rat in vivo and in vitro. Biochem J 164 : 153-159.
- 160.- Katz J, Wals PA, Van de Velde RL.(1974) Lipogenesis by

acini from mammary gland of lactating rats. J Biol Chem 249: 7348-7357.

161.- Knudsen J, Grunnet I. (1980) Primer specificity of mammalian mammary gland fatty acid synthetases. Biochem Biophys Res Commun 95:1808-1814.

162.- Dodds PF, Guadalupe M, Guzman F, Chalberg SC, Anderson GJ, Kumar S. (1981) Acetoacetyl CoA reductase activity of lactating bovine mammary fatty acid synthetases. J Biol Chem 256: 6282-6290.

163.- Hansen JK, Knudsen J.(1980) Transacylation as a chain-termination mechanism in fatty acid synthesis by mammalian fatty acid synthetase. Biochem J 186: 287-294.

164.- Smith S, Ryan P. (1979) Asynchronous appearance of two enzymes concerned with medium chain fatty acid synthesis in developing rat mammary. J Biol Chem 254 : 8932-8936.

165.- Baxter MA, Goheer MA, Coore HG.(1979) Absent pyruvate inhibition of pyruvate dehydrogenase kinase in lactating rat mammary gland following various treatments. FEBS Lett 97:27-31.

166.- Scow RO, Blanchette-Mackie EJ, Smith LC. (1976) A model for lipid transport from blood by lateral diffusion in cell membranes. Circulation Res 39: 149-162.

167.-Scow RO, Mendelson CR, Zinder O, Hamosh M, Blanchette-Mackie EJ. (1973) Role of lipoprotein lipase in the delivery of dietary fatty acids to lactating mammary tissue in: Dietary lipids and postnatal development (C.Galli, ed) Raven

Press, New York pp. 91-114.

168.- Steingrimsdottir L, Brasel JA, Greenwood MRC.(1980) Diet, pregnancy and lactation: Effects on adipose tissue, lipoprotein lipase, and fat cell size. *Metabolism* 29:837-841.

169.-Long CA, Patton S, McCarthy RD.(1980) Origins of the cholesterol in milk. *Lipids* 15: 853-857.

170.-Mellies MJ,Burton K,Larsen R,Fixler D,Glueck CJ. (1979) Cholesterol, phytosterols and polyunsaturated/saturated fatty acid ratios during the first twelve months of lactation. *Am J Clin Nutr* 30: 2382-2389.

171.- Easter DJ, Patton S, McCarthy RD. (1971) Metabolism of phospholipid in mammary gland: I: The supply of phospholipid for milk synthesis in the rat and goat. *Lipids* 6: 844-849.

172.- Hernell O, Gebre-Medhin M, Olivecrona T. (1977) Breast milk composition in Ethiopian and Swedish mothers IV milk lipases. *Am J Clin Nutr* 30: 508-511.

173.- Poland RL, Schultz G, Garg G. (1980) High milk lipase activity associated with breast milk jaundice. *Pediatr Res* 14: 1328-1331.

174.- Johnson MP, Wooding FBP. (1978) Adenosine triphosphatase distribution in mammary tissue. *Histochem J* 10:171-183.

175.- Linzell JL, Peaker M. (1974) Changes in colostrum composition and in the permeability of the mammary epithelium at about the time of parturition in the goat. *J Physiol* 243:129-151.

- 176.- Bisbee CA. (1981) Transepithelial electrophysiology of cultured mouse mammary epithelium: Sensitivity to prolactins. Am J Physiol 241: E410-E413.
- 177.- Peaker M. (1977) Mechanism of milk secretion; Milk composition in relation to potential difference across the mammary epithelium. J Physiol 270: 489-505.
- 178.- Martin RH, Glass MR, Chapman C, Wilson GD, Woods KL. (1980) Human α -lactalbumin and hormonal factors in pregnancy and lactation. Clin Endocrinol 13: 223-230.
- 179.- Neville MC, Peaker M. (1981) Ionized calcium in milk and integrity of the mammary epithelium in the goat. J Physiol 313: 561-570.
- 180.- Brook JH.(1980) Lactoferrin in human milk: Its role in iron absorption and protection against enteric infection in the newborn infant. Arch Dis Child 55: 417-421.
- 181.- Dauncey MJ, Shaw JCL, Urman J. (1977) The absorption and retention of magnesium, zinc and copper by low birth weight infants fed pasturized human breast milk. Pediatr Res 11: 1033-1039.
- 182.- Cousins RJ, Smith KT.(1980) Zinc-binding properties of bovine and human milk in vitro: Influences on changes in zinc content. Am J Clin Nutr 33: 1083-1087.
- 183.- Zimmerman AW, Hambidge KM.(1980) Low zinc in mothers milk and zinc deficiency syndrome in breast fed premature infants.Am J Clin Nutr 33: 951.
- 184.- Miller JK, Swanson EW.(1963) Some factors affecting

iodine secretion in milk. J Dairy Sci 46: 927-932.

185.- Potter GD, McIntyre DR.(1968) In vitro analysis of the binding of ¹³¹Iodine to milk protein. J Dairy Sci 51:1177-1181

186.- Allen JC, Miller WJ.(1980) Selenium binding and distribution in goat and cows milk. J Dairy Sci 63: 526-531.

187.- Allen JC, Miller WJ. (1981) Transfer of selenium from blood to milk in goats and noninterference of copper with selenium metabolism. J Dairy Sci 64: 814-821.

188.- Clarke WA, Salisbury RL. (1980) Dimethyl Sulfide in milk of lactating dairy cows fed various sulfur compounds. J Dairy Sci 63: 375-378.

189.- Sandberg DP, Begley JA, Hall CA. (1981) The content, binding and forms of vitamin B₁₂ in milk. Am J Clin Nutr 34:1717-1724.

190.- Racker E. (1980) From Pasteur to Mitchell: a hundred years of bioenergetics. Fed Proc 39:2:210-215.

191.- Burk, D. (1939) Colloquial consideration of Pasteur and neo-Pasteur effects. Spring Harbor Symp Quant Biol. Referido en el número 190.

192.- Johnson MJ.(1941) The role of aerobic phosphorylation in the Pasteur effect. Science 94: 200-202

193.- Uyeda K, Racker E.(1965) Regulatory mechanisms in carbohydrate metabolism. VIII Hexokinase and phosphofructokinase. J Biol Chem 240: 4682-4688.

194.- Racker E, Krinsky I. (1952) The mechanism of oxidation

- of aldehydes by gliceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase. J Biol Chem 198:731- 743.
- 195.- Gatt S, Racker E.(1959) Regulatory mechanisms in carbohydrate metabolism. I Crabtree effect in reconstructed systems. J Biol Chem 234: 1015-1023.
- 196.- Gatt S, Racker E.(1959) Regulatory mechanisms in carbohydrate metabolism II. Pasteur effect in reconstructed systems. J Biol Chem 234: 1024-1028.
- 197.- Mitchell P. (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemioscotic type of mechanism. Nature London 191: 144-148.
- 198.- Keilin D. (1925) On cytochrome, a respiratory pigment, common to animals, yeast and higher plants. Proc Roy Soc B98: 312: 312-339.
- 199.-Kalckar HM. (1937) Phosphorylation in kidney tissue. Enzymologia 2: 47-52. Referido en el número 190.
- 200.- Kalckar HM.(1941) The nature of energetic coupling in biological syntheses. Chem Rev 28:71-178. Referido en el número 190.
- 201.- Lipmann F.(1941) Metabolic generation and utilization of phosphate bond energy. Adv Enzymol 1: 99-162.
- 202.- Belitser VA, Tsibakova ET. (1939) The mechanism of phosphorylation asociated with respiration. Biokhimiya 4:516-535 Referido en el número 190.
- 203.- Ochoa S. (1943) Efficiency of aerobic phosphorylation in cell-free heart extracts. J Biol Chem 151: 498-505.

- 204.-Lehninger AL. (1955) Oxidative phosphorylation. Harvey Lect 49:176- 215.
- 205.- Chance B, Williams GR. (1955) Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. III.- The steady state. J Biol Chem 217: 409-427.
- 206.- Lardy HA, Elvehjem CA. (1945) Biological oxidations and reductions. Ann Rev Biochem 14: 1-30.
- 207.- Lardy HA, Johnson D, McMurray WC.(1958) Antibiotics as tools for metabolic studies. I. A survey of toxic antibiotics in respiratory, phosphorylative and glycolytic systems. Arch Biochem Biophys 78: 587-597.
- 208.- Cohn M, Drysdale GR.(1955)A study with O^{18} of ATP formation in oxidative phosphorylation. J Biol Chem 216:831-846.
- 209.- Slater EC. (1953) Mechanism of phosphorylation in the respiratory chain. Nature (London) 172: 975-978.
- 210.- Racker, E. (1970) The two faces of the inner mitochondrial membrane. Essays Biochem 6: 1-22.
- 211.- Jagendorf AT, Uribe E.(1966) ATP formation caused by acid-base transition of spinach chloroplasts. Proc Natl Acad Sci USA 55:170- 177.
- 212.- Hinkle PC, Kim JJ, Racker E. (1972)Ion transport and respiratory control in vesicles formed from cytochrome oxidase and phospholipids. J Biol Chem 247: 1338-1339.
- 213.-Boyer PD.(1965) Carboxyl activation as a possible common reaction in substrate level and oxidative phosphorylation.

- in Oxidases and related redox systems.(King T.E. Mason, H.S, Morrison, M eds) New York: Wiley: Vol 2, 994.
- 214.- Bruce Alberts, Dennis Bray, Lewis J, Raff Martin (1994). **Molecular Biology of the cell**. Third Edition. Garland Publishing, Inc. pp. 341-365.
- 215.- Hatefi Y. (1985) **ATP synthase (complex V)** Ann Rev Biochem 54:1048-1059
- 216.- Cretin F, Baggetto LG, Denoroy L, Godinot C. (1991) Identification of Fo subunits in the rat liver mitochondrial FoF₁-ATP synthase. Biochim Biophys Acta 1058:141-146.
- 217.- Lewin I. (1957) Xanthine oxidase activity in normal and abnormal growth. Proc Soc Med 50: 563-570.
- 218.- Tucker HA, Reece RP. (1962) Nucleic acid estimates of mammary tissue and nuclei. Proc Soc Exp Biol Med 111: 639-642.
- 219.- Simpson AA, Schmidt GH. (1969) Nucleic acid content of rat mammary gland nuclei during pregnancy, lactation and involution. Proc Soc Exp Biol Med 132: 978-983.
- 220.- Rees D, Eversole A. (1964) Rat mammary gland metabolism relative to epithelial and connective tissue content. Am J Physiol 207: 595-600.
- 221.- Jones DH, Rosano TG. (1972) Studies of mitochondrial development prior to lactogenesis in the mouse mammary gland. Arch Biochem Biophys 153:130-138.
- 222.- Huang CM, Keenan TW. (1971) Membranes of mammary gland. I.- Bovine mammary mitochondria. J Dairy Sci 54: 1395-1405.
- 223.- Folley SJ, French TH. (1949) The intermediary

metabolism of the mammary gland. 1.- Respiration of lactating mammary gland slices in presence of carbohydrates. Biochem J 45: 117-125.

224.- Folley SJ, French TH. (1949) The intermediary metabolism of the mammary gland. 2.- Respiration and acid production of mammary tissue during pregnancy, lactation and involution in the rat. Biochem J 45: 270-275.

225.-Rosano GT, Jones HD.(1976) Developmental changes in mitochondria during the transition into lactation in the mouse mammary gland. I.- Behavior on isopycnic gradient centrifugation. J Cell Biol 69: 573-578.

226.- Rosano TG, Lee SK, Jones HD. (1976) Developmental changes in mitochondria during the transition into lactation in the mouse mammary gland. II.- Membrane marker enzymes and membrane ultrastructure. J Cell Biol 69: 581-588.

227.-Folley SJ, Greenbaum AL. (1947) Changes in the arginase and alkaline phosphatase contents of the mammary gland and liver of the rat during pregnancy, lactation and mammary involution. Biochem J 41: 261-269.

228.- Folley SJ, Greenbaum AL. (1948) Effect of adrenalectomy on the arginase levels of liver, mammary gland and kidney in lactating rats studied by the paired feeding technique. Biochem J 43: 581-584.