

78  
2eq



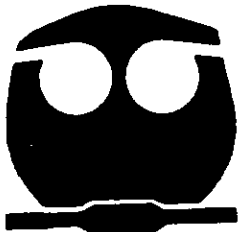
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

"EXPRESION GENICA DE LOS TRANSPORTADORES  
DE AMINOACIDOS EN TEJIDO MAMARIO DE  
RATA"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUÍMICA FARMACEUTICA BIÓLOGA  
P R E S E N T A :  
DULCE ADRIANA MATA ESPINOSA



MEXICO, D. F.



264129

1998

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUÍMICA



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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 asignado:**

<b>Presidente</b>	Profesora María Teresa Romero Avila
<b>Vocal</b>	Profesora María Eugenia Torres Márquez
<b>Secretario</b>	Profesora Nimbe Torres y Torres
<b>1er Suplente</b>	Profesora Raquel Ortega Muñoz
<b>2do Suplente</b>	Profesora Carmen Giral Barnés

Sitio donde se desarrollo el tema: Departamento de Fisiología de la Nutrición

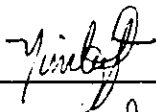
Laboratorio de Nutriología Molecular del

Instituto Nacional de la Nutrición

" Salvador Zubirán "

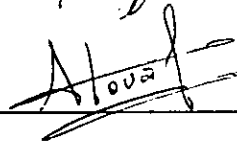
Firma

Asesor del tema      Dra. Nimbe Torres y Torres



---

Supervisor técnico      Dr. Armando Tovar Palacio



---

Sustentante      Dulce Adriana Mata Espinosa



---

# INDICE

## 1. INTRODUCCIÓN

	Página
1.1 Generalidades de los sistemas de transporte en mamíferos.	1
1.1.1. Sistemas de transporte para aminoácidos zwitteriónicos.	3
1.1.1.1.Sistema A.	3
1.1.1.2.Sistema ASC.	4
1.1.1.3.Sistema L.	5
1.1.1.4.Sistema N.	5
1.1.1.5.Sistema de $\beta$ -aminoácidos.	5
1.1.1.6.Sistema de glicina.	6
1.1.1.7.Sistema de prolina.	7
1.1.2.Sistemas de transporte para aminoácidos ácidos y básicos.	7
1.1.2.1.Sistema de transporte de aminoácidos ácidos.	7
1.1.2.1.1.Sistema XAG <sup>-</sup> o Transportadores de aminoácidos excitatorios TAAE.	8
1.1.2.2. Sistemas de transporte de aminoácidos básicos.	8
1.1.2.2.1.Sistema $\gamma^+$ .	9
1.1.2.2.2.Sistema TARB o b <sup>0,+</sup> .	10
1.1.2.2.3.Sistema $\gamma^+L$ o 4F2hc	11
1.1.2.2.4.Sistema B <sup>0,+</sup> .	11
1.2.Sistemas de transporte de aminoácidos en el tejido mamario.	11
1.2.1.Sistemas de transporte de aminoácidos zwitteriónicos.	13
1.2.2.Sistema de transporte de aminoácidos catiónicos.	16
1.2.3.Sistema de transporte de aminoácidos aniónicos.	16
1.3.Anatomía, histología y citología de la glándula mamaria.	17
1.3.1.Modificaciones de las células epiteliales en diferentes etapas fisiológicas de la glándula mamaria.	18
1.4. La lactancia.	20
1.4.1. Hormonas durante la lactancia.	21
1.4.2.Biosíntesis de proteínas por la glándula mamaria a partir de aminoácidos.	22

	Página
1.4.3. Biosíntesis de lípidos por la glándula mamaria a partir de aminoácidos.	24
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>25</b>
<b>3. HIPÓTESIS</b>	<b>25</b>
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>26</b>
4.1. Objetivo general.	26
4.2. Objetivos específicos.	26
<b>5. METODOLOGÍA</b>	<b>27</b>
5.1. Población estudiada.	28
5.2. Extracción de tejidos.	28
5.3. Extracción de ARN total con tiocianato de guanidina/ $\beta$ -mercaptoetanol.	28
5.4. Ultrapurificación de ARN total.	30
5.5. Extracción de ARN total con trizol.	31
5.6. Cuantificación de ARN.	31
5.7. Electroforesis de ARN.	32
5.8. Diseño de oligonucleótidos para los diferentes transportadores.	33
5.8.1. Síntesis química de oligonucleótidos.	34
5.9. Características de los oligonucleótidos diseñados.	36
5.9.1. Transportador de glicina, GLYT 2.	36
5.9.2. Transportador de aminoácidos básicos y neutros, NAA-Tr.	37
5.9.3. Transportador de glutamato y aspartato, GLAST.	38
5.9.4. Transportador de aminoácidos básicos y neutros, D2.	39
5.9.5. Transportador de transporte de aminoácidos catiónicos, TACm-1.	40
5.9.6. Transportador de taurina, rB16a.	41
5.9.7. $\beta$ -actina, control estructural.	42
5.10. RT-PCR (Transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa).	42
5.10.1. Transcripción reversa.	43
5.10.2. Reacción en cadena de la polimerasa.	44
5.11. Electroforesis de ADN.	45
5.12. Fotografías y densitometría.	46
5.12.1. Cálculos	46
5.13. Análisis estadístico.	47

**6. RESULTADOS**

6.1. Expresión de los diferentes transportadores de aminoácidos en riñón.	48
6.2. Expresión de los diferentes transportadores de aminoácidos en cerebro.	49
6.3. Expresión de los diferentes transportadores de aminoácidos en tejido mamario de rata vírgen.	50
6.4. Expresión de los diferentes transportadores de aminoácidos en tejido mamario de rata en el día 12 de lactancia.	51
6.5. Expresión de los diferentes transportadores de aminoácidos en tejido mamario de rata de 24 horas postdestete.	52
6.6. Expresión de los diferentes transportadores de aminoácidos en tejido mamario de rata de 48 horas postdestete.	53
6.7. Expresión de los diferentes transportadores de aminoácidos en tejido mamario de rata de 72 horas postdestete.	54
6.8. Expresión de los diferentes transportadores de aminoácidos en tejido mamario de rata de 7 días postdestete.	55
6.9. Expresión de los diferentes transportadores de aminoácidos en tejido mamario de rata de 10 días postdestete.	56
6.10. Expresión génica de los diferentes transportadores durante la lactancia y el destete.	58
6.10.1. Transportador de glutamato y aspartato, Glu/ Asp.	58
6.10.2. Transportador de aminoácidos catiónicos, TACm-1.	59
6.10.3. Transportador de taurina, rB16a.	59

**7. DISCUSION**

60

**8. CONCLUSIONES**

67

**9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

68

**ANEXOS**

76

## INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Transporte mediado por un acarreador a través de la membrana lipídica.	2
Figura 2. Conjunto de alveolos en la glándula mamaria.	18
Figura 3. Diseño general del estudio.	27
Figura 4. Integridad de ARN´s.	33
Figura 5. Síntesis química de ADN.	35
Figura 6. Expresión de los diferentes transportadores de aminoácidos en riñón.	48
Figura 7. Expresión de los diferentes transportadores de aminoácidos en cerebro.	49
Figura 8. Expresión de los diferentes transportadores de aminoácidos en tejido mamario de rata vírgen.	50
Figura 9. Expresión de los diferentes transportadores de aminoácidos en tejido mamario de rata en el día 12 de lactancia.	51
Figura 10. Expresión de los diferentes transportadores de aminoácidos en tejido mamario de rata de 24 horas postdestete.	52
Figura 11. Expresión de los diferentes transportadores de aminoácidos en tejido mamario de rata de 48 horas postdestete.	53
Figura 12. Expresión de los diferentes transportadores de aminoácidos en tejido mamario de rata de 72 horas postdestete.	54
Figura 13. Expresión de los diferentes transportadores de aminoácidos en tejido mamario de rata de 7 días postdestete.	55
Figura 14. Expresión de los diferentes transportadores de aminoácidos en tejido mamario de rata de 10 días postdestete.	56
Figura 15. Comparación de la expresión de algunos transportadores de aminoácidos en diferentes etapas del tejido mamario de rata.	57

## INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Sistemas de transporte para aminoácidos zwitteriónicos.	3
Tabla 2. Sistemas de transporte para aminoácidos ácidos y básicos.	7
Tabla 3. Sistemas de transporte de aminoácidos zwitteriónicos en el tejido mamario en lactancia.	13
Tabla 4. Sistema ASC en el tejido mamario lactante.	14
Tabla 5. Sistema A en el tejido mamario lactante.	14
Tabla 6. Sistema L en el tejido mamario lactante.	15
Tabla 7. Sistema de transporte de $\beta$ -aminoácidos en el tejido mamario lactante.	15
Tabla 8. Sistemas de transporte de aminoácidos catiónicos en el tejido mamario lactante en diferentes especies.	16
Tabla 9. Cotransportador de $\text{Na}^+$ -glutamato en el tejido mamario lactante.	16
Tabla 10. Valores de la expresión de los transportadores en tejido mamario de rata en diferentes etapas.	58



## **DEDICATORIAS**

Señor, Gracias por la fuerza que me has dado para seguir adelante en los momentos difíciles y por ayudarme hacer mis sueños realidad.

### **A mis padres**

Sra. Francisca Espinosa Xolalpa y Dr. Juan Mata Jiménez  
por su cariño, confianza, comprensión y apoyo incondicional.

### **A mis hermanas**

Pepin  
por su alegría y buen humor.

Wendy  
por su apoyo y por darme ánimos siempre que los necesite.

Liz  
por sus regaños y consejos acertados

### **A tí**

Andrei  
por estar siempre conmigo y por tu gran apoyo .

## **GRACIAS**

A todos los integrantes del Laboratorio de Nutriología Molecular del INNSZ, Lariza, Ana, Gaby, Gris, Laura, Adriana, Alejandra, Gabriel, Euclides, Victor, Enrique y Señora Silvia. Gracias por su apoyo, enseñanzas y buenos consejos.

A mis Profesores de la Facultad de Química que con gran empeño y sabiduría me llevaron hacia el camino del conocimiento.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme la oportunidad de estudiar esta maravillosa carrera.

A mis amigos Hugo y Perla por los inolvidables momentos compartidos a lo largo de la carrera, gracias por su confianza y amistad.

A mis queridas amigas Diana, Michelle, Vero, Claus, Monse, Lore, Amelia, porque gracias a ustedes he aprendido lo que es la verdadera amistad.

**GRACIAS**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Nimbe Torres y Torres y al Dr. Armando Roberto Tovar Palacio por su gran entusiasmo y cooperación para la elaboración de esta tesis. Muchas gracias.

A la Dra. María Eugenia Torres Márquez y a la M. en C. María Teresa Romero Avila por sus valiosos comentarios.

A la Q.Yvonne Richaud Patin del Departamento de Inmunología del INNSZ, por su gran ayuda en la enseñanza de la técnica de RT-PCR. Gracias por sacarme de apuros.

A la M. en C. Gabriela Alemán Escondrillas por realizar la secuenciación de los fragmentos de los transportadores. Gracias Gaby.

Al M.V.Z. Octavio Villanueva, por el gran apoyo que me dió siempre con las ratas.

A la Dra. Soledad de Santiago, por su apoyo académico siempre acertado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

# **1. INTRODUCCION**

## **1.1. Generalidades del transporte de aminoácidos en mamíferos.**

El paso de metabolitos de un lado de la membrana celular a otro se lleva a cabo por un proceso denominado transporte, que consiste en la movilización de éstos a través de canales o acarreadores que se encuentran inmersos en la bicapa lipídica. Este proceso requiere de energía a diferencia de la difusión que esta mediada por diferencias de concentración y no requiere de energía. Un sistema de transporte es un proceso funcional formado por una proteína transportadora de sustrato que puede estar asociada a moléculas reguladoras y se localiza en la membrana lipídica, a diferencia del sistema de transporte, un transportador es una proteína que cataliza el transporte de sustratos a través de las biomembranas (1,2,3).

Cuando un sustrato se moviliza de un lado a otro de la membrana lleva a cabo un ciclo completo de transporte donde el transportador cargado con sustrato localizado en la cara cis de la membrana (afuera de la célula), se reorienta por medio de un cambio conformacional a través de la membrana y libera el sustrato del lado de la cara trans (adentro de la célula), cuando el transportador regresa del lado de la cara cis puede o no estar cargado (4).

Los transportadores de aminoácidos tienen las siguientes propiedades generales:

- 1.-Son proteínas inmersas en la membrana celular, regulan el movimiento de aminoácidos a través de la bicapa lipídica.
- 2.-Se comportan de manera similar a las enzimas, ya que son proteínas con la capacidad de acelerar catalíticamente el ingreso de sustratos a través de la membrana, y cumplen con la cinética de saturación de Michaelis-Menten.
- 3.-Tienen baja especificidad hacia los sustratos y alta capacidad del transporte, lo que significa que distintos aminoácidos pueden ser transportados por un mismo sistema de transporte y un aminoácido específico puede ser transportado por diferentes sistemas (5).
- 4.-En general son estereoespecíficos, aceptando a los L-aminoácidos y discriminando a los D-aminoácidos (5).

5.-Pueden ser electrogénicos o electroneutros. En los electrogénicos una carga neta se transfiere a través de la membrana durante un ciclo entero de transporte, es decir se forma un gradiente electroquímico de iones que promueve la acumulación de aminoácidos a través de la membrana plasmática, mientras que esto no ocurre en los electroneutros (1).

Una característica particular de ciertos transportadores de aminoácidos es que su expresión en las células esta regulada por factores de crecimiento, hormonas, medios hiperosmóticos, deprivación de aminoácidos, etc (6,7).

Clasificación de los procesos de transporte (Figura1)

- a) Transporte simple o uniporte: es aquel que en un ciclo de transporte moviliza únicamente la molécula de sustrato.
- b) Transporte paralelo o simporte: consiste en el cotransporte de un sustrato y un ión que puede ser  $\text{Na}^+$ ,  $\text{H}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ .
- c) Transporte antiparalelo o antiporte: proceso que requiere de la movilización en sentidos opuestos de un sustrato por otro que es transportado por el mismo acarreador (1,2,5,8).

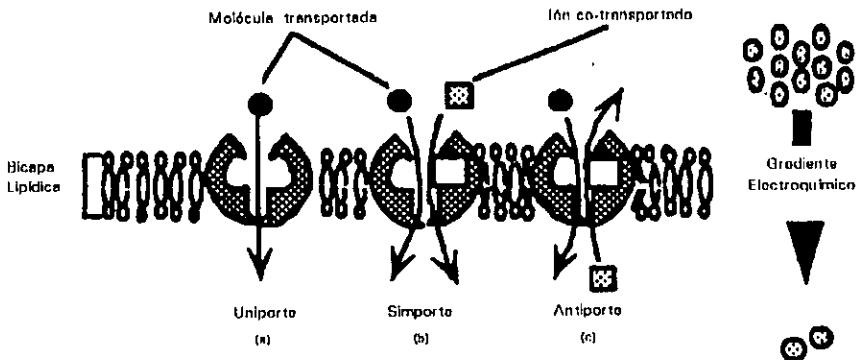


Figura 1. Transporte mediado por un acarreador a través de la membrana lipídica (2).

Los sistemas de transporte se clasifican por la carga neta de los aminoácidos que transportan en: neutros o zwitteriónicos, catiónicos o básicos y aniónicos o ácidos (1,2,3,5,8,9,10).

### 1.1.1. Sistemas de transporte para aminoácidos zwitteriónicos.

Tabla 1. Sistemas de transporte de aminoácidos zwitteriónicos							
Sistema	Especificidad de sustratos	Dependencia iónica	Distribución	Regulación adaptativa	Regulación hormonal	Regulación por pH	Características
A	A,S,G,P,Q, MeAIB*	Na <sup>+</sup>	Amplia	Si	Si	Si	Trans-inhibición, es electrogénico y se activa por estrés hiperosmótico
ASC	A,S,C*,T,P,Q	Na <sup>+</sup>	Amplia	No	No	Si	Trans-estimulación y no se induce usualmente
L	L,I,V;F,Y,W, BCH*	ninguna	Amplia	Si	No	—	Trans-estimulación No se induce usualmente
N	Q*,H,B	Na <sup>+</sup>	Eritrocitos y placenta humana, linfocitos, hepatocitos, músculo, estómago de rata.	Si	No	Si	Se induce por estrés osmótico
β-amino ácidos	Taurina, β-alanina	Na <sup>+</sup> y Cl <sup>-</sup>	Corazón, riñón, hígado, epidídimo, SNC, león, plaquetas y eritrocitos.	—	—	Si	Se estimula por hiperpolarización de la membrana, por estrés hiperosmótico
Gly	G*, N-metilglicina (sarcosina)	Na <sup>+</sup> y Cl <sup>-</sup>	Hepatoma, hepatocitos, placenta, eritrocitos, en SNC: médula y tallo cerebral, bulbo olfatorio, cerebral.	—	—	—	Es electrogénico
Pro	P	Na <sup>+</sup> y Cl <sup>-</sup>	(Cerebro)	—	—	—	—

A = alanina, S = serina, G, Gly = glicina, P, Pro = prolina, Q = glutamina, MeAIB = metilaminoisobutirato, C = cisteína, T = triptófano, L = leucina, I = isoleucina, V = valina, F = fenilalanina, Y = tirosina, W = triptófano, H = histidina, B = asparagina, BCH = 2-aminobiciclo-(2,2,1)-heptano-2-carboxilato, los aminoácidos con \* son sustratos análogos o ideales para el sistema de transporte. ASC ( de las iniciales de Alanina, Serina, Cisteína)

#### 1.1.1.1. Sistema A.

El sistema A tiene especificidad por aminoácidos zwitteriónicos cortos como alanina, serina, glicina, prolina, cistefna, glutamina y por sustratos N metilados tales como el MeAIB (metil amino isobutirato) que es el análogo a la alanina no metabolizable, el N-acetil amino isobutirato y AIB (aminoisobutirato), éste último también se transporta por el sistema ASC (9,11,12,13).

Es un sistema dependiente de  $\text{Na}^+$ , electrogénico y tiene la capacidad de responder al potencial de membrana (5). Para su funcionamiento requiere de la ATPasa de  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  que es un intercambiador iónico dependiente de energía que expulsa 3 iones de  $\text{Na}^+$  y bombea 2 iones  $\text{K}^+$  en contra de gradientes de concentración y a expensas de una molécula de ATP por cada ciclo (1,5,8,13).

La actividad del sistema se afecta por el pH del medio con una inhibición a  $\text{pH} \leq 6.5$  (5,13) y la activación del mismo a pH alcalino (1).

La actividad del sistema A se aumenta por inanición de aminoácidos, hormonas (insulina, glucagon), factores de crecimiento y estrés hiperosmótico (5,7,9,11,12). Este sistema presenta trans-inhibición es decir se reduce la actividad del transporte, por la acumulación de los sustratos en el interior de la célula (5,12). Se distribuye ampliamente en las células de mamíferos, aunque esta ausente en los reticulocitos y eritrocitos (5,9).

#### **1.1.1.2. Sistema ASC.**

Este sistema se distribuye ampliamente (14), transporta aminoácidos zwitteriónicos como son: alanina, serina, cistefna (15) y el ácido 2-amino biciclo (2,2,1) heptano-2-carboxílico (BCH), se diferencia del sistema A por su intolerancia a los sustratos N metilados, no se regula por hormonas, ni se induce usualmente, no presenta regulación adaptativa, (5,7,9) y presenta trans-estimulación es decir incremento en la actividad del transporte conforme aumenta la concentración de sustratos en el interior de la célula (5). La actividad del sistema se afecta por el pH del medio, a  $\text{pH} < 6$  el sistema ASC es más efectivo para transportar aminoácidos aniónicos y menos efectivo para transportar aminoácidos zwitteriónicos (16,17), estos cambios de pH modifican la protonación del acarreador, alterando su especificidad por el sustrato (12).

El sistema ASC consiste en un cotransporte de  $\text{Na}^+$  y aminoácidos zwitteriónicos, posee dos sitios de unión extracelulares para ambos, con el ión  $\text{Na}^+$  el transportador gana una carga positiva que le permite el cambio conformacional hacia el interior de la célula donde los sustratos son liberados.

El transportador sin carga vuelve a unir otro aminoácido zwitteriónico y  $\text{Na}^+$ , e inmediatamente hay una translocación que hace que vuelva a su posición original del lado extracelular donde se liberan los sustratos, completándose un ciclo de transporte (18).

#### **1.1.1.3. Sistema L.**

Transporta aminoácidos zwitteriónicos largos con cadena ramificada y aromáticos, tiene preferencia por la leucina, pero también transporta isoleucina, tirosina, triptófano, valina, fenilalanina, metionina y glutamina (5,9). El sustrato modelo es el BCH aunque también se ha utilizado cicloleucina (10).

Es un sistema independiente de  $\text{Na}^+$ , se regula por la disponibilidad de aminoácidos y no por hormonas, no se induce usualmente, presenta trans-estimulación (9,12).

Este sistema se distribuye en la mayoría de las células de los mamíferos (7,9,11,12,19).

#### **1.1.1.4. Sistema N.**

Transporta aminoácidos que tienen en la cadena lateral un átomo de nitrógeno como son la histidina, glutamina y asparagina, por lo que se le llama sistema N. Es un transportador dependiente de  $\text{Na}^+$  y se encuentra en eritrocitos, placenta humana, linfocitos, hepatocitos, músculo y estómago de rata, astrocitos de ratón y en hígado donde se regula de una manera eficiente la concentración de glutamina y la eliminación de amonio a través del ciclo de la urea. Este sistema tiene alta sensibilidad a los cambios de pH, es insensible al control hormonal, esta sujeto a la regulación adaptativa y se induce por estrés osmótico (5,7,9,11,12).

#### **1.1.1.5. Sistema de $\beta$ -aminoácidos.**

Transporta  $\beta$ -aminoácidos como la taurina (ácido 2-aminoetanosulfónico) y la  $\beta$ -alanina, así como moléculas que poseen grupos sulfonato y sulfinato que son precursores de la taurina (20).

Su sustrato modelo es la taurina, es dependiente de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ . Este transportador se estimula por hiperpolarización de la membrana plasmática y por alcalinización (20).



Se conocen 2 isoformas del sistema  $\beta$  denominados Tau y TAUT.

Tau es una proteína de 655 aminoácidos con una masa molecular de 74 kDa y 12 regiones transmembranales con 2 sitios de reconocimiento para las N-glicosiltransferasas (21).

TAUT es una proteína de 590 aminoácidos con una masa molecular de 66 kDa, con 12 regiones transmembranales y 3 sitios de N-glicosilación (22).

Tau y TAUT se distribuyen en eritrocitos, plaquetas, cerebro, hígado, riñón, corazón, ileon y epidídimo además Tau se presenta en mucosas intestinales y testículo (1,9,16,21,22).

#### 1.1.1.6. Sistema de glicina.

Transporta glicina, su análogo es la sarcosina (N-metilglicina). Es un sistema dependiente de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  por lo que es electrogénico, la estequiometría que se ha estimado es : glicina:  $\text{Na}^+$  :  $\text{Cl}^-$  , 1:2:1(9).

Este sistema ha sido caracterizado en el Sistema Nervioso Central (SNC) de rata, ratón y humano, se distribuye en eritrocitos, hepatocitos y hepatomas (9).

Se han clonado 2 proteínas transportadoras denominadas GLYT1 y GLYT2, difieren en los primeros 15 aminoácidos (1,16).

Las proteínas GLYT1 poseen 633 aminoácidos y tienen una masa molecular de 71kDa y 12 regiones transmembranales. Se expresan en médula espinal, tallo cerebral, cerebelo, bulbo olfatorio y placenta (1,16). Su función principal en SNC, es la modulación de las terminaciones nerviosas excitatorias (23).

Hasta el momento se han encontrado 3 isoformas del subtipo GLYT1 (GLYT1a, GLYT1b, GLYT1c), las diferencias entre ellas son pequeños cambios en aminoácidos de los extremos amino terminal, GLYT1a es la única isoforma que se expresa en hígado y riñón (24).

La proteína GLYT2 atraviesa 12 veces la membrana, posee 799 aminoácidos y tiene una masa molecular de 88 kDa, al glicosilarse rebasa los 90 kDa (23).

La proteína GLYT2 se distribuye en la médula espinal, tallo cerebral, cerebelo, intestino, pulmón, hígado, estómago, utero y páncreas, también en mastocitos y macrófagos (16). GLYT2 tiene 48% de identidad con GLYT1, pero son diferentes en estructura, sitios de expresión y propiedades farmacológicas(24).

### 1.1.1.7. Sistema de prolina.

Este sistema de transporte clonado en rata comparte 98% de identidad con el sistema de prolina de humano ambos codifican para proteínas de 637 aminoácidos con masa molecular teórica de 71kDa, tienen 12 dominios transmembranales. El sistema tiene una alta afinidad hacia la L-prolina y es dependiente de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ . Se expresa exclusivamente en cerebro (16).

### 1.1.2. Sistemas de transporte para aminoácidos ácidos y básicos.

Tabla 2. Sistemas de transporte de aminoácidos ácidos y básicos				
Sistema	Especificidad de sustratos	Dependencia iónica	Distribución	Características
<b>XAG<sup>-</sup></b> TAAE 1,2,3,4.	Ácidos: L- Glutamato L- D-Aspartato	$\text{Na}^+$ y $\text{K}^+$	Amplia	Es electrogénico, esteroespecífico, presenta regulación alélica y se induce por estrés osmótico.
<b>V<sup>+</sup></b> TACm-1 TACm-2 TACm-2a	Básicos: L- arginina L- lisina L- ornitina L- histidina Zwitteriónicos: Leucine cistatina glutamina homoserina	Ninguna	TACm-1, TACm-2 se distribuyen ampliamente, TACm-2a sólo en hígado adulto.	Es saturable e insensible al pH y electrogénico. Presenta trans-estimulación TACm-1 se induce en respuesta a hormonas como insulina y glucocorticoides y hepatocetosis parcial. TACm-2 se induce en la maduración de monocitos a macrófagos.
<b>TARB</b>	aminoácidos zwitteriónicos básicos y cistina	Ninguna	rñon, músculo, neuronas hipotalámicas, blastocitos, trofoblastos placentarios.	Su ausencia en el humano causa cistinuria (enfermedad autosómica recesiva) es un defecto en la reabsorción renal e intestinal de los aminoácidos básicos y cistina.
<b>V<sup>+</sup>L</b>	Leucine Isoleucina Fenilalanina Lisina	→ Dependiente de $\text{Na}^+$ → Independiente de $\text{Na}^+$	Corazón, placenta, eritrocitos, fibroblastos de ratón y humano, en células en proliferación.	Tiene alta afinidad por leucine y lisina. Presenta trans-estimulación
<b>B<sup>+</sup></b>	aminoácidos zwitteriónicos, básicos y BCH	$\text{Na}^+$	Fibroblastos humanos, células endoteliales porcinas, blastocitos de ratón y células de hepatomas	Su actividad es mayor en células no diferenciadas.

#### 1.1.2.1. Sistema de transporte de aminoácidos ácidos.

El ácido glutámico y ácido aspártico se transportan a través de la membrana por sistemas de transporte dependientes de  $\text{Na}^+$  conocidos como XAG<sup>-</sup>, XA<sup>-</sup>, XG<sup>-</sup>, el primero de ellos tiene afinidad compartida por el ácido glutámico y el ácido aspártico,

los siguientes tienen afinidad individual, ya sea por el ácido aspártico o por el ácido glutámico (12).

#### **1.1.2.1.1. Sistema XAG<sup>-</sup> o Transportadores de Aminoácidos Excitatorios, TAAE.**

Se han clonado 4 transportadores que pertenecen a los TAAE. Transportan L-glutamato y L,D-aspartato, son sistemas electrogénicos, se introducen 2 Na<sup>+</sup>, un aminoácido y salen un K<sup>+</sup>, un HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Se distribuyen en todas las células del organismo (5,25). Los cuatro subtipos de transportadores poseen propiedades comunes como las 9 regiones hidrofóbicas transmembranales con estructura de  $\alpha$ -hélice y hojas  $\beta$  plegadas (16).

TAAE1 se distribuye en neuronas y en la astrogliá (26) transporta L-glutamato y L,D-aspartato.

TAAE2 se distribuye sólo en el SNC, específicamente en la astrogliá (98). Su función es mantener las concentraciones de glutamato extracelulares bajo los niveles no tóxicos (27,28).

TAAE3 de conejo se expresa en intestino, riñón, hígado, cerebro y corazón. TAAE3 de humano se expresa en cerebro, riñón, pulmón y placenta (27). TAAE3 se encuentra distribuido en las células de Purkinje y en ciertas neuronas como las corticales piramidales y las neuronas no glutamatérgicas (26).

TAAE4 se ha localizado en cerebelo y placenta humana, tiene gran afinidad por los isómeros L del glutamato y aspartato. Es un transportador electrogénico acoplado al flujo de iones cloro, tiene propiedades estructurales y funcionales de transportador y de canal iónico (29).

#### **1.1.2.2. Sistemas de transporte de aminoácidos básicos.**

Los aminoácidos básicos o catiónicos se transportan al interior de la célula por los sistemas de transporte denominados y<sup>+</sup>, b<sup>0,+</sup>, y<sup>+</sup>L y B<sup>0,+</sup>, que también se encargan de transportar aminoácidos zwitteriónicos. Estos transportadores se diferencian entre sí por la dependencia de Na<sup>+</sup>, por la especificidad de sustratos y propiedades cinéticas (19).

#### 1.1.2.2.1. Sistema $y^-$ .

En ausencia de  $Na^+$ , el sistema  $y^-$  se comporta como transportador de aminoácidos catiónicos (arginina, lisina, histidina protonada y ornitina) y en presencia de  $Na^+$  transporta aminoácidos zwitteriónicos (leucina, cisteína, glutamina, homoserina) (19,30). En el último caso el  $Na^+$  le da la segunda carga positiva a los aminoácidos zwitteriónicos haciéndolos pasar como aminoácidos catiónicos (31).

Se distribuye en la mayoría de las células, no se expresa en hígado de rata adulta, pero sí en hepatocitos fetales, se cree que es por la presencia de la arginasa hepática que da lugar al catabolismo de la arginina, vía ciclo de la urea (11,12,30,32). El sistema  $y^+$  es insensible al pH e independiente de  $Na^+$ , presenta trans-estimulación (5,33).

La acumulación de aminoácidos permite la formación de un gradiente de concentración y una diferencia de potencial a través de la membrana, que permite el movimiento bidireccional de los aminoácidos cargados a través de un campo eléctrico, acelerando los cambios conformacionales del transportador hacia el lado intra ó extracelular de la membrana y además es un sistema de transporte saturable (11,30,32).

Los transportadores de aminoácidos catiónicos en humanos presentan la misma estructura y función con respecto a los murinos, ya que poseen del 87-90% de identidad en la secuencia de ADNc (ácido desoxiribonucleico complementario) (33).

Se han caracterizado 3 proteínas TACm-1, TACm-2 y TACm-2a que pertenecen al sistema de transporte  $y^+$  sus principales características se describen a continuación:

El transportador de aminoácidos catiónicos murino 1 o TACm-1 es una glicoproteína que además de ser transportador, es el receptor del virus de leucemia murino ecotrópico MuLV. La proteína TACm-1 posee 622 aminoácidos con una masa molecular de 67 kDa, para la cual se predice 12-14 regiones transmembranales (34), se distribuye en todas las células del tejido de rata, excepto en el hígado. El ADNc en el humano tiene 88% de homología con el de ratón y el 97% de homología con el ADNc de la rata (6).

El gen TACm-1 se induce en respuesta a hormonas, insulina, glucocorticoides y hepatectomía parcial, es un gen de respuesta temprana retardada en la regeneración del hígado(6).

El transportador de aminoácidos catiónicos murino 2 o TACm-2, tiene el 61% de homología con TACm-1 (6,34) su distribución es amplia, es  $\text{Na}^+$  independiente y saturable. Esta proteína posee 658 aminoácidos y 12 dominios transmembranales, se aisló del linfoma T tumorigénico murino y fue denominada Tea (T cell early activation). Su función es transportar aminoácidos catiónicos (32,35).

El TACm-2a se distribuye específicamente en hígado (36), es una isoforma del TACm-2 difieren solo en 41 aminoácidos, este dominio diferente hace que TACm-2 sea diez veces más afin al sustrato y más sensible a la trans-estimulación que TAC-2a (6,17,19,30,33), su función es remover excesos de aminoácidos catiónicos de la sangre, sin afectar el transporte en otros tejidos que expresan TACm-1 (6.37).

#### 1.1.2.2.2. Sistema TAR<sup>b</sup> o b<sup>0+</sup>.

Los transportadores de aminoácidos relacionados con el sistema b<sup>0+</sup> (TARB) también denominados D2, NAA-Tr, NBAAT o NABT, han sido clonados en conejo, rata y humano entre ellos tienen el 85% de identidad.

Transporta con alta afinidad aminoácidos zwitteriónicos, catiónicos y cisteína, en ausencia de  $\text{Na}^+$  (38). En cada ciclo de transporte entra a la célula un aminoácido zwitteriónico y sale una especie con carga positiva (aminoácido catiónico o  $\text{K}^+$ ), por lo que el proceso se considera electrogénico, pues utiliza el potencial de membrana, este sistema es capaz de acumular aminoácidos, en ausencia de iones como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  (38).

El sistema TARB se distribuye en riñón, intestino, neuronas hipotálamicas, blastocistos y trofoblastos placentarios (14).

En general las proteínas TARB tienen una masa molecular de 78 kDa, que al N-glicosilarse obtienen 85 kDa (39). Poseen de 1 a 4 regiones transmembranales, aún no se sabe si TARB es un transportador de aminoácidos o una proteína activadora de transporte (11,38,40). Tienen 30% de identidad con el antígeno 4F2hc de las células humanas, que es un transportador parecido al  $\gamma^+L$ .

### **1.1.2.2.3. Sistema y<sup>+</sup>L o 4F2hc.**

Introduce aminoácidos L-zwitteriónicos (leucina, isoleucina y fenilalanina) en presencia de Na<sup>+</sup> y aminoácidos L-catiónicos (lisina) en ausencia de Na<sup>+</sup>(38). Presenta el fenómeno de trans-estimulación.

Es una proteína con 85 kDa y se expresa en corazón, placenta, eritrocitos, fibroblastos de ratón y humano así como en todos los tipos celulares en proliferación y no se expresa en células en reposo (11).

### **1.1.2.2.4. Sistema B<sup>0+</sup>.**

Este sistema transporta aminoácidos zwitteriónicos y catiónicos, utiliza el Na<sup>+</sup> como co-sustrato y tiene una especificidad de sustratos más amplia que b<sup>0+</sup> (sistema Na<sup>+</sup> independiente) pues acepta aminoácidos ramificados en las posiciones  $\alpha$  y  $\beta$  (5,11,12).

El sustrato utilizado para éste sistema es el BCH. El transportador se distribuye de forma endógena en fibroblastos humanos, células endoteliales porcinas, en blastocistos de ratón y en células de hepatomas, pero no se ha localizado en hepatocitos (5,11). La actividad del sistema B<sup>0+</sup> es mayor en células no diferenciadas.

## **1.2. Sistemas de transporte de aminoácidos en el tejido mamario.**

En las células alveolares mamarias, los aminoácidos son captados de la circulación sanguínea por proteínas acarreadoras dependientes e independientes de sodio, que se encuentran inmersas en la membrana lipídica. Durante la lactancia, esta extracción de aminoácidos se ve reflejada en las elevadas diferencias arteriovenosas a través de la glándula mamaria (10,41,42). Estas diferencias arteriovenosas son un índice cualitativo de la extracción y utilización de los aminoácidos para la síntesis de la leche en la glándula mamaria, es decir, estas diferencias no reflejan el comportamiento de los sistemas de transporte, ni sus propiedades cinéticas, especificidad de sustrato y regulación, por lo que se han desarrollado estrategias para la caracterización de los sistemas de transporte.

El transporte se ha estudiado utilizando explantes, células secretoras y por perfusión de la glándula mamaria. Los explantes tienen la gran ventaja de mantener su estructura glandular normal, por lo que no altera sus funciones y propiedades de transporte, además durante el pico de la lactancia más del 85% de las células secretoras exponen su mayor área superficial del lado de la membrana basolateral. Una desventaja es la de estar formada por una mezcla de poblaciones celulares por lo cual no permite establecer si el transporte ocurre en la membrana basolateral o apical.

Las células secretoras alveolares han sido utilizadas para estudiar el transporte de solutos y exponen la membrana apical en un medio de incubación, al igual que los explantes su desventaja radica en la dificultad para saber si el transporte se lleva a cabo del lado apical o basolateral de la célula.

El tejido perfundido permite estudiar el transporte en la membrana basolateral bajo condiciones fisiológicas, la desventaja de su uso radica en la técnica experimental (43,44,45).

Con cultivos de células mamarias no se han obtenido buenos resultados debido a que es distinto el potencial eléctrico, fuerza iónica que afecta la actividad de los sistemas de transporte.

Un nuevo modelo para estudiar el transporte de aminoácidos son las mamosféricas que son células alveolares cultivadas polarizadas y capaces de secretar proteína (46).

Por las necesidades nutricionales en la lactancia, los sistemas de transporte se ven incrementados en sus actividades catalíticas, lo cual se ve reflejado en los parámetros cinéticos como son:  $V_{m\acute{a}x}$  y  $K_m$  (Velocidad máxima y Constante de Michaelis-Menten). Donde la  $K_m$  se define como la concentración de sustrato a la cual una enzima trabaja a la mitad de su velocidad máxima y  $V_{m\acute{a}x}$  es el número de moléculas de sustrato convertidas en producto por unidad de tiempo por una molécula de enzima, cuando esta totalmente saturada de sustrato (47).

Las células epiteliales o alveolares mamarias tienen la capacidad de generar y mantener un gradiente de concentración para la mayoría de los aminoácidos a través de las membranas apical y basolateral, esto es debido a la energía utilizada por los sistemas que son dependientes de  $Na^+$  y cuya fuente de energía proviene de la bomba de  $Na^+ - K^+$  (46), aquellos sistemas que no dependen del  $Na^+$  funcionan por

un fenómeno de intercambio mediado por alteraciones específicas en la concentración de los sustratos intracelulares (10).

Dentro de los sistemas que han sido descritos en la glándula mamaria y son dependientes de  $\text{Na}^+$  se encuentran los sistemas A y ASC que transportan aminoácidos zwitteriónicos, el sistema de cotransporte de  $\text{Na}^+$ - glutamato que es similar al sistema  $\text{XAG}^-$  y el sistema de  $\beta$ -aminoácidos.

Aquellos sistemas de transporte que son independientes de  $\text{Na}^+$  son los sistemas L, que transportan aminoácidos zwitteriónicos y un sistema que transporta aminoácidos catiónicos.

De la tabla 3 a la 9 se presentan las características principales de los sistemas de transporte zwitteriónicos, catiónicos y aniónicos, que se han reportado en la glándula mamaria lactante de diferentes mamíferos, se pueden apreciar las diferencias que existen entre especies.

#### 1.2.1. Sistemas de transporte de aminoácidos zwitteriónicos.

Tabla 3. Sistemas de transporte de aminoácidos zwitteriónicos en el tejido mamario en lactancia.				
Sistema	Ratón (48)	Rata (43)	Bovino (10)	Cobayo (49)
A	+	+	+	-
ASC	-	-	+	+
L	+	+	+	+

(+) Presencia (-) ausencia del sistema de transporte

Referencias bibliográficas dentro de los paréntesis.



Tabla 4. Sistema ASC en el tejido mamario lactante.

Sustratos	Dependencia	Especies	Características	Referencias
alanina	ión sodio	Bovino y cobayo.	Similares a las descritas en otras células.	10
serina				46
cisteína				49
AIB *				
*sustrato modelo				

Tabla 5. Sistema A en tejido mamario lactante.

Sustratos	Dependencia	Especie	Características	Referencias
alanina	ión sodio	Bovino	Similares a las descritas en otras células.	10
glicina	ión sodio	Ratón	-Km = 2 mM -Vmax = 197nmol / g células min -Acumula 4 veces más AIB el tejido mamario ratón vírgen.	48
prolina				50
serina	ión sodio	Rata	-Depende de la ATPase (Na <sup>+</sup> - K <sup>+</sup> ) -Disminuye el transporte en el destete por la acumulación de la leche y por la ausencia de prolectina. -Regulación adaptativa.	43
treonina				46
MeAIB *			-Km = 3.4mM -es sensible al pH.	50
*sustrato modelo				

Tabla 6. Sistema L en el tejido mamario lactante.

Sustratos	Dependencia ionica	Especie	Características	Referencia
fenilalanina	Ninguna	Bovino	-Se trans-estimula por c-Leucina interna	10
triptófano			-funciona por un mecanismo de intercambio	
leucina	Ninguna	Ratón	-Km = 2.7 mM	48
isoleucina			-Vmax = 150 nmol/g células min	
metionina			-funciona por un mecanismo de intercambio	
tirosina	Ninguna	Rata	-Es no estereoespecífico	43
valina			-No presenta trans-intercambio	48
glutamina			-No presenta trans-estimulación	51
c-Leucina			-Es una variante del sistema L	
BCH*			-Disminuye el transporte en el destete por la acumulación de la leche y por la ausencia de prolactina.	
*sustrato modelo	Ninguna	Cobayo	-Se localiza en la membrana basolateral	49

Tabla 7. Sistemas de transporte de  $\beta$ -aminoácidos en tejido mamario lactante

Tejido	Sustratos	Dependencia	Características	Similitud	Referencias
Explantos de rata lactante.	$\beta$ -aminoácidos: Taurina hipotaurina* $\beta$ -alanina	Na <sup>+</sup> y Cl <sup>-</sup> extra-celulares	- Alta afinidad y selectividad a los $\beta$ -aminoácidos. - Es saturable - Depende del tiempo - Dependiente de la ATPasa Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> - localizada en la membrana basolateral - Trans-estimulación - Km = 43 $\mu$ M y Vmax = 37.5 $\mu$ mol / Kg células / 15min	Transportador de taurina en placenta, intestino y riñón	46 53
Explantos de rata lactante.	Taurina y glicina	Ninguna	-Se activa por el hinchamiento de las células. -No es saturable -Insensible a la temp. -No se trans-estimula.	Perfil farmacológico similar al de otras células.	46 54
Jerbo *sustrato modelo	$\beta$ -aminoácidos	Na <sup>+</sup>	Km = 70 $\mu$ M	Transportador células renales humanas	46 55

### 1.2.2. Sistema de transporte de aminoácidos catiónicos.

Tabla 8. Sistemas de transporte de aminoácidos catiónicos en el tejido mamario lactante en diferentes especies.				
Especies	Sustratos	Características	Similitud	Referencias
Rata (tejido perfundido)	L-lisina	- Transporta aminoácidos catiónicos neutros.	- al sistema $b^{0+}$ , $y^{+}L$ .	43
	L-arginina	- Es independiente de $Na^{+}$ - Es dependiente del tiempo. - Se localiza en la membrana del epitelio mamario de rata. Trans-estimulación de la entrada, salida de lisina por aminoácidos neutros y catiónicos. La prolactina regula el sistema de aminoácidos catiónicos.	variante del $y^{+}$ .	46 56
Vaca y cabra	L-lisina L-arginina Ornitina	- Es independiente de $Na^{+}$ - Es saturable. Aminoácidos neutros no interactúan con los aminoácidos catiónicos.	-al sistema $y^{+}$ .	57

### 1.2.3. Sistema de transporte de aminoácidos aniónicos.

Tabla 9. Cotransportador de $Na^{+}$ - glutamato en el tejido mamario lactante.					
Sustratos	Especies	Características	Parámetros cinéticos	Similitud	Referencias
L-aspartato	Rata	- Dependencia de $Na^{+}$	En rata	- Al sistema	44
	(explantes)	- Trans-estimulación	D-aspartato	$XAG^{+}$	45
D-aspartato*	y perfundido)	- Saturable	$K_m = 32.4 \mu M$	- Tiene un	46
		- Alta afinidad y selectivo para aminoácidos aniónicos	$V_{max} = 49 \text{ nmol/2min por g de células}$	perfil farmacológico	58
L-glutamato		- Opera de modo intercambio	L-glutamato	diferente a	59
		- Dependiente del tiempo	explantes	EAAC1	
		- Se localiza en la membrana basolateral	$K_m = 112.5 \mu M$	GLT-1	
		- El transporte se regula por acumulación de la leche pero no por la prolactina.	$V_{max} = 71.3 \text{ nmol/min por g de células perfundido}$	GLAST	
*sustrato modelo			$K_m = 18.1 \mu M$		
			$V_{max} = 40.3 \text{ nmol/min por g de células}$		

### **1.3. Anatomía, histología y citología de la glándula mamaria.**

La glándula mamaria es un órgano secretor de origen ectodérmico. La rata posee seis pares de glándulas mamarias, tres de estos pares son torácicos, uno abdominal y dos pares inguinales (60, 61).

La unidad funcional de la glándula mamaria es el **alveolo** (Figura 2) constituido por una sola capa de **células epiteliales o células alveolares secretoras de leche** dispuestas en torno a una cavidad o **lumen**, éstas células absorben de la sangre los precursores para la síntesis de proteínas y lípidos de la leche, los cuales son liberados al lumen alveolar, la leche pasa por medio de pequeños conductos que se unen entre sí para formar un conducto común o canal galactóforo que permite directamente llevar la leche al pezón. Estos pequeños conductos por su localización se denominan **intraalveolares** (situados dentro del lobulillo), **interalveolares** (entre los lobulillos), **intraalveolares** (dentro de los lóbulos), **interalveolares** (entre lóbulos).

Los alveolos se agrupan en unidades funcionales llamadas **lobulillos** (un lobulillo esta formado por 150-200 alveolos) a su vez numerosos lobulillos forman un **lóbulo** que esta rodeado por una cápsula mayor de tejido conjuntivo.

Entre la membrana basal y las células epiteliales se encuentran **las células mioepiteliales** que participan en la contracción de los alveolos durante la expulsión de leche del lumen al ducto principal o canal galactóforo (60, 61).

La capa de células mioepiteliales que recubren al alveolo estan rodeadas por una mailla de capilares que lo irrigan con sangre que proviene de la circulación arterial y venosa que provee al alveolo de los precursores necesarios para la síntesis de la leche (60,61,62).

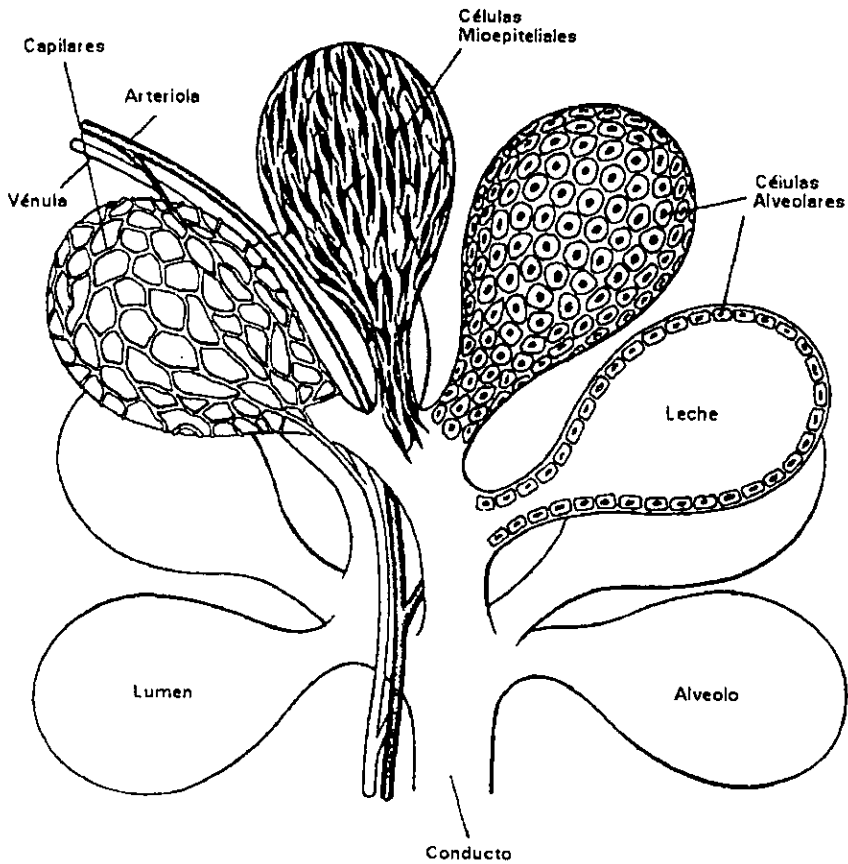


Figura 2. Conjunto de alveolos en la glándula mamaria. (61)

### 1.3.1. Modificaciones de las células epiteliales en diferentes etapas fisiológicas de la glándula mamaria.

En la glándula mamaria de la rata virgen se observan conductos vacíos con membranas celulares bien definidas, en la superficie del lumen hay microvellos. En el citoplasma de la célula se observa ribonucleoproteína, pequeñas mitocondrias, poco retículo endoplásmico sin plegar, el aparato de Golgi poco desarrollado y sin gránulos protéicos, los núcleos tienen cromatina periférica y nucleólos se observan grandes. El

tejido conectivo y tejido adiposo es abundante (62). El desarrollo máximo del tejido secretor mamario se alcanza durante la gestación y hasta el pico de la lactancia, en esta etapa la glándula mamaria se caracteriza por tener células muy diferenciadas, las células epiteliales abundan y en la parte apical aparecen gotitas de lípidos y proteína. Hay numerosas mitocondrias y su retículo endoplásmico está bien desarrollado, el aparato de Golgi se localiza a ambos lados del núcleo. Con el comienzo de la secreción, las células aumentan de volumen, las mitocondrias se alargan o se engrosan, y el número de éstas se duplica.

Después de estos cambios el tejido sufre un proceso de regresión o involución denominado destete, que se caracteriza por la atrofia del epitelio secretor, quedan algunos restos de lo que fue el sistema de conductos y alveolar, el tejido conectivo se hace menos celular, cada vez más denso y más homogéneo (62).

El destete obligado (por destete de las crías) se caracteriza por el acúmulo de leche en los alveolos y conductos. Este acúmulo de los productos de secreción aumenta la presión de las células y provoca la degeneración del tejido secretor, estas células son expulsadas a la leche. Por microscopía ordinaria y electrónica se ha observado en tejido mamario de rata la disminución de la cantidad de tejido epitelial (como consecuencia del descenso del volumen celular y degeneración de las células) y un aumento del tejido adiposo del estroma, así como el acúmulo de gotas de lípidos y proteínas en las células alveolares y su vacuolización. Las células mioepiteliales no se degeneran y tienen la función de rellenar los huecos que han dejado las células necróticas manteniendo unidas las células sobrevivientes.

El retículo endoplásmico y el aparato de Golgi desaparecen rápidamente y aparecen ribosomas libres. Las células hidrolizadas, finalmente se vacuolizan y se expulsan al lumen alveolar o son lisadas y eliminadas en el tejido intersticial.

En el destete de la rata la cantidad de ADN y ARN disminuyen, como consecuencia disminuyen el número de células así como la síntesis proteica.

El proceso de regresión es consecuencia de la reducción del número de células y de la capacidad funcional de las mismas. Para mantener la integridad bioquímica de la glándula mamaria es necesario mantener su actividad productiva y secretora, lo cual se logra permitiendo la succión de la mama que estimula la secreción de hormonas lactogénicas como son la prolactina y la oxitocina (60).

#### **1.4. La lactancia.**

La lactancia es un proceso biológico, en el que ocurren alteraciones fisiológicas, anatómicas y endocrinológicas de muchos órganos, en especial en la glándula mamaria lactante, que es un sitio donde ocurren modificaciones en el metabolismo, con altas cantidades de síntesis e hidrólisis de proteínas y aminoácidos (63).

La lactancia en la rata abarca los primeros 21 días después del parto y en estudios realizados por diferencias arteriovenosas se ha determinado que el pico máximo en la lactancia es de los días 10-15 después del nacimiento (64,65) donde hay un incremento en la síntesis de proteínas, demanda y captación de nutrimentos (42,65,66).

La glándula mamaria incrementa su síntesis proteínas en un 100-150% (67). El tejido mamario de vaca produce 35 L de leche/día con un contenido de proteína de 32g/L por lo que necesita 1 kg de aminoácidos por día para sostener la síntesis de la proteína de la leche (46,68). La rata produce 125 mL de leche por Kg. de peso corporal, en el humano la producción es de 12 a 23 mL de leche por Kg de peso corporal. (67) La síntesis de proteína, en ratones hembra con 15 días de lactancia es de 2.1g /día, de la cual el 55% representa la proteína de la leche sintetizada por la glándula mamaria. En ratones vírgenes la síntesis de la proteína es de 0.64 g/día mientras que en ratones con 18 días de gestación la proteína sintetizada es de 1.59 g/día, el 57% del total de la proteína se atribuye al feto y la placenta, el 12% a la síntesis de proteína en la glándula mamaria (69).

En la lactancia, la ingestión de alimentos en la rata y ratón hembra esta incrementada de 3 a 4 veces comparada con animales vírgenes (69,70), es decir existe hiperfagia que implica un aumento en la ingestión de alimento de un 250-300% (67,71), fenómeno acompañado por hipertrofia e hiperplasia (67), manifestandose con el crecimiento de la glándula mamaria en un 400%, del hígado en un 40-50% y del tracto intestinal 100%, (69,72) éste último manifiesta un marcado incremento en el pico de la lactancia que coincide con un aumento en la captación de nutrimentos y de la transferencia de los sustratos necesarios para la síntesis de la leche a la glándula mamaria (65,68,69).

El hígado en la lactancia es un órgano con alta demanda de aminoácidos para la síntesis y recambio de proteínas al igual que la glándula mamaria (50,69,73).

Para que las células de la glándula mamaria lactante capten aminoácidos de forma eficiente dependerá del gasto cardíaco, de que el flujo sanguíneo sea elevado, de que el órgano exponga una mayor área de contacto con la circulación sanguínea y de la actividad de las enzimas que transportan los sustratos (46,64,66,74,75).

El flujo sanguíneo es manejado por el metabolismo mamario y por sus requerimientos de sustrato, se regula localmente a través de cambios en la perfusión capilar, en respuesta al aumento o disminución de la actividad de las glándulas (63).

Las células epiteliales o alveolares por si mismas poseen un mecanismo de control del flujo sanguíneo, ya que producen compuestos vasodilatadores (prostaciclina, óxido nítrico, etc.) que actúan cuando la glándula requiere de nutrientes para la síntesis de la leche (76).

La glándula mamaria produce una proteína denominada inhibidor de retroalimentación de la lactancia (FIL), que regula la secreción de todos los componentes de la leche sin alterar su composición. Cuando el FIL se acumula no se sintetiza más leche y cuando hay una continua secreción no hay acumulación del mismo (51,77).

#### **1.4.1. Hormonas durante la lactancia.**

La prolactina juega un papel importante en el control hormonal del crecimiento y función de la glándula mamaria así como en la lactogénesis, en el mantenimiento de la secreción láctea y en la biosíntesis de la leche, por lo que se relaciona estrechamente con la regulación de la captación de aminoácidos en la glándula mamaria lactante de rata (64,74,78).

La prolactina se produce en la porción anterior de la pituitaria, en la antehipófisis. La extirpación de la pituitaria durante la lactancia determina el cese de la secreción láctea.



El hipotálamo produce una sustancia con efecto inhibitor sobre la síntesis y liberación de la prolactina, a esta sustancia se le denomina Factor Inhibidor de la Prolactina (PIF), cuya composición química se desconoce (60).

El estímulo producido al mamar agota el contenido de PIF en el hipotálamo, éste mismo estímulo mantiene una continua secreción láctea por la liberación de prolactina. Cuando no hay succión, disminuye el flujo sanguíneo por lo que se reducen los niveles de prolactina, se acumula la leche en la glándula mamaria, creando una presión que termina por hacer cesar la secreción y da lugar a la regresión de la glándula mamaria (60).

La liberación de la prolactina se induce por el reflejo neurohumoral que produce la succión (78) y por la administración de estrógenos, ya que estimulan a la pituitaria produciendo la liberación de prolactina, lo cual resulta en un aumento de ésta hormona en circulación y un aumento en el número total de receptores en el tejido mamario para la prolactina esto hace que se mantenga la lactancia (79).

La oxitocina es una hormona que se libera de la neurohipófisis por el efecto de la succión, esta hormona se encarga de estimular las células mioepiteliales para que se contraigan y produzcan la expulsión de la leche de los alveolos y conductos (62).

La insulina no tiene ningún efecto benéfico en la glándula mamaria al contrario la administración de insulina provoca la disminución de la producción de la leche en vaca, cerdo y oveja (41,75).

#### **1.4.2. Biosíntesis de proteínas por la glándula mamaria a partir de aminoácidos.**

Los aminoácidos son fuente de nitrógeno y carbono, son precursores para la síntesis de proteínas y lípidos (65,80), se obtienen de la ingestión de una dieta rica en proteínas, se absorben por el intestino y se llevan a través de la circulación arterial o bien se extraen por la movilización de la proteína del músculo corporal (73,75).

Cuando el aporte energético en la dieta es bajo o está limitado por un estado fisiológico como la lactancia, en condiciones de inanición o desnutrición, los aminoácidos se oxidan para proporcionar energía a la célula.

La síntesis de proteínas en la glándula mamaria esta limitada por la biodisponibilidad de los sustratos dada por los sistemas de transporte de aminoácidos inmersos en las membranas de las células (68,81).

Los aminoácidos y los péptidos de la sangre se captan en exceso por la glándula mamaria (63,82), la mayor parte de ellos son utilizados para la síntesis de la proteína de la leche, para la síntesis de aminoácidos dispensables, y para la síntesis de ácidos grasos o energía (80). La otra parte de los aminoácidos son retenidos en la glándula mamaria y son utilizados para la síntesis de proteínas constitutivas, estructurales y para el recambio continuo de proteínas en la reparación y proceso de reemplazo del evento secretor (63,66,75).

Como ejemplo tenemos que las proteínas de la leche de vaca representan el 97% de los componentes de nitrógeno de lo cual el 92% lo constituyen las proteínas sintetizadas "de novo" (caseína,  $\beta$ -lactoglobulina, y  $\alpha$ -lactalbúmina) en la glándula mamaria (68,70), el resto lo constituyen compuestos nitrogenados, las inmunoglobulinas IgA, IgM, IgG (67) y la albúmina las cuales son sintetizadas en las células plasmáticas e hígado respectivamente por último son transferidas a la glándula mamaria sin alterar (68).

La glándula mamaria capta en mayor cantidad aminoácidos indispensables (arginina, valina, isoleucina, leucina) (66) en contraste con los aminoácidos dispensables cuya captación es insuficiente. Debido a esto la glándula mamaria sintetiza aminoácidos dispensables a partir de la fuente de carbono, nitrógeno y azufre que tiene en exceso y que provienen de aminoácidos indispensables (42,66), del glutatión ( $\gamma$ -glutamil-cisteinil-glicina), de la ornitina y de la citrulina, éstos dos últimos son aminoácidos captados en grandes cantidades y utilizados por la glándula mamaria, pero no forman parte de las proteínas de la leche (68,69).

En la glándula mamaria lactante se ha observado que la prolina, ornitina y glutamato, provienen de la arginina y a su vez la ornitina da lugar a prolina y glutamato, la glicina, cisteína y glutamato provienen del glutatión, a partir de la metionina se sintetiza

cisteína, a partir de la fenilalanina se sintetiza la tirosina, de la citrulina se forma arginina y prolina, todos estos procesos anabólicos y catabólicos están limitados por el transporte de los aminoácidos a las células mamarias y por algunas enzimas como ornitina aminotransferasa, fenilalanina hidroxilasa, arginasa, etc. (63,66,68,69,83).

#### **1.4.3. Biosíntesis de lípidos por la glándula mamaria a partir de aminoácidos.**

Los quilomicrones son hidrolizados por lipasas que se encargan de romperlos en ácidos grasos libres, monoacilgliceroles, diacilgliceroles y glicerol, estos productos son absorbidos por el intestino, después pasan al torrente sanguíneo donde las células alveolares mamarias los captan para la síntesis "*de novo*" de los triacilgliceroles (84).

La glándula mamaria tiene la capacidad sintetizar ácidos grasos a partir de AcetilCoA provenientes de glucosa, lactato, alanina y leucina (84).

En la glándula mamaria de ratas lactantes, la incorporación de la leucina marcada en lípidos y proteínas aumenta 7 y 6 veces respectivamente comparadas con las glándulas de las ratas vírgenes lo que nos indica la importancia de la leucina (70). La leucina se capta en exceso por la glándula mamaria y sus productos del catabolismo son el acetoacetato y acetilCo-A, los cuales se oxidan o actúan como precursores para síntesis de lípidos "*de novo*" (lipogénesis) (63,69,70).

Los metabolitos de la leucina  $\alpha$ -cetoisocaproato,  $\alpha$ -cetoisovalerato y  $\beta$  hidroxil- $\beta$ -metil butirato están presentes en la secreción de los lípidos de la leche (75).

Los ácidos grasos sintetizados "*de novo*" en la glándula mamaria son el ácido láurico 12:0 y ácido mirístico 14:0 (el primer número significa el número de carbonos y el segundo representa el número de insaturaciones), conforme avanza la etapa de lactancia, la leche se enriquece con ácidos grasos de mayor número de carbonos que van de 8:0, 10:0, 12:0 y 14:0. En la lactancia el tejido adiposo se ve disminuido porque disminuyen los almacenes de ácidos grasos que son utilizados para la obtención de energía (69,84).

## **2. JUSTIFICACIÓN.**

Se han caracterizado algunos sistemas de transporte en la glándula mamaria utilizando análogos de aminoácidos no metabolizables, determinando así la especificidad de sustratos, constantes cinéticas  $V_{max}$  y  $K_m$ , así como su perfil farmacológico, dependencia de iones, localización, etc. Sin embargo no existe información sobre la expresión de los diferentes transportadores de aminoácidos durante la lactancia, por lo tanto es importante conocer los transportadores existentes en el tejido mamario durante la lactancia y poder comparar si existe un cambio con respecto a la expresión en el tejido mamario de la rata vírgen y de posdestete.

Estudios previos reportan que las diferencias arteriovenosas de algunos aminoácidos se encuentran aumentadas en tejido mamario lactante, lo que indica que la captación de aminoácidos en la lactancia es elevada, debido a que es una etapa fisiológica que exige mayor demanda de nutrimentos para la síntesis de proteínas y lípidos de la leche.

## **3. HIPÓTESIS.**

En el pico máximo de la lactancia, el tejido mamario requiere de un gran aporte de aminoácidos para la síntesis de proteínas y lípidos de la leche, por lo que la expresión de los transportadores de aminoácidos en tejido mamario durante la lactancia deberán estar aumentados con respecto al tejido mamario vírgen y posdestete de 24, 48, 72 horas, 7 y 10 días.

## **2. JUSTIFICACIÓN.**

Se han caracterizado algunos sistemas de transporte en la glándula mamaria utilizando análogos de aminoácidos no metabolizables, determinando así la especificidad de sustratos, constantes cinéticas  $V_{max}$  y  $K_m$ , así como su perfil farmacológico, dependencia de iones, localización, etc. Sin embargo no existe información sobre la expresión de los diferentes transportadores de aminoácidos durante la lactancia, por lo tanto es importante conocer los transportadores existentes en el tejido mamario durante la lactancia y poder comparar si existe un cambio con respecto a la expresión en el tejido mamario de la rata vírgen y de posdestete.

Estudios previos reportan que las diferencias arteriovenosas de algunos aminoácidos se encuentran aumentadas en tejido mamario lactante, lo que indica que la captación de aminoácidos en la lactancia es elevada, debido a que es una etapa fisiológica que exige mayor demanda de nutrimentos para la síntesis de proteínas y lípidos de la leche.

## **3. HIPÓTESIS.**

En el pico máximo de la lactancia, el tejido mamario requiere de un gran aporte de aminoácidos para la síntesis de proteínas y lípidos de la leche, por lo que la expresión de los transportadores de aminoácidos en tejido mamario durante la lactancia deberán estar aumentados con respecto al tejido mamario vírgen y posdestete de 24, 48, 72 horas, 7 y 10 días.

## **4.OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo general**

Identificar la expresión de algunos transportadores de aminoácidos en tejido mamario de rata vírgen, en lactancia y posdestete.

### **4.2. Objetivos específicos**

1.-Diseñar iniciadores específicos y óptimos de los diferentes transportadores de aminoácidos.

2.-Determinar a través de la técnica RT-PCR la presencia o ausencia de los transportadores de aminoácidos en tejido mamario de rata vírgen, lactancia y a las 24, 48, 72 horas, 7 y 10 días de posdestete.

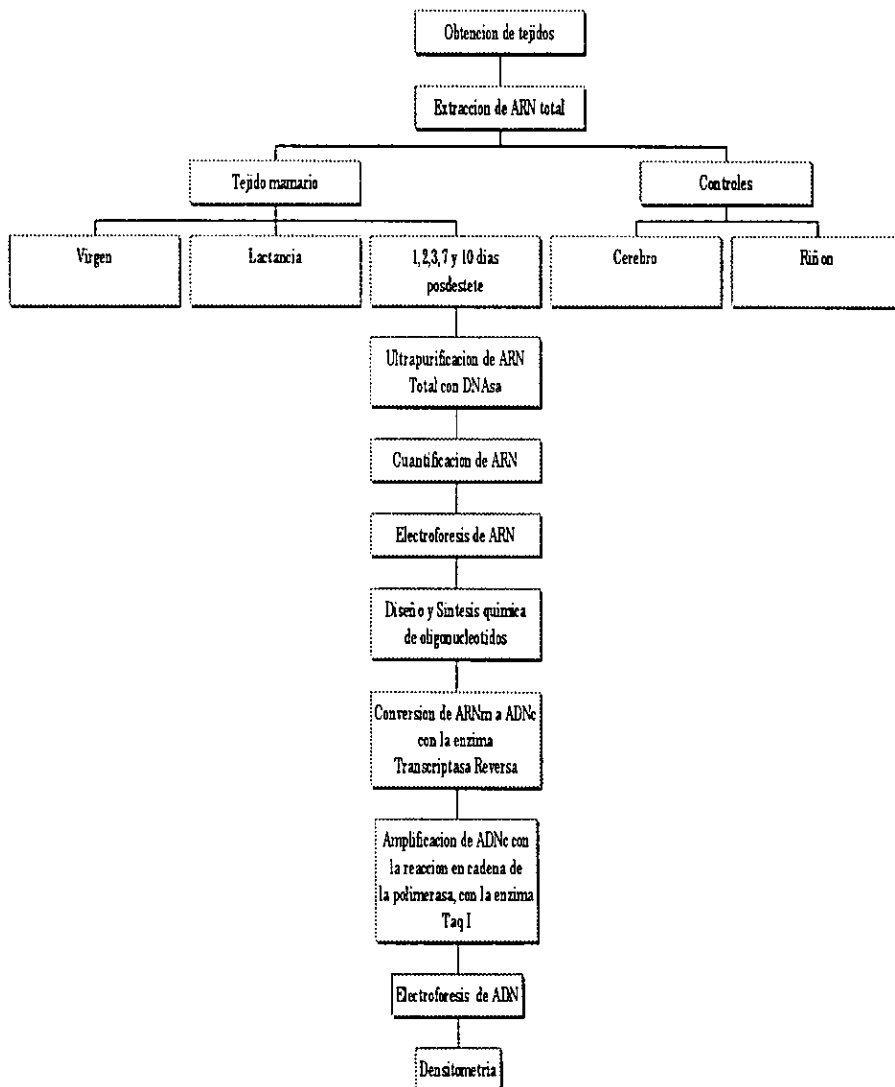
3.-Cuantificar la expresión de los transportadores de aminoácidos en las diferentes etapas.

4.-Comparar la expresión de los transportadores de aminoácidos durante la lactancia con el tejido mamario de rata vírgen y posdestete.

5.-Determinar si existen diferencias en la expresión entre las etapas en estudio.

## 5. METODOLOGÍA

Figura 3. Diseño general del estudio.



### **5.1. Población estudiada.**

Se utilizaron ratas hembra de la cepa wistar obtenidas del bioterio del Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán. Los animales se mantuvieron en condiciones controladas de ciclo luz - oscuridad de 12 horas a una temperatura ambiente y alimentadas con una dieta normal (laboratory autoclavable rodent diet) y agua a libre demanda.

Las ratas se dividieron en 3 grupos:

El grupo testigo formado por ratas vírgenes de 2-4 meses de edad.

El grupo de lactancia formado por ratas madres en el día 12 de lactancia con 10-12 crías. Se consideró la fecha del parto como primer día de lactancia.

El grupo posdestete formado por ratas madres con 12 días de lactancia, día en que fueron separadas de sus crías (10 -12) y sacrificadas a las 24 horas, 48 horas, 3 días, 7 días y 10 días.

### **5.2. Extracción de tejidos.**

El tejido mamario en las diferentes etapas, se obtiene de ratas previamente dormidas con CO<sub>2</sub>, entre las 9:00 y 10:00 horas. Posteriormente se decapitan y se separa tejido mamario del abdomen, enjuagandolo en solución salina al 0.9% fría. Se toman muestras de 200 mg para la extracción de ARN se depositan en nitrógeno líquido y se guardan a -80°C hasta el momento de la determinación.

### **5.3. Extracción de ARN total con tiocianato de guanidina / $\beta$ -mercaptoetanol.(Anexo 1)**

El ARN total se aísla por una extracción con tiocianato de guanidina - fenol - cloroformo. El tiocianato de guanidina es un potente desnaturalizante de proteínas. (85,86)

#### **Procedimiento**

Todas las soluciones utilizadas para la extracción de ARN deben ser preparadas con agua tratada con dietil-pirocarbonato al 1% (DEPC) y el material de vidrio debe estar libre de ARNsas, lo cual se logra horneándolo a 180°C durante 4 horas.

Este método se utiliza para extraer ARN total de cerebro, riñón y tejido mamario vírgen, en lactancia, 24h y 48h posdestete.



Antes de iniciar la técnica y entre cada muestra se lava el politrón (Modelo PT 2000 Kinematica, AG) de 3 a 4 veces con 2 mL de agua desionizada, después con 2 mL de agua-DEPC 1% y por último con 2 mL de la solución desnaturalizante  $\beta$ -mercaptoetanol. Se homogeniza 200 mg de tejido de la rata con 2 mL de la solución desnaturalizante con  $\beta$ -mercaptoetanol con el politrón aproximadamente 20 seg en un tubo corex estéril de 15 mL. Se agregan 0.2 mL de acetato de sodio 2M pH 4.0 y se mezclan completamente por inversión. Se agregan 2 mL de agua saturada con fenol acuoso frío y se mezcla vigorosamente con el vortex por 2 min. Se adicionan 0.4 mL de solución cloroformo-alcohol isoamilico (49:1 vol/vol), se mezcla con el vortex completamente y se incuba la suspensión durante 15 min a 4°C. Se centrifuga a 9800 x g durante 20 min a 4°C (centrifuga J2-MC rotor JA-20, Beckman).

La fase superior se transfiere a un tubo corex estéril de 15 mL y el ARN se precipita agregando 2 mL de isopropanol al 100%, se mezcla con vortex y se incuban las muestras por 30 min a -20°C. Se centrifuga a 9800 x g durante 10 min a 4°C, el sobrenadante se desecha y el tubo se coloca boca a bajo dejando escurrir el resto del líquido sobre un papel absorbente. El botón de ARN se disuelve y se homogeniza con una punta de pipeta en 0.6 mL de solución desnaturalizante con  $\beta$ -mercaptoetanol y se transfiere a un tubo de microcentrifuga estéril de 1.5 mL. El ARN se precipita con 0.6 mL de isopropanol al 100%, se homogeniza en el vortex y se incuba por 30 min a -20°C. Se centrifuga (microcentrifuga eppendorf 5402) a 11750 x g durante 10 min a 4°C y se desecha el sobrenadante. Para disolver los residuos de guanidina que contaminan el botón de ARN, se le adiciona 1mL de etanol al 75% y se resuspende vigorosamente en el vortex por un tiempo de 10-15 min a temperatura ambiente.

Se centrifuga a 11750 x g durante 5 min a 4°C y se desecha el sobrenadante. El botón de ARN se seca con papel absorbente y se resuspende en 300  $\mu$ l de agua-DEPC hasta disolver completamente.

Para la obtención de un ARN más puro se lleva a cabo otra extracción. Se adicionan 300  $\mu$ l de fenol amortiguado pH 8.0/cloroformo/ alcohol isoamilico (25:24:1). Se centrifuga a 11750 x g durante 10 min a 4°C. La fase superior se transfiere a un microtubo estéril y se le agregan 300  $\mu$ l de cloroformo/ alcohol isoamilico (49:1 vol/vol) y se agita en el vortex. Se centrifuga a 11750 x g durante 10 min a 4°C. La

fase acuosa se transfiere a un microtubo estéril, a ésta fase que contiene el ARN se le adicionan 40  $\mu$ L de acetato de sodio 3M pH 6.0 y 1 mL de etanol absoluto.

Se agita en el vortex y se deja toda la noche a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

El ARN se centrifuga a 11750 x g durante 20 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , se desecha el sobrenadante y el botón se lava con 1mL de etanol al 70%. Se centrifuga a 11750 x g, durante 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , se desecha el sobrenadante y botón se seca con un papel absorbente.

El botón de ARN se resuspende en 156  $\mu$ L de agua-DEPC hasta que se disuelve completamente y se prosigue con la ultrapurificación.

#### **5.4. Ultrapurificación de ARN total. (Anexo 2)**

Se basa en la capacidad de la DNAsa de digerir ADN de cadena sencilla y doble con el fin de que el ARN quede libre de contaminantes como serían ADN y proteínas unidas al ADN.

Los ARN's extraídos por tiocianato o trizol se ultrapurifican antes de realizar la reacción de transcripción reversa - reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

Al botón disuelto previamente, se le agregan 39  $\mu$ L de amortiguador para DNAsa 5x y 5  $\mu$ L de DNAsa (2 unidades /  $\mu$ L diluida en amortiguador para DNAsa 1X).

Se mezcla en el vortex y se incuban las muestras 15 min en un baño de agua a  $37^{\circ}\text{C}$  (Multi-block heater Lab-line). Se agregan 0.2 mL de fenol saturado pH=8 a cada muestra (vol/vol), se agitan en el vortex 15 seg y se centrifugan por 2 min a 11750 x g a temperatura ambiente. La fase acuosa se transfiere (superior, incolora) a otro microtubo estéril. Se agregan 0.2 mL de cloroformo: alcohol isoamilico (24:1) a cada muestra, se agitan en el vortex 15 seg y se centrifugan por 2 min a 11750 x g a temperatura ambiente. La fase superior se transfiere a otro microtubo estéril. Finalmente se agregan 500  $\mu$ L de etanol absoluto frío y 70  $\mu$ L de acetato de sodio 3M pH 5.3. Se agitan en el vortex y se guardan a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche. (Bio Freezer Forma Scientific) Se centrifugan a 11750 x g durante 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , el sobrenadante se elimina y se lava el botón con 0.8 mL de etanol al 75% con agua-DEPC. Se centrifuga a 11750 x g durante 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , el sobrenadante se elimina y el botón de ARN se seca con papel absorbente, se resuspende en agua-DEPC, se cuantifica y se utiliza el mismo día para la RT-PCR.

### **5.5. Extracción de ARN total con trizol. (Anexo 3)**

Este método se utiliza para extraer ARN total de tejido mamario de 3, 7 y 10 días posdestete, el rendimiento de la extracción se mejoró notablemente comparado con el método de tiocianato, se utiliza trizol cuando los tejidos son poco abundantes y se degradan fácilmente como en el destete.

Se lava el politrón con agua desionizada, agua-DEPC, y solución desnaturalizante.

En un tubo corex estéril de 15 mL con 2 mL de trizol se añaden 200 mg de tejido (recién extraído o congelado) y se homogeniza completamente.

La muestra se incuba por 5 minutos, a temperatura ambiente, se le añaden 0.4 mL de cloroformo al homogenado, se agita vigorosamente en el vortex por 1 minuto y se centrifuga a 12100 x g, por 15 minutos a 4°C.

La fase inferior es la fase fenol-cloroformo y la superior es la fase acuosa que contiene el ARN, se transfiere a otro tubo corex y se precipita con 1mL de isopropanol frío, se agita en el vortex un minuto, y se incuba a una temperatura ambiente por 10 minutos, se centrifuga a 12100 x g por 10 min a 4°C.

El sobrenadante se desecha y el botón de ARN se lava con 0.8 mL de etanol al 75% en agua-DEPC. Se mezcla en el vortex y se transfiere a un microtubo.

Por último se centrifuga 15 minutos a 8160 x g a 4°C, se desecha el sobrenadante y al botón se le agregan 156 µL de agua-DEPC, se disuelve completamente y se lleva a cabo la ultrapurificación.

### **5.6. Cuantificación de ARN. (Anexo 4)**

El ARN se cuantifica midiendo su absorbancia a 260 nm en el espectrofotómetro Beckman (DU 640).

En un microtubo se colocan 995 µl de buffer TE pH 7.5 y 5 µl de ARN y se leen a 260 nm en celdas de cuarzo.

Para revisar la pureza del ARN se toma la lectura a 260 y 280 nm para obtener la relación 260/280 que debe ser de 1.9 - 2.2. (si la absorbancia del ARN se sale de este intervalo, el ARN puede estar contaminado con proteínas).

Para calcular la concentración de ARN:

$$1 \text{ D.O } 260 = 40\mu\text{g de ARN}$$

$$\text{D.O de la muestra} \text{ --- } X \mu\text{g de ARN} \quad \text{D.O = Densidad Óptica}$$

$$X \mu\text{g de ARN} \times \text{Factor de dilución} = Z \mu\text{g de ARN} / 1000 \mu\text{L}$$

Se ajusta el ARN a una concentración final de 2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

### 5.7. Electroforesis de ARN. (Anexo 5)

#### Preparación del gel de agarosa al 1.5%.

Se pesan 0.51g de agarosa (grado biología Molecular BIO-RAD Molecular Biology Certified agarose) en un matraz erlen meyer estéril y se le añade 25 mL de agua-DEPC, se coloca un tapón de vidrio y se disuelve en el microondas a un nivel de calentamiento de 6 durante 4 min.

Se lleva nuevamente a la balanza y se reconstituye el volumen con agua-DEPC.

Se añaden 3.40 mL de amortiguador de corrimiento 10X y 5.6 mL de formaldehído al 36.7% en la campana, el volumen final es de 34mL.

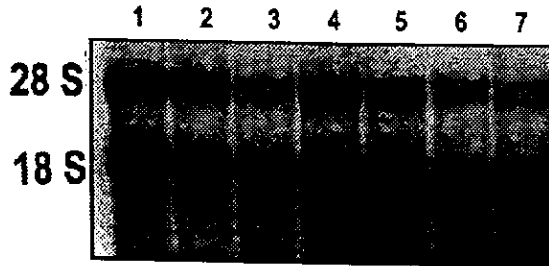
La mezcla anterior se vacía en el molde de la cámara electroforesis (modelo # B2 Easy-cast Hoefer) que contiene un peine de 8 pozos.

Cuando el gel está sólido se le pone amortiguador de corrimiento 1X y se guarda en el refrigerador hasta su uso.

#### Preparación de la muestra.

En un microtubo estéril se colocan: ARN [2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ] (4 $\mu\text{L}$ ) , amortiguador de corrimiento 10X (1.7 $\mu\text{L}$ ), formaldehído (2.3 $\mu\text{L}$ ), formamida (8.0 $\mu\text{L}$ ), amortiguador de carga (2.0 $\mu\text{L}$ ) bromuro de etidio (1mg/mL) (2.0 $\mu\text{L}$ ). La mezcla anterior se homogeniza en el vortex, se centrifuga por 4 seg y se incuba a 55°C durante 15 min. Se remueve la base del molde y el peine, se coloca el gel sobre la cámara de electroforesis y se le añade amortiguador de corrimiento 1X hasta cubrir el gel y los pozos. Se colocan las muestras y se corre el gel a 8 V/cm (80 volts, 80mAMP) hasta que el colorante de bromofenol migre 2/3 partes del gel.

Figura 4. Integridad de ARN's.



Se observa una electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio, que muestra la integridad del ARN ribosomal 28S y 18S del tejido mamario en las diferentes etapas. Carril 1. 10µg de ARN total de tejido mamario de rata virgen extraido con tiocianato de guanidina. Carril 2. 10µg de ARN total de tejido mamario de rata en el día 12 de lactancia, extraido con tiocianato de guanidina. Carril 3. 10µg de ARN total de tejido mamario de rata de 24 horas postdestete, extraido con tiocianato de guanidina. Carril 4. 10µg de ARN total de tejido mamario de rata de 48 horas postdestete, extraido con tiocianato de guanidina. Carril 5. 10µg de ARN total de tejido mamario de rata de 72 horas postdestete, extraido con trizol. Carril 6. 10µg de ARN total de tejido mamario de rata de 7 días postdestete, extraido con trizol. Carril 7. 10µg de ARN total de tejido mamario de rata de 10 días postdestete, extraido con trizol.

#### 5.8. Diseño de oligonucleótidos para los diferentes transportadores.

Se realizó una revisión bibliográfica de los transportadores de aminoácidos clonados en rata, se eligieron seis, considerando la clasificación de aminoácidos ácidos, básicos y zwitteriónicos (6,23,87,88,89,90). Todos estos transportadores forman parte del banco de genes. A través del Internet y con el número de acceso proporcionado por la bibliografía, se obtuvieron las secuencias de ADN y con el software OLIGO 5.0 se diseñaron primers o iniciadores específicos e ideales, tomando en cuenta las siguientes condiciones:

- \*El porcentaje de GC (Guanina-Citosina), debe ser  $\leq$  al 60%, para evitar la formación de horquillas o dímeros.
- \*El iniciador debe estar formado por 18-28 nucleótidos.
- \*El tamaño del producto debe ser de 150 a 700 pares de bases (pb)
- \*La temperatura de alineamiento ( $T_a$ ) debe de ser alrededor de 55°C.
- \*Las diferencias de las temperaturas de fusión entre las secuencias sentido y antisentido deben ser pequeñas (alrededor de 1°C).

### **5.8.1. Síntesis química de oligonucleótidos.**

Una vez conocidas las secuencias de los iniciadores sentido y antisentido de cada sistema de transporte, los oligonucleótidos se sintetizaron en un sintetizador de oligonucleótidos, OLIGO 1000 DNA Synthesizer, Beckman (91). Finalmente se liofilizaron y se resuspendieron en 300  $\mu\text{L}$  de agua desionizada estéril filtrada. Los oligonucleótidos se cuantificaron y se guardaron en alícuotas a una concentración final de 10  $\mu\text{M}$  a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

El proceso de síntesis química de un fragmento de ADN que realiza el sintetizador OLIGO 1000 Figura 4 (91) consiste en la adición y unión de un nucleósido con las diferentes bases nitrogenadas (A adenina, G guanina, C citosina, T timina) a un soporte sólido en cada ciclo, hasta completar una cadena de oligonucleótidos, la síntesis comienza en 3' y termina en 5'. Para unir un monomero de nucleósido al soporte o a la cadena creciente de oligonucleótidos se requiere de un ciclo formado por cuatro pasos: Desbloqueo, activación-acoplamiento, bloqueo del grupo hidroxilo ( $\text{OH}^-$ ) y oxidación. A continuación se describirá brevemente lo que ocurre en cada paso:

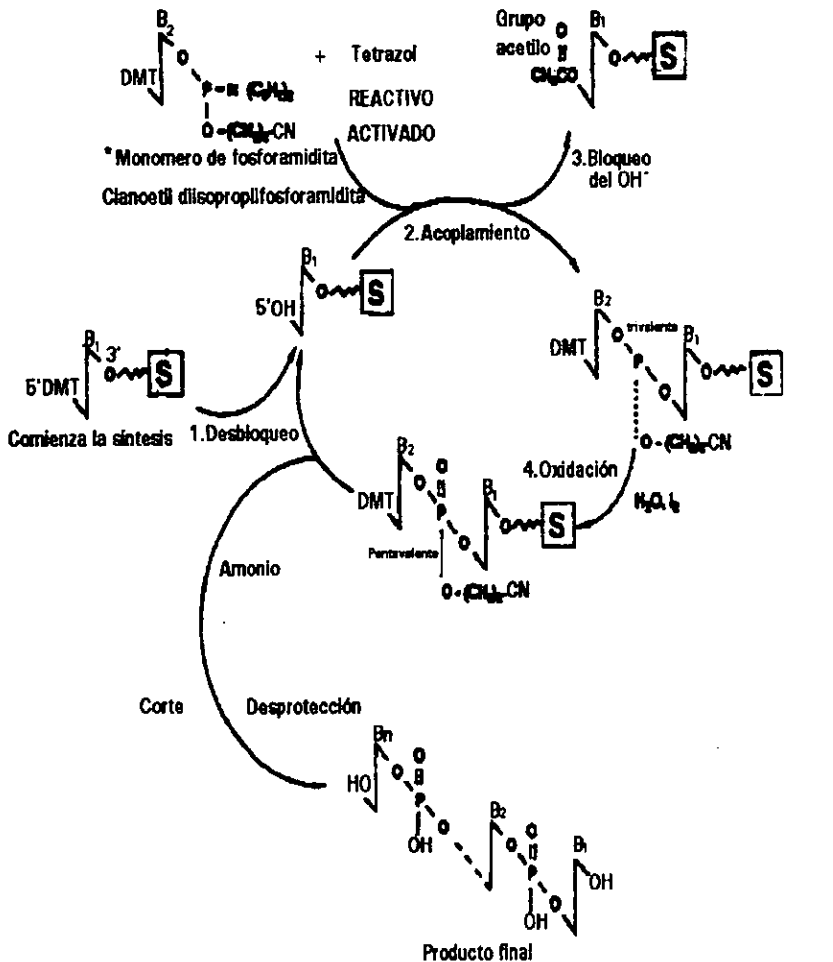
1.-Desbloqueo: consiste en quitar el grupo dimetoxitritil (DMT) del final de la cadena creciente y dejar expuesto el grupo hidroxilo  $\text{OH}^-$  en la posición 5', para poder iniciar la unión con un monómero de fosforamidita (que son los nucleósidos de A,G,C,T).

2.-Activación y acoplamiento: en este paso se liberan tetrazol y un monómero de fosforamidita, la mezcla de éstos forman un reactivo intermediario muy activo, el cual se une al grupo hidroxilo ( $\text{OH}^-$ ) 5' del soporte inicial.

3.- El bloqueo del grupo hidroxilo consiste en acetilar a los grupos  $\text{OH}^-$  que no participen en las reacciones de acoplamiento, para evitar la formación de oligómeros incorrectos.

4.-Oxidación: consiste en la oxidación del átomo de fósforo en estado trivalente (inestable) al estado pentavalente.

Después de que se ha completado la cadena de oligonucleótidos, hay salida del amonio, se desbloquea el  $\text{OH}^-$  y hay un corte que da lugar al producto final.



DMT Dimetoxitriil

**S** Soporte sólido

~ Unión del nucleótido 3' al soporte sólido.

OH' Hidroxilo

\* Monomeros de fosforamidita  
(nucleósidos A, C, G, T).

$B_1$  Base sobre el nucleótido 3'.

$B_2$  Base sobre el siguiente nucleótido en la cadena creciente.

$B_n$  Base sobre la terminación 5' de un oligonucleótido que posee n nucleótidos de longitud.

-- Uniones fosfodiéster entre el nucleótido No. 2 y el nucleótido 5'.

Figura 5. Síntesis química de ADN (91).

**5.9. Características de los oligonucleótidos sintetizados.**

**5.9.1. Sistema de transporte de glicina, GLYT 2.**

AUTORES: Liu Q.R., López-Cocuera B., Mandiyan S., Nelson H., Nelson N. (23)

ORIGEN: rattus novergicus ADNc to ARNm.

Número de acceso: L21672

Las secuencias de los iniciadores son:

SENTIDO:

5' GGC TCC TAC CGC TAC CCT AA 3'

ANTISENTIDO:

5' GCC CAG TTC CAA ATC CTT CA 3'

	Posición y longitud	Temp fusión (°C)	%GC
Producto	267pb	88.1	55.1
sentido	2329 20 bases	69	60.0
antisentido	2576 20 bases	70.7	50.0

Esquema de la localización del producto de RT-PCR amplificado



Datos adicionales:

Sentido 5.57nmol ----A260

Antisentido 5.44 nmol ----A260

Temperatura óptima de alineamiento: 57.3°C

Diferencia de temperaturas de fusión: 1.8°C



### 5.9.2. Sistema de transporte de aminoácidos dibásicos y neutros, NAA-Tr

AUTORES Tate S.S., Yan Ning.(87)

ORIGEN: rattus novergicus (cepa wistar) ADNc a ARNm.

Número de acceso: M77345

Las secuencias son:

SENTIDO:

5' AAG GGA TGC CGG ACG AAT AAC 3'

ANTISENTIDO:

5' CCT GCC TGC CAC CAG TCA A 3'

	Posición y longitud	Temp fusión (°C)	%GC
Producto	308pb	89.3	57.5
sentido	84 21 bases	72.7	52.4
antisentido	373 19 bases	74.3	63.2

Esquema de la localización del producto de RT-PCR amplificado



Datos adicionales:

2305pb de ARNm

Sentido: 4.58nmol ---- A260

Antisentido: 5.90 nmol ---- A260

Temperatura óptima de alineamiento: 59.3°C

Diferencia de temperaturas de fusión: 1.6°C

### 5.9.3. Sistema de transporte de glutamato y aspartato, GLAST.

AUTORES: Storck T., Schulte S., Hofmann K., Stoffel W. (88)

ORIGEN: Norway rat.

Número de acceso: X63744 S49018

Secuencias:

SENTIDO:

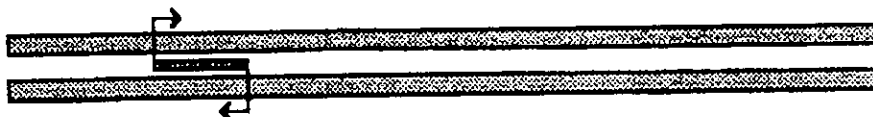
5' AAA GGG CAC GAA AGA AAA CAT 3'

ANTISENTIDO:

5' ACC ACA TTA TCA CCG CTA CCA 3'

	Posición y longitud	Temp fusión (°C)	%GC
Producto	419pb	86.9	50.6
sentido	632 21 bases	68.3	38.1
antisentido	1030 21 bases	68.7	47.6

Esquema de la localización del producto de RT-PCR amplificado



Datos adicionales:

3778 pb de ARNm

Sentido: 4.36 nmol ---- A260

Antisentido: 5.01 nmol ---- A260

Temperatura óptima de alineamiento: 56.3°C

Diferencia de la temperatura de fusión: 0.3°C

#### 5.9.4. Sistema de transporte aminoácidos dibásicos y neutros, D2.

AUTORES. Wells R.G., Hediger M.A. (89)

ORIGEN: rattus kidney ADNc a ARNm

Número de acceso: M80804

Secuencias:

SENTIDO:

5' GTA CCA GAT CTA CCC GAG GTC TTT 3'

ANTISENTIDO:

5' GTA TTT CCC GCT CCG TGT C 3'

	Posición y longitud	Temp fusión (°C)	%GC
Producto	331pb	81.7	38.7
sentido	424 24 bases	69.4	50.0
antisentido	736 19 bases	68.9	57.9

Esquema de la localización del producto de RT-PCR amplificado



Datos adicionales:

2280pb de ARNm

Sentido: 4.42 nmol ---- A260

Antisentido: 6.07nmol ---- A260

Temperatura óptima de alineamiento: 52.9°C

Diferencia de temperaturas de fusión: 0.4 °C

### 5.9.5. Sistema de transporte de aminoácidos cationicos, TACm-1.

AUTORES: Aulak K.S., Liu J., Wu J., Hyatt S.L., Puppi ., Henning S.J., Hatzoglou.(6)

ORIGEN: Norway rat

Número de acceso: U70476

Secuencias:

SENTIDO:

5' CCC ATC CTT TCT GAC TTG A 3'

ANTISENTIDO:

5' AAC CGC ACA TAA CAT ACA TTC 3'

	Posición y longitud	Temp fusión (°C)	%GC
Producto	242pb	82.9	43.0
sentido	5152 19 bases	64.6	47.4
antisentido	5373 21 bases	63.6	38.1

Esquema de la localización del producto de RT-PCR amplificado



Datos adicionales:

6471pb de ARNm

Sentido:6.0 nmol ---- A260

Antisentido:4.79 nmol ---- A260

Temperatura óptima de alineamiento:52.1°C

Diferencias de temperatura de fusión:1.1°C

### 5.9.6. Sistema de transporte de taurina, rB16a.

AUTORES: Smith K., Borden L., Wang ., Hartig P., Branchek T., Weinshank R.L. (90)

ORIGEN: Rattus norvegicus.

Número de acceso: M96601

Secuencias:

SENTIDO:

5' GGG CTG ACG ATG GTG A 3'

ANTISENTIDO:

5' CCG GTA GAC GAC TTT GTT GTA GGT 3'

	Posición y longitud	Temp fusión (°C)	%GC
Producto	285pb	85.2	47.7
sentido	1453 16 bases	66.0	62.5
antisentido	1717 21 bases	64.3	47.6

Esquema de la localización del producto de RT-PCR amplificado



Datos adicionales:

2489pb ARNm

Sentido: 6.25 nmol ---- A260

Antisentido: 5.0 nmol ---- A260

Temperatura óptima de alineamiento: 53.9°C

Diferencia de temperatura de fusión 1.6 °C

Se utiliza  $\beta$ -actina como control estructural para la RT-PCR de todos los experimentos.

#### 5.9.7. $\beta$ - actina, control estructural.

Secuencias

SENTIDO:

5'GGG TCA GAA GGA TTC CTA TG 3'

ANTISENTIDO:

5'GGT CTC AAA CAT GAT CTG GG 3'

Datos adicionales:

Sentido 4.99 nmol ----A260

Antisentido 5.13 nmol ----A260

Longitud del producto: 237pb

#### 5.10. RT- PCR (Transcripción reverse - reacción en cadena de la polimerasa) (Anexo 6)

En la reacción de la transcriptasa reverse se sintetiza una cadena de ADN complementario (ADNc) a partir de una cadena simple de ARN, se utiliza (oligo dT) que es una secuencia de 12-18 nucleótidos de Timina que se une por complementaridad a la cola poliA del ARNm, formandose una horquilla que es reconocida por la enzima transcriptasa reverse (M-MLV) que transcribe el ARNm a ADNc. En la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se amplifica un fragmento de ADN utilizando iniciadores específicos y la enzima Taq polimerasa que es una enzima estable al calor, capaz de sintetizar ADN a partir de un templado de ADNc. La técnica de PCR esta formada de 3 pasos: desnaturalización, alineamiento y extensión : en el primero se desnaturaliza la doble hebra de ADN a 95°C, es decir se separan las dos hebras por calor, en el alineamiento se baja la temperatura a 55°C, para que exista un reconocimiento y apareamiento específico entre los iniciadores y las cadenas sencillas de ADN que se han separado, por último la ADN polimerasa extiende la

longitud de los iniciadores específicos a 72°C, este ciclo se repite n número veces hasta que el ADN queda amplificado y es posible visualizarlo a través de una electroforesis.

#### 5.10.1. Transcripción reversa.

En un microtubo de 0.3 mL se colocan los reactivos (previa agitación) en el orden en que se presentan. Se utilizan puntas con filtro y se trabaja en la campana de flujo laminar para evitar contaminaciones. El botón de ARN se resuspende en agua-DEPC el mismo día de su uso para la RT-PCR, antes de colocarlo en el tubo de reacción se calienta por 10 minutos a 60°C con el fin de alinear la hebra de ARN.

Para una reacción	Concentración inicial	Concentración final
2µL de amortiguador de la transcriptasa reversa	5X	1X
2µL de una mezcla de dNTP's (2'-deoxinucleósido 5'- trifosfato)	2mMc/u	0.4mM
1µL de oligodT	0.1µg/µL	0.01µg/µL
1µL de DTT	0.1M	0.01M
0.25µL de enzima transcriptasa reversa (M-MuLV)	200U/µL	50U
1.75 µL de Agua-DEPC al 1%filtrada		
1µL de Inhibidor de ARNsas (para toda la mezcla)	10U/µL	
2µL de ARN	2.5µg/µl	

10µL volumen final de la mezcla de reacción

Después de colocar los reactivos, el tubo se agita brevemente y se centrifuga, por 2 segundos y posteriormente se coloca en el termociclador (GeneAmp PCR System 9600, Perkin Elmer) bajo las siguientes condiciones:

42°C 1 hora

94°C 5 min

4°C 10min

### 5.10.2. Reacción en cadena de la polimerasa.

Al tubo de reacción de la transcriptasa reversa (10  $\mu$ L), se le adicionan los reactivos en el orden que a continuación se presentan:

Para una reacción	Concentración	Concentración
	inicial	final
5 $\mu$ L de Amortiguador de PCR	10X	1X
con cloruro de magnesio	15mM	1.5mM
5 $\mu$ L de una mezcla de dNTP's (2'-deoxinucleósido 5'- trifosfato)	2mMc/u	0.2mM
24 $\mu$ L de Agua-DEPC al 1%		
3 $\mu$ L sentido	10 $\mu$ M	0.6 $\mu$ M
3 $\mu$ L antisentido	10 $\mu$ M	0.6 $\mu$ M
0.4 $\mu$ L de enzima Taq ADN polimerasa	5U/ $\mu$ L	2U
50 $\mu$ L volumen final de la mezcla de reacción		

Momentos antes de poner la reacción en el termociclador se le agrega la enzima Taq polimerasa, se mezcla en el vortex y se coloca en el termociclador bajo las siguientes condiciones:

1 ciclo	95°C 5 min
	55°C 1 min
	72°C 1min 30 seg
33 ciclos	95°C 1 min
	55°C 1min
	72°C 1 min 30 seg
1ciclo	95°C 1 min
	55°C 1min
	72°C 7 min
	4°C 10min



### **5.11. Electroforesis de ADN. (Anexo 7)**

#### **Preparación del gel de agarosa al 1.5%.**

Se pesan 0.825 g de agarosa (Agarose MP, Boehringer Mannheim GmbH sin DNasa, ni RNasa) en un matraz erlen meyer, se le agregan 55 mL de agua desionizada y se disuelve completamente en el horno de microondas a un nivel de calentamiento de 6 durante 4 min, después se reconstituye el volumen con agua desionizada y se le adiciona 1.1mL de amortiguador TAE 50X para que la concentración final sea 1X, finalmente se le agregan 5 µL de bromuro de etidio 2 mg/mL, se agita suavemente y se vacía la mezcla a la cámara de electroforesis (Stratagene) con un peine de 12 pozos y se deja solidificar.

#### **Preparación de la muestra.**

A un microtubo estéril se le agregan:

4µL de amortiguador TAE 1X

2µL de amortiguador de carga

20µL del producto de PCR

#### **Preparación de la muestra con el marcador de peso molecular**

4µL de amortiguador TAE 1X

2µL de amortiguador de carga

2µL de marcador de peso molecular φX174 RF DNA/Hae III Fragments, GIBCO BRL. (de 72 a 1353 pares de bases) o la escalera de DNA de 100pb en 100pb hasta 1500pb de BOEHRINGER MANNHEIM.

Los tubos se agitan en el vortex y se centrifugan por 4 seg, se remueve el peine del gel de agarosa y se le agrega suficiente amortiguador TAE 1X hasta cubrir el gel y los pozos. Se colocan las muestras en los pozos y se corre el gel a 9.5V (95 volts, 95 mAmp) hasta que el azul de bromofenol migre 2/3 partes del gel, aproximadamente una hora.

## **5.12. Fotografías y densitometría.**

Se observa el gel en el transiluminador de UV (Transilluminator, Mighty bright, Hoefer) y se procede a tomar la fotografía en una cámara fotográfica (MP-ST™ Photographic System Polaroid 0.5) , con un tiempo de exposición constante de 1.30 min.

Con el negativo de la fotografía se lleva a cabo un barrido de la imagen y se realiza la densitometría con el programa Sigma Scan Imager versión 1.20.09, que proporciona los datos del área y el promedio de la intensidad.

### **5.12.1. Cálculos.**

Para graficar, se toma como referencia la proteína  $\beta$ -actina, por ser una proteína estructural, el valor arbitrario que se le asigna es 1 (uno), independientemente de la expresión génica de  $\beta$ -actina en los diferentes tejidos.

Para realizar el estudio semicuantitativo se cumplieron las siguientes condiciones:

- 1.- La concentración del ARN para la transcripción reversa fue constante (2.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) en todos los tejidos.
- 2.- Una vez concluida la reacción de la transcriptasa reversa, se tomó todo el volumen (10  $\mu\text{L}$ ) para proseguir con la reacción en cadena de la polimerasa, suponiendo que el volumen donde esta contenido el ADNc se mantiene constante entre una reacción y otra, pues los ensayos se realizaron bajo las mismas condiciones.
- 3.- El volumen de ADNc amplificado colocado en los pozos del gel de electroforesis fue el mismo (20  $\mu\text{L}$ ).
- 4.- Se mantuvieron constantes: tiempo de corrimiento (1 hora), voltaje (95Volts) y tiempo de exposición de la fotografía (1min, 30 seg).

Los datos de la densitometría son área y promedio de la intensidad, en unidades relativas y el cociente resulta en la densidad (D).

$$D = \text{Area} / \text{Promedio de la intensidad}$$

Una vez obtenida la D de cada transportador, se compara con la  $\beta$ -actina que es el control y que tiene valor de 1, lo que se grafica en el eje de las ordenadas es el resultado del cociente del transportador entre la  $\beta$ -actina.

### **5.13. Análisis estadístico.**

Los valores de las gráficas se expresan como promedio  $\pm$  error estandar de la media.

Los datos se analizaron con un análisis de varianza (ANOVA), para comparar los datos entre las diferentes etapas y la prueba de Fisher para establecer las diferencias significativas entre las mismas.

Los datos se procesaron utilizando los programas de computación Sigma Scan Imager versión 1.20.09 para la densitometría, Stat View 4.02 para las pruebas estadísticas y Microsoft Excel versión 5.0 para el cálculo de los datos y gráficas.

## 6.RESULTADOS

### 6.1.Expresión de los diferentes transportadores de aminoácidos en riñón.

Con el objeto de confirmar el funcionamiento de los oligonucleótidos diseñados para los diferentes transportadores se utilizó ARN de riñón, órgano en el cual se reporta la expresión de los transportadores de aminoácidos dibásicos y neutros, NAA-Tr y D2 (87,89) y de aminoácidos catiónicos,TACm-1 (6). Los transportadores que se expresaron en riñón (Figura 6) son los transportadores de aminoácidos dibásicos y neutros, NAA-Tr y D2; el transportador de glutamato/aspartato, XAG<sup>-</sup>; el transportador de aminoácidos catiónicos, TACm-1 y el transportador de taurina, rB16a así como la  $\beta$ -actina, control estructural de todos los experimentos, sin embargo no se observa la expresión del transportador de glicina, GLYT2. Las bandas de ADNc amplificado concuerdan con el tamaño (pares de bases) de los fragmentos de los oligonucleótidos diseñados inicialmente.

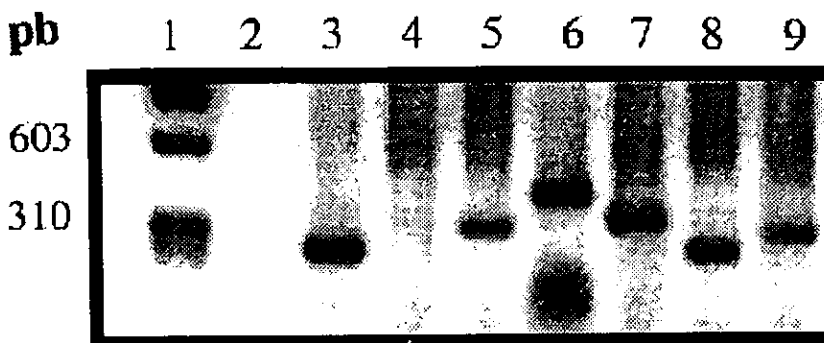


Figura 6. Expresión de los diferentes transportadores de aminoácidos en riñón. Se sintetizó ADNc a partir de 5 $\mu$ g de ARN total de riñón, aislado con tiocianato de guanidina. Para la síntesis se utilizó la enzima transcriptasa reversa M-MLV y para su amplificación (PCR) se empleó la enzima Taq polimerasa. Se colocaron 20  $\mu$ L de producto ADNc amplificado en un gel de agarosa al 1.5% con 5  $\mu$ L de bromuro de etidio. Carril 1, marcador de peso molecular  $\phi$ X174 RF DNA / HAE III fragments ; carril 2 sin ARN; carril 3 fragmento de 237 pb de  $\beta$ -actina; carril 4 fragmento de 267 pb del transportador de glicina, GLYT2 ; carril 5 fragmento de 308 pb del transportador de aminoácidos dibásicos y neutros, NAA-Tr ; carril 6 fragmento de 419 pb del transportador de glutamato/aspartato, XAG<sup>-</sup> ; carril 7 fragmento de 331 pb del transportador de aminoácidos dibásicos y neutros, D2 ; carril 8 fragmento de 242 pb del transportador de aminoácidos catiónicos, TACm-1; carril 9 fragmento de 285 pb del transportador de taurina, rB16a. n = 4 a 6.

## 6.2. Expresión de los diferentes transportadores de aminoácidos en cerebro.

El ARN de cerebro también sirvió como control, para confirmar el funcionamiento de los oligonucleótidos diseñados de los diferentes transportadores. En este órgano se reporta la expresión de los transportadores de glicina, GLYT2 (23), de glutamato-aspartato, GLAST (88), aminoácidos catiónicos, TACm-1(6) y taurina, rB16a (90). Todos los transportadores se expresaron en el cerebro (Figura 6), es decir los transportadores de aminoácidos dibásicos y neutros, NAA-Tr y D2 ; el transportador de glicina, GLYT2; el transportador de glutamato/aspartato, XAG; el transportador de aminoácidos catiónicos, TACm-1 y el transportador de taurina, rB16a así como el control estructural,  $\beta$ -actina. El tamaño (pares de bases) de los fragmentos de ADNc amplificado concuerda con las características iniciales establecidas para los oligonucleótidos.

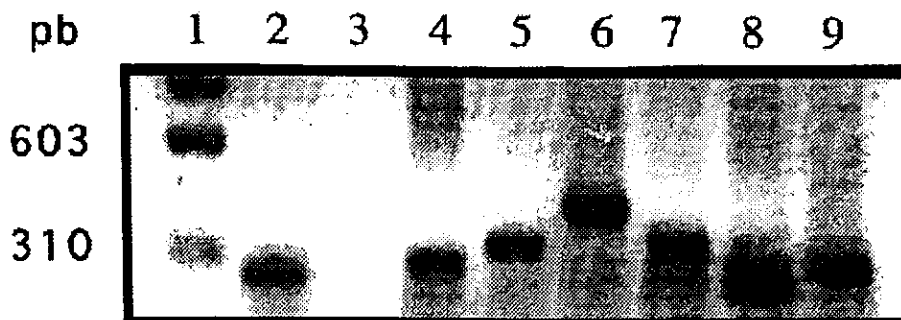


Figura 7. Expresión de los diferentes transportadores de aminoácidos en cerebro. Se sintetizó ADNc a partir de 5 $\mu$ g de ARN total de cerebro, aislado con tiocianato de guanidina. Para la síntesis se utilizó la enzima transcriptasa reversa M-MLV y para su amplificación (PCR) se empleó la enzima Taq polimerasa. Se colocaron 20  $\mu$ L de producto ADNc amplificado en un gel de agarosa al 1.5% con 5  $\mu$ L de bromuro de etidio. Carril 1, marcador de peso molecular  $\phi$ X174 RF DNA / HAE III fragments; carril 2 fragmento de 237 pb de  $\beta$ -actina; carril 3 sin ARN; carril 4 fragmento de 267 pb del transportador de glicina, GLYT2 ; carril 5 fragmento de 308 pb del transportador de aminoácidos dibásicos y neutros, NAA-Tr ; carril 6 fragmento de 419 pb del transportador de glutamato/aspartato, XAG ; carril 7 fragmento de 331 pb del transportador de aminoácidos dibásicos y neutros, D2 ; carril 8 fragmento de 242 pb del transportador de aminoácidos catiónicos, TACm-1; carril 9 fragmento de 285 pb del transportador de taurina, rB16a. n = 4 a 6.

### 6.3. Expresión de los diferentes transportadores de aminoácidos en tejido mamario de rata vírgen.

En la Figura 8 se muestra una electroforesis en gel de agarosa con los diferentes productos de PCR correspondientes a los transportadores de aminoácidos sintetizados a partir de ARN de tejido mamario vírgen. En este tejido se expresan los transportadores de glutamato-aspartato, de aminoácidos catiónicos, de taurina y además del control estructural,  $\beta$ -actina. No se expresan los transportadores de aminoácidos neutros NAA-Tr y D2, ni el transportador de glicina.

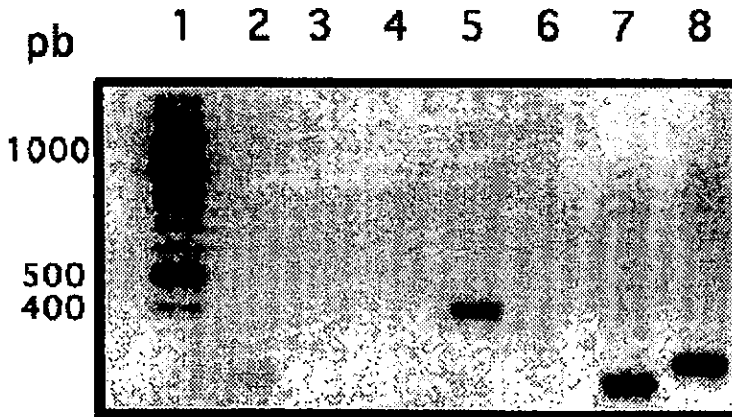


Figura 8. Expresión de los diferentes transportadores de aminoácidos en tejido mamario de rata vírgen. Se sintetizó ADNc a partir de 5 $\mu$ g de ARN total de tejido mamario vírgen, aislado con tiocianato de guanidina. Para la síntesis se utilizó la enzima transcriptasa reversa M-MLV y para su amplificación (PCR) se empleó la enzima Taq polimerasa. Se colocaron 20  $\mu$ L de producto ADNc amplificado en un gel de agarosa al 1.5% con 5  $\mu$ L de bromuro de etidio. Carril 1, marcador de peso molecular, escalera de DNA; carril 2 fragmento de 237 pb de  $\beta$ -actina; carril 3 fragmento de 267pb del transportador de glicina, GLYT2 ; carril 4 fragmento de 308 pb del transportador de aminoácidos dibásicos y neutros, NAA-Tr; carril 5 fragmento de 419 pb del transportador de glutamato/aspartato, X<sub>aa</sub>; carril 6 fragmento de 331 pb del transportador de aminoácidos dibásicos y neutros, D2 ; carril 7 fragmento de 242 pb del transportador de aminoácidos catiónicos, TACm-1; carril 8 fragmento de 285 pb del transportador de taurina, rB16a. n = 4 a 6.

6.4. Expresión de los diferentes transportadores de aminoácidos en tejido mamario de rata en el día 12 de lactancia.

En la Figura 9 se muestra una electroforesis en gel de agarosa, con los diferentes productos de PCR correspondientes a los transportadores de aminoácidos sintetizados a partir de ARN de tejido mamario durante el día 12 de lactancia. En este tejido se expresan los transportadores de glutamato-aspartato, de aminoácidos catiónicos y de taurina, además de los controles estructurales ciclofilina y  $\beta$ -actina sin embargo no se expresan los transportadores de aminoácidos neutros NAA-Tr y D2, ni el sistema de glicina.

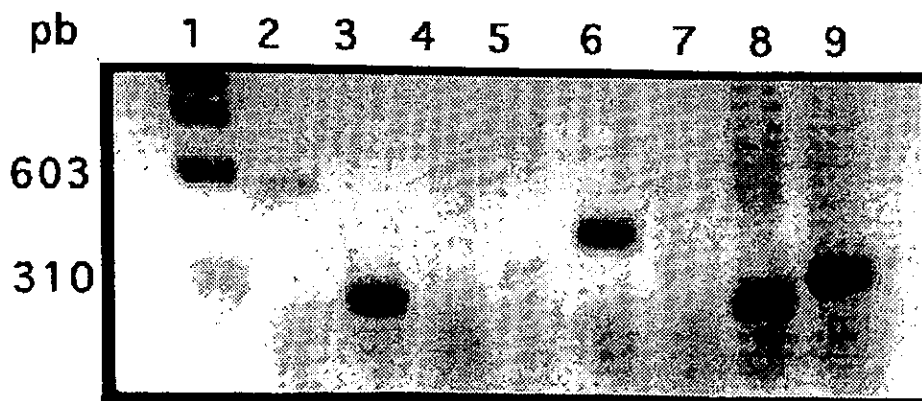


Figura 9. Expresión de los diferentes transportadores de aminoácidos en tejido mamario de rata en el día 12 de lactancia. Se sintetizó ADNc a partir de 5 $\mu$ g de ARN total de tejido mamario en el día 12 de lactancia, aislado con tiocianato de guanidina. Para la síntesis del ADNc se utilizó la enzima transcriptasa reversa M-MLV y para su amplificación (PCR) se empleó la enzima Taq polimerasa. Se colocaron 20  $\mu$ L de producto ADNc amplificado en un gel de agarosa al 1.5% con 5  $\mu$ L de bromuro de etidio. Carril 1, marcador de peso molecular  $\phi$ X174 RF DNA / HAE III fragments ; carril 2 fragmento de 569 pb de ciclofilina; carril 3 fragmento de 237 pb de  $\beta$ -actina; carril 4 fragmento de 267 pb del transportador de glicina, GLYT2 ; carril 5 fragmento de 308 pb del transportador de aminoácidos dibásicos y neutros, NAA-Tr ; carril 6 fragmento de 419 pb del transportador de glutamato/aspartato, X<sub>as</sub> ; carril 7 fragmento de 331 pb del transportador de aminoácidos dibásicos y neutros, D2 ; carril 8 fragmento de 242 pb del transportador de aminoácidos catiónicos, TACm-1; carril 9 fragmento de 285 pb del transportador de taurina, rB16a. n = 4 a 6.

6.5. Expresión de los diferentes transportadores de aminoácidos en tejido mamario de rata de 24 horas postdestete.

En la Figura 10 se muestra una electroforesis en gel de agarosa, con los diferentes productos de PCR correspondientes a los transportadores de aminoácidos sintetizados a partir de ARN de tejido mamario de 24 horas postdestete. En este tejido se expresan los transportadores de glutamato-aspartato, de aminoácidos catiónicos y taurina, así como del control estructural  $\beta$ -actina, no se expresan los transportadores de aminoácidos dibásicos y neutros NAA-Tr, D2; ni el sistema de transporte de glicina.

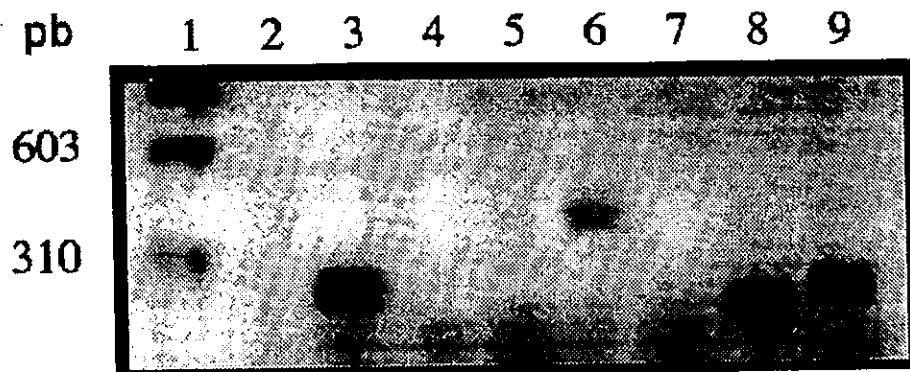
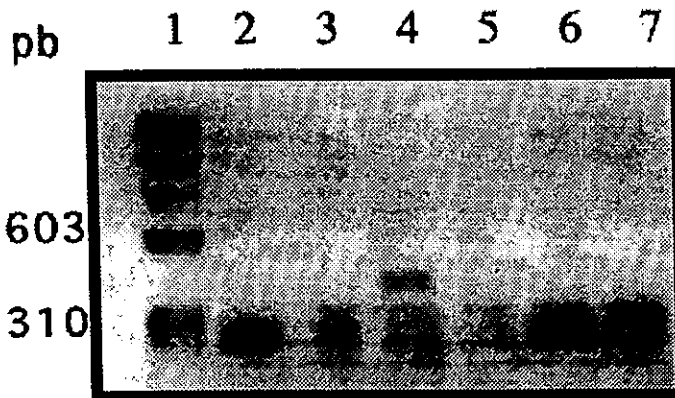


Figura 10. Expresión de los diferentes transportadores de aminoácidos en tejido mamario de rata de 24 horas postdestete. Se sintetizó ADNc a partir de 5  $\mu$ g de ARN total de tejido mamario de 24h de destete, aislado con tiocianato de guanidina. Para la síntesis del ADNc se utilizó la enzima transcriptasa reversa M-MLV y para su amplificación (PCR) se empleó la enzima Taq polimerasa. Se colocaron 20  $\mu$ L de producto ADNc amplificado en un gel de agarosa al 1.5% con 5  $\mu$ L de bromuro de etidio. Carril 1, marcador de peso molecular  $\phi$ X174 RF DNA / HAE III fragments ; carril 2 sin ARN; carril 3 fragmento de 237 pb de  $\beta$ -actina; carril 4 fragmento de 267 pb del transportador de glicina, GLYT2 ; carril 5 fragmento de 308 pb del transportador de dibásicos y neutros, NAA-Tr ; carril 6 fragmento de 419 pb del transportador de glutamato/aspartato, X<sub>aa</sub> ; carril 7 fragmento de 331 pb del transportador de dibásicos y neutros, D2 ; carril 8 fragmento de 242 pb del transportador de aminoácidos catiónicos, TACm-1; carril 9 fragmento de 285 pb del del transportador de taurina, rB16a, n = 4a 6.



**6.6. Expresión de los diferentes transportadores de aminoácidos en tejido mamario de rata de 48 horas postdestete.**

En la Figura 11 se muestra una electroforesis en gel de agarosa, con los diferentes productos de PCR correspondientes a los transportadores de aminoácidos sintetizados a partir de ARN de tejido mamario de 48 horas postdestete. En este tejido se expresan los transportadores de glutamato-aspartato, de aminoácidos catiónicos y de taurina, además del control estructural  $\beta$ -actina, no se expresa el transportador de glicina, ni los transportadores de aminoácidos neutros NAA-Tr y D2.



**Figura 11. Expresión de los diferentes transportadores de aminoácidos en tejido mamario de rata de 48 horas postdestete.** Se sintetizó ADNc a partir de 5  $\mu$ g de ARN total de tejido mamario de 48h de destete, aislado con tiocianato de guanidina. Para la síntesis del ADNc se utilizó la enzima transcriptasa reversa M-MLV y para su amplificación (PCR) se empleó la enzima Taq polimerasa. Se colocaron 20  $\mu$ L de producto ADNc amplificado en un gel de agarosa al 1.5% con 5  $\mu$ L de bromuro de etidio. Carril 1, marcador de peso molecular  $\phi$ X174 RF DNA / HAE III fragments ; carril 2 fragmento de 237 pb de  $\beta$ -actina; carril 3 fragmento de 308 pb del transportador de aminoácidos dibásicos y neutros, NAA-Tr ; carril 4 fragmento de 419 pb del transportador de glutamato/aspartato, Xaa-Tr ; carril 5 fragmento de 331 pb del transportador de aminoácidos dibásicos y neutros, D2 ; carril 6 fragmento de 242 pb del transportador de aminoácidos catiónicos, TACm-1; carril 7 fragmento de 285 pb del transportador de taurina, rB16a. n = 4 a 6.

6.7. Expresión de los diferentes transportadores de aminoácidos en tejido mamario de rata 72 horas postdestete.

En la Figura 12, se muestra una electroforesis en gel de agarosa con los diferentes productos de PCR correspondiente a los diferentes transportadores de aminoácidos sintetizados a partir de ARN de 72 horas postdestete. Este tejido muestra una ligera expresión de los sistemas de aminoácidos catiónicos, de taurina y un poco más de expresión del sistema de Glutamato /Aspartato y del control estructural  $\beta$ -actina. La densitometría no se llevó a cabo debido a que las bandas son muy tenues.

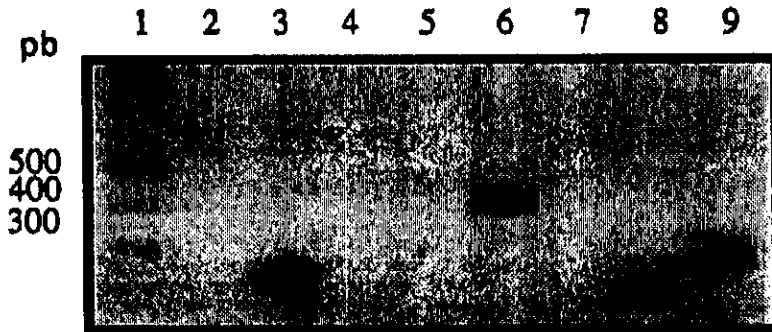


Figura 12. Expresión de los diferentes transportadores de aminoácidos en tejido mamario de rata de 72 horas postdestete. Se sintetizó ADNc a partir de 5 $\mu$ g de ARN total de tejido mamario de 72h de destete, aislado con trizol. Para la síntesis de ADNc se utilizó la enzima transcriptasa reversa M-MLV y para su amplificación (PCR) se empleó la enzima Taq polimerasa. Se colocaron 20  $\mu$ L de producto ADNc amplificado en un gel de agarosa al 1.5% con 5  $\mu$ L de bromuro de etidio. Carril 1, marcador de peso molecular, escalera de DNA ; carril 2 sin ARN; carril 3 fragmento de 237 pb de  $\beta$ -actina; carril 4 fragmento de 267pb del transportador de glicina, GLYT2 ; carril 5 fragmento de 308 pb del transportador de aminoácidos dibásicos y neutros, NAA-Tr ; carril 6 fragmento de 419 pb del transportador de glutamato/aspartato, X<sub>aa</sub> ; carril 7 fragmento de 331 pb del transportador de aminoácidos dibásicos y neutros, D2 ; carril 8 fragmento de 242 pb del transportador de aminoácidos catiónicos, TACm-1; carril 9 fragmento de 285 pb del transportador de taurina, rB16a, n =4 a 6.

6.8. Expresión de los diferentes transportadores de aminoácidos en tejido mamario de rata de 7 días posdestete.

En la Figura 13, se muestra una electroforesis en gel de agarosa donde no se observan bandas de los diferentes transportadores de aminoácidos. Este tejido no presenta expresión de los transportadores, ni del control estructural  $\beta$ -actina. La banda que se observa corresponde a la expresión de  $\beta$ -actina sintetizada a partir de ARN de cerebro, utilizada como control positivo del experimento.

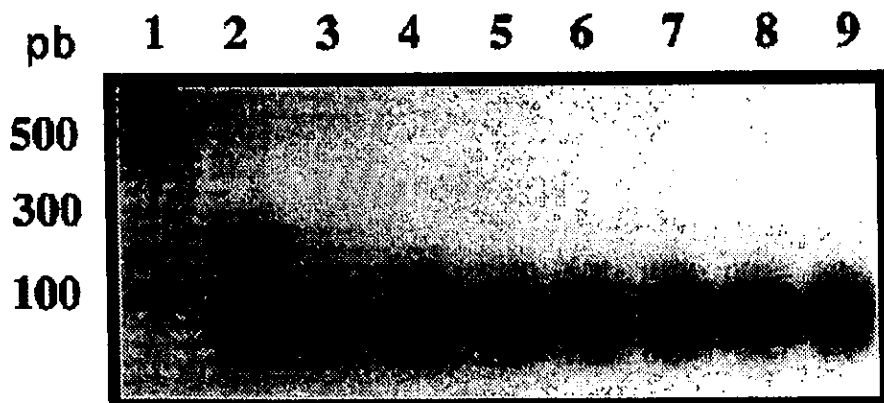
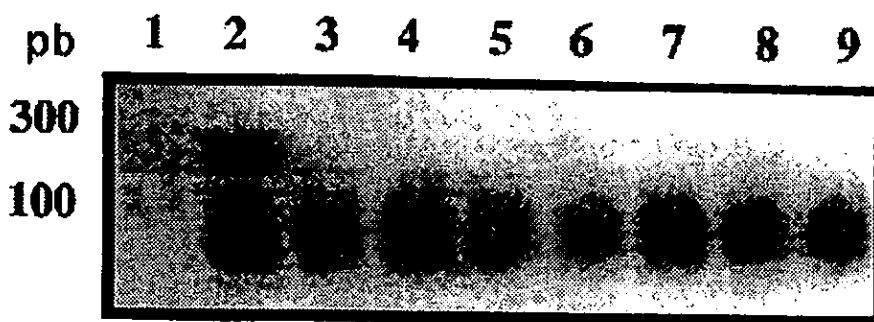


Figura 13. Expresión de los diferentes transportadores de aminoácidos en tejido mamario de rata de 7 días posdestete. Se sintetizó ADNc a partir de ARN total de tejido mamario de 7 días de destete, aislado con trizol. Para la síntesis se utilizó la enzima transcriptasa reversa M-MLV y para su amplificación (PCR) se empleó la enzima Taq polimerasa. Se colocaron 20  $\mu$ L de producto ADNc amplificado en un gel de agarosa al 1.5% con 5  $\mu$ L de bromuro de etidio. A partir del carril 3 se utilizó 5  $\mu$ g ARN de tejido mamario de 7 días posdestete y los iniciadores de los diferentes transportadores. Carril 1, marcador de peso molecular, escalera de DNA; carril 2, 5  $\mu$ g ARN de cerebro + iniciadores de  $\beta$ -actina como control positivo del experimento; carril 3, Iniciadores de  $\beta$ -actina 237 pb; carril 4, iniciadores del transportador de glicina, GLYT2 287pb; carril 5, iniciadores del transportador de aminoácidos dibásicos y neutros, NAA-Tr 308 pb; carril 6, iniciadores del transportador de glutamato/aspartato, Xaa; 419 pb; carril 7, iniciadores del transportador de aminoácidos dibásicos y neutros, D2 331 pb; carril 8, iniciadores del transportador de aminoácidos cationicos, TACm-1 242 pb; carril 9, iniciadores del transportador de taurina, rB16a. 285 pb. n = 4 a 6.

**6.9. Expresión de los diferentes transportadores de aminoácidos en tejido mamario de rata de 10 días posdestete.**

En la Figura 14, se muestra una electroforesis en gel de agarosa en el cual no se observan las bandas de los diferentes transportadores de aminoácidos, es decir, el tejido mamario de 10 días posdestete no presenta expresión de los transportadores, ni del control estructural  $\beta$ -actina. La banda que se observa corresponde a la expresión de  $\beta$ -actina sintetizada a partir de ARN de cerebro, utilizada como control positivo del experimento.



**Figura 14. Expresión de los diferentes transportadores de aminoácidos en tejido mamario de rata de 10 días posdestete.** Se sintetizó ADNc a partir ARN total de tejido mamario de 10 días de destete, aislado con trizol. Para la síntesis de ADNc se utilizó la enzima transcriptasa reversa M-MLV y para su amplificación (PCR) se empleó la enzima Taq polimerasa. Se colocaron 20  $\mu$ L de producto ADNc amplificado en un gel de agarosa al 1.5% con 5  $\mu$ L de bromuro de etidio. A partir del carril 3 se utilizó 5  $\mu$ g ARN de tejido mamario de 10 días posdestete y los iniciadores de los diferentes transportadores. Carril 1, marcador de peso molecular, escalera de DNA; carril 2, 5  $\mu$ g ARN de cerebro + iniciadores de  $\beta$ -actina como control positivo del experimento; carril 3, iniciadores de  $\beta$ -actina 237 pb; carril 4, iniciadores del transportador de glicina, GLYT2 267pb ; carril 5, iniciadores del transportador de aminoácidos dibásicos y neutros, NAA-Tr 308 pb; carril 6, iniciadores del transportador de glutamato/aspartato, X<sub>aa</sub> ; 419 pb; carril 7, iniciadores del transportador de aminoácidos dibásicos y neutros, D2 331 pb; carril 8, iniciadores del transportador de aminoácidos cationicos, TACm-1 242 pb; carril 9, iniciadores del transportador de taurina, rB16a. 285 pb. n = 4 a 6.

La Figura 15 muestra que la expresión en el tejido mamario de 12 días de lactancia presenta mayor expresión de los 3 transportadores Glu/Asp, TACm-1 y taurina en comparación con la expresión en el tejido mamario de ratas vírgenes (testigo) y posdestete.

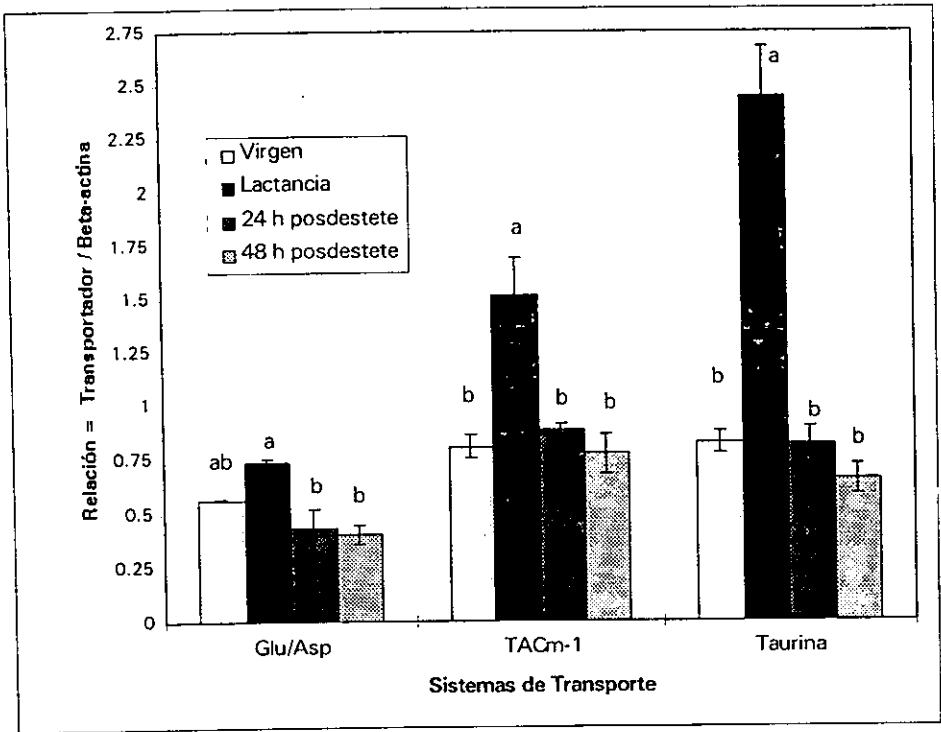


Figura 15. Comparación de la expresión de algunos transportadores de aminoácidos en diferentes etapas del tejido mamario de rata. La relación =Transportador / Beta-actina esta expresada en unidades relativas. Cada barra representa el promedio  $\pm$  error estandar de la media. Las barras con distintos superíndices son significativamente diferentes, para el transportador de glutamato / aspartato (Glu/Asp)  $p < 0.05$ , para el transportador de aminoácidos catiónicos (TACm-1)  $p < 0.0008$ , para el transportador de taurina  $p < 0.0001$ .  $n = 4$  a  $6$ .

La tabla 10 resume los valores de expresión del producto de PCR (ADN amplificado) de los tres transportadores Glu/Asp, TACm-1 y taurina que se expresan en tejido mamario en las diferentes etapas estudiadas.

Sist. Transporte	Glu/Asp		TACm-1		Taurina	
	Media UR	E.E.M.	Media UR	E.E.M.	Media UR	E.E.M.
Virgen	0.565 <sup>ab</sup>	0.005	0.806 <sup>b</sup>	0.054	0.827 <sup>b</sup>	0.049
Lactancia	0.740 <sup>a</sup>	0.01	1.515 <sup>a</sup>	0.175	2.445 <sup>a</sup>	0.235
24h posdestete	0.434 <sup>b</sup>	0.085	0.887 <sup>b</sup>	0.027	0.818 <sup>b</sup>	0.085
48h posdestete	0.402 <sup>b</sup>	0.043	0.773 <sup>b</sup>	0.090	0.655 <sup>b</sup>	0.071

Tabla 10. Valores de la expresión de los transportadores de aminoácidos en tejido mamario de rata en diferentes etapas. E.E.M.=Error Estandar de la media. UR=Unidades relativas de la relación=Transportador / Beta-actina. Los valores son promedio  $\pm$  E.E.M. Las barras con distintos superíndices son significativamente diferentes, para el transportador de glutamato/aspartato (Glu/Asp)  $p < 0.05$ , para el transportador de aminoácidos catiónicos (TACm-1)  $p < 0.0008$ , para el transportador de taurina  $p < 0.0001$ .  $n = 4$  a  $6$ .

## 6.10. Expresión génica de los diferentes transportadores durante la lactancia y el destete.

### 6.10.1. Transportador de glutamato y aspartato. Glu/Asp.

La expresión de este sistema durante la lactancia es mayor (23.65%) que la observada en el tejido mamario de ratas vírgenes. La expresión de este transportador disminuye considerablemente en el tejido mamario de 24 y 48 horas posdestete (41.35% y 45.7%) comparada con la expresión durante la lactancia (Tabla 10 y Figura 15).

La expresión del transportador en tejido mamario de 24 y 48 horas posdestete es menor que en el tejido mamario vírgen y tiende a disminuir hacia las 72 horas posdestete donde la banda se observa más tenue, (Figura 12, carril 6), a los 7 y 10 días posdestete la banda desaparece completamente (Figuras 13 y 14).

#### **6.10.2. Transportador de aminoácidos catiónicos, TACm-1.**

La expresión de este sistema en tejido mamario durante la lactancia es mayor en un 47% comparada con la expresión en el tejido mamario de ratas vírgenes. La expresión en el tejido mamario de 24 y 48 horas posdestete disminuye en un 41.4% y 49% (Tabla 10 y Figura 15) con respecto a la expresión durante la lactancia.

A las 24 horas posdestete la expresión de TACm-1 es mayor que la expresión en el tejido mamario vírgen, pero a las 48 horas posdestete la expresión la disminuye en un 4.1% de la que presenta el tejido mamario vírgen, la tendencia a la disminución se ve a las 72 horas posdestete donde la banda es muy tenue (Figura 12, carril 8), desapareciendo hacia los 7 y 10 días posdestete. (Figuras 13 y 14)

#### **6.10.3. Transportador de taurina, rB16a.**

Como se observa en la Figura 15, la expresión del transportador de taurina en la lactancia se incrementa notablemente comparada con los sistemas de Glu/Asp y TACm-1. La expresión en tejido mamario de ratas lactantes fue 1.95 veces mayor que la observada en el tejido mamario de las ratas vírgenes (Tabla 10). La expresión en el tejido mamario de 24 y 48 horas posdestete disminuyó (66.55 y 73.21% respectivamente) con respecto a la expresión observada durante la lactancia.

La expresión del transportador de taurina en el tejido mamario de 24 y 48 horas posdestete también disminuyó con respecto a la expresión observada en el tejido mamario de ratas vírgenes; esta disminución se hace más evidente en el 3er día posdestete donde se observa una banda muy tenue (Figura 12 ,carril 9), a los 7 y 10 días posdestete las bandas desaparecen totalmente. (Figuras 13 y 14)

## 7.DISCUSIÓN

### **Expresión de los transportadores de aminoácidos en diferentes etapas.**

En el pico máximo de la lactancia, el contenido de proteínas, ácidos nucleicos ADN y ARN (60,73) se mantiene elevado en el tejido mamario de rata y esta acompañado por hipertrofia e hiperplasia de la glándula mamaria (72,67) es decir hay incremento en el tamaño de la glándula provocado por el aumento en el tamaño y número de células.

Los resultados obtenidos en este estudio, indican que en el pico máximo de la lactancia también se observa un aumento en la expresión de ARN correspondiente a los transportadores de glutamato-aspartato, de aminoácidos catiónicos y taurina (Figura 15) comparado con el tejido mamario de ratas vírgenes y posdestete de 24, 48 y 72 horas. La lactancia es un estado fisiológico que requiere de una gran aporte de aminoácidos como fuente de carbono y nitrógeno para la síntesis de proteínas, ácidos grasos y lípidos de la leche (63,68,80,82), proteínas constitutivas, estructurales, de secreción, así como para la síntesis de compuestos nitrogenados y enzimas (63,66,75).

No se expresan los transportadores de aminoácidos dibásicos y neutros, ni el transportador de glicina, lo que sugiere que estos son específicos de riñón y cerebro respectivamente.

La expresión de los transportadores de aminoácidos en tejido mamario a los 7 y 10 días posdestete (Figuras 13 y 14), tampoco se observa. La integridad de ARN de 7 y 10 días posdestete es completa, ya que se visualizaron las bandas 28S y 18S del ARN en un gel de agarosa al 1.5% (Figura 4) para descartar la posibilidad de falla de los métodos o reactivos se corrió al mismo tiempo una muestra de ARN de cerebro más los iniciadores de  $\beta$ -actina, que se utilizó como control positivo de todos los experimentos. Se observa un fragmento de 237 pb correspondiente al ADNc amplificado de cerebro con  $\beta$ -actina (Figuras 13 y 14). Esto significa que realmente no existe expresión de ninguno de los transportadores en los 7 y 10 días posdestete, probablemente la vida media de los transportadores sea larga, lo que permite que las células alveolares mamarias capten aminoácidos a través de las proteínas



transportadoras remanentes, inmersas en la membrana lipídica, por algún tiempo, sin la necesidad de estar expresando los genes correspondientes a los transportadores debido a que en el destete disminuyen las necesidades nutricias, puede que existan mecanismos que inhiban la expresión génica de los transportadores por lo cual no se identifica el mensaje (ARNm) a través de la técnica RT-PCR y por lo tanto no se observan bandas de ADN amplificado correspondientes a los transportadores de aminoácidos.

En el posdestete disminuye el número de células, los alveolos están saturados de leche, hay hidrólisis del tejido secretor (60), comienza el proceso de apoptosis y por lo tanto no se expresa  $\beta$ -actina a los 7 y 10 días posdestete.

En esta etapa hay una disminución en el contenido de ADN y ARN (60,73), ya que disminuye el número de células alveolares y la síntesis proteica (60).

La acumulación de la leche y del inhibidor de retroalimentación de la lactancia (FIL) (77) así como la ausencia de prolactina, pueden reprimir o bloquear la expresión de los transportadores indicando que no son necesarios, debido a que la demanda de nutrientes ha cesado.

El tejido de destete es poco abundante y difícil de manejar por su consistencia fibrosa, el destete es una etapa atrófica o involutiva, que ha sido descrita como entidad única con actividad celular destruida (66) debido a que dentro de las células existen lisosomas, macrófagos e histiocitos, así como actividad autofágica. (67).

La glándula mamaria durante el destete disminuye sus necesidades nutricionales (67), debido a que ha dejado de ser un órgano activo, secretor y productor de leche. En esta etapa el metabolismo de la glándula mamaria está influenciado por la ausencia de succión, lo que da lugar a la reducción de los niveles de hormonas circulantes que se requieren para mantener la lactancia, además hay acumulación de lípidos, proteínas (92) y el FIL (77), todo esto afecta la actividad metabólica de la glándula (51).

En respuesta al factor inhibidor de la prolactina PIF (60) y en ausencia de succión se detiene la secreción de la prolactina disminuyendo a su vez los receptores situados en la superficie de las células alveolares mamarias (79,93). Estos receptores son sensibles a la destrucción por enzimas proteolíticas (79).

En el destete, la producción de leche disminuye al igual que la actividad de diferentes enzimas (79,94) involucradas en la síntesis de proteínas, lactosa, glucosa, ácidos grasos y lípidos, así como en procesos como la transaminación y oxidación de aminoácidos (67,71).

El control intramamario, manejado por FIL, permite que la secreción de la leche se regule por la salida de la misma (51,77).

En el destete disminuyen notablemente las diferencias arteriovenosas y la captación de aminoácidos (66,74). Viña (64), encontró que en el pico de la lactancia las diferencias arteriovenosas son elevadas para los aminoácidos aniónicos (glutamato, aspartato) y cationicos (lisina, arginina) disminuyendo notablemente a las 24 hrs posdestete, esto concuerda con lo obtenido en este estudio donde se observa un patrón de disminución en la expresión de los transportadores encargados de movilizar aminoácidos aniónicos y catiónicos a través del tejido mamario de 1, 2, 3, 7 y 10 días posdestete (Figuras 10,11,12,13,14), no se han determinado las diferencias arteriovenosas para la taurina, en este estudio se observa que la expresión de taurina se encuentra elevada en la lactancia y disminuye su expresión conforme transcurre el tiempo de posdestete. (Figura 15).

En este estudio encontramos que los transportadores que se expresan en el tejido mamario son los encargados de transportar aminoácidos catiónicos, aspartato-glutamato y taurina, estos dos últimos aminoácidos se encuentran en concentraciones altas y libres en la leche.

El ácido glutámico se encuentra en altas cantidades de forma libre y es el aminoácido más abundante en las proteínas de la leche (45, 46, 66), representa el 12% de los aminoácidos en la  $\alpha$ -caseína de la leche bovina (44).

La gran demanda de éste aminoácido aniónico se refleja en las diferencias arteriovenosas a través de la glándula lactante mamaria de diferentes especies (10,42,66,70).

El L-glutamato es el principal neurotransmisor para la excitación de las neuronas y está involucrado en procesos fisiológicos como la memoria y el aprendizaje (28,95).

El ácido glutámico se encuentra en la leche humana en concentraciones elevadas (1.4mM), contribuyendo de manera importante como aminoácido libre en la leche

(67,96). En la leche humana, el glutamato se encuentra 50 veces más concentrado que en el plasma (97).

Como podemos observar en la Figura 15 el transportador de glutamato/aspartato se expresa en tejido mamario vírgen, en lactancia y 24,48,72 horas posdestete, observando una mayor expresión durante la lactancia, y una disminución en los primeros días posdestete, esto concuerda con lo referido por Shennan (46), en el destete el transportador de aminoácidos aniónicos disminuye su captación, por la acumulación de la leche, además de que este transportador no se afecta por la ausencia de prolactina, ya que las diferencias arteriovenosas de los aminoácidos aniónicos no cambian con el tratamiento de bromocriptina. (46,64).

El ácido glutámico se sintetiza a partir de glutamina dentro de la célula, donde la proporción de glutamina : ácido glutámico es 2:1, en la leche la proporción se invierte 1:2, (96) lo que significa que probablemente el glutamato libre en la leche proviene de la síntesis interna, así como del transporte del mismo a través de las células alveolares. Este estudio apoya lo anterior, ya que el transportador de glutamato se expresa en el tejido mamario (Figura 15), probablemente el glutamato proviene de la hidrólisis del glutatión ( $\gamma$ -glutamil-cisteinil-glicina) y de aminoácidos como la glutamina, arginina y ornitina (63,66,68,69,83).

Como podemos observar en la Figura 15, la expresión del transportador de glutamato-aspartato no es muy notable comparada con los otros transportadores de aminoácidos catiónicos y taurina, de hecho es el transportador que se expresa en menor proporción en el tejido mamario lactante (Figura 9), por lo anterior y debido a que el glutamato es un aminoácido que se encuentra abundante en forma libre en la leche y se capta hasta en un 70% del plasma (42,46), sugerimos que probablemente existen otros transportadores o vías de entrada aparte de la propuesta en este estudio que transporten glutamato, ya que en general los transportadores son de alta capacidad y baja afinidad hacia los sustratos (5).

El supuesto de que en un mismo tejido existan varios transportadores con la misma afinidad de sustratos se observa en cerebro de humano, que presenta diferentes transportadores de aminoácidos excitatorios (TAAE), como son TAAEh1 (hGluT-1), TAAEh2 (GLT-1) y TAAEh3 (14).

La secuencia del fragmento del transportador de glutamato-aspartato obtenida del RT-PCR en tejido mamario fue secuenciada en el laboratorio de Nutriología Molecular del INNSZ y presenta gran identidad (sentido 94% y antisentido 100 %) con el ADNc del transportador GLAST clonado en cerebro (88), que es dependiente de sodio, posee afinidad por L-aspartato, L-glutamato y sus constantes cinéticas son: para L-glu  $K_m = 77 \mu\text{M}$ ,  $V_{m\acute{a}x} = 600$  pmol por ovocito y para L-asp  $K_m = 65 \mu\text{M}$ ,  $V_{m\acute{a}x} = 290$  pmol por ovocito. Se localiza en cerebro, cerebelo y no en hígado, corazón, músculo esquelético y riñón (89), esto último es contradictorio con lo obtenido en este estudio, pues observamos expresión de este transportador (Figura 6, carril 6) en riñón, las diferencias pueden ser debidas a la sensibilidad de las técnicas utilizadas.

En explantes de tejido mamario y perfundido de rata lactante, se ha caracterizado (58) un cotransportador de  $\text{Na}^+$ - glutamato, dependiente de sodio y considerado como la vía más frecuente para el transporte de éste aminoácido en el tejido mamario, tiene gran afinidad por L-glutamato y especificidad por L y D-aspartato. Sus propiedades farmacológicas y propiedades cinéticas (45,58) (explantes  $K_m = 91.5 \mu\text{M}$ ,  $V_{m\acute{a}x} = 130$  nmoles/ g tej/min y perfundido  $K_m = 16.8 \mu\text{M}$ ,  $V_{m\acute{a}x} = 40$  nmoles/ g tej/min), son diferentes al clonado en cerebro (88).

Otro transportador que se expresa en tejido mamario es el de  $\beta$ -aminoácidos que transporta  $\beta$ -alanina, hipotaurina y taurina este último es un  $\beta$ -aminoácido no proteico que se encuentra en forma libre y es abundante en la leche humana (67,97), rata (46,53) y jerbo (46).

En humano la concentración de taurina en la leche es de 0.3mM, en la rata es de 150  $\mu\text{M}$  (3 veces más concentrado en la leche que en el plasma) y en el jerbo es de 6mM (46,53,67).

Además las crías de la rata son capaces de sintetizar más taurina a pesar de que la leche que reciben contiene altas cantidades de éste  $\beta$ -aminoácido (46). En los humanos se observa que la taurina se sintetiza a partir de precursores como la cisteína y metionina. La glándula mamaria de humano tiene la capacidad de concentrar la taurina en la leche con respecto al plasma (53) y lo hace a través de las proteínas transportadoras inmersas en las membranas celulares mamarias (46,53,54).

La taurina es un aminoácido abundante en la leche y por lo tanto la expresión del transportador de taurina se encuentra elevada en el tejido mamario de rata lactante como se observa en la Figura 15, con respecto al tejido mamario virgen y de 24,48,72 horas posdestete. Estos resultados indican que el tejido mamario lactante es un importante sitio para el transporte de taurina.

La taurina, es importante por sus funciones biológicas, es un osmolito intracelular que esta involucrada en procesos de síntesis y conjugación de ácidos biliares en hepatocitos, en la neuroinhibición y excitabilidad neural, en el metabolismo del zinc y la modulación del flujo de calcio, en la antioxidación, en la detoxificación. La deficiencia de taurina se asocia con ceguera retinal, anormalidades en la función inmune, anormalidades en la función cardíaca y anormalidades reproductivas (98).

Cabe notar que el transportador de taurina muestra una mayor expresión durante la lactancia con respecto a los transportadores de glutamato/aspartato y aminoácidos catiónicos, lo que sugiere que es la vía principal para el ingreso de  $\beta$ -aminoácidos en el tejido mamario.

En el laboratorio de Nutriología Molecular se secuenció el producto de RT-PCR del tejido mamario lactante correspondiente al transportador de taurina. Se encontró que las secuencias poseen una gran identidad (sentido 90% y antisentido 99%) con el ADNc del transportador clonado en cerebro (90).

El transportador de taurina en cerebro y explantes de tejido mamario de rata lactante dependen de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , y presentan valores de  $K_m = 43\mu\text{M}$  similares y  $V_{m\acute{a}x}$  de 0.96 nmol/mg de proteína y de 37.5  $\mu\text{mol} / \text{kg}$  agua celular / 15 min respectivamente (90,53).

La Figura 15 muestra que la expresión del transportador de aminoácidos catiónicos en la lactancia se encuentra aumentada con respecto a la expresión en el tejido mamario virgen y posdestete, debido a que en la lactancia existe mayor demanda de aminoácidos catiónicos (10,57) para su incorporación a las proteínas de la leche, o bien para la síntesis de aminoácidos dispensables.

Se ha encontrado que a partir de la arginina se sintetiza prolina, ornitina, glutamato y a partir de la ornitina se sintetiza prolina y glutamato (66), la prolina es abundante en la leche (66) y aún no se ha identificado un transportador específico para este

aminoácido dispensable, probablemente la arginina sea la fuente más importante para su síntesis.

Se ha observado en diferentes especies como la vaca, cabra y cerdo (10,42,66) que la arginina y lisina son captadas en exceso por la glándula mamaria lactante. En humano (67) se encontró que existe una alta incorporación de lisina a las proteínas de la leche.

El producto de RT-PCR correspondiente al transportador de aminoácidos catiónicos fue secuenciado en el laboratorio de Nutriología Molecular, se encontró que el transportador en tejido mamario lactante comparte 100% de identidad (secuencias sentido y antisentido) con el ADNc del transportador de aminoácidos catiónicos TACm-1 que pertenece al transportador  $\gamma^+$ , que transporta L-lisina, L-arginina, L-ornitina y se distribuye en la mayoría de las células donde tiene doble función ya que actúa como receptor del virus ecotrópico murino y como transportador de aminoácidos catiónicos, se induce en respuesta a hormonas como insulina y glucocorticoides (6).

Se ha reportado que el transportador de aminoácidos catiónicos en tejido mamario (43,46) se regula por la prolactina, debido a que las diferencias arteriovenosas de arginina y lisina disminuyen en presencia de bromocriptina (64).

La Figura 15 muestra que en el pico de la lactancia existe elevación en la expresión del transportador de aminoácidos catiónicos TACm-1 comparada con la etapa virgen y destete. A pesar de que no se determinó la concentración de prolactina en plasma sabemos que durante la lactancia la prolactina se ve incrementada y disminuye al iniciar el destete (78,93), por lo anterior podemos sugerir que el patrón observado en la expresión del transportador de aminoácidos catiónicos esta regulado por la presencia y ausencia de prolactina.

En la glándula mamaria de rata lactante se ha descrito un transportador similar al  $\gamma^+$  caracterizado por su afinidad a la lisina y arginina, independencia de  $\text{Na}^+$  y su interacción entre aminoácidos zwitteriónicos y catiónicos, se localiza en la membrana basolateral (43). Con los resultados obtenidos en este estudio podemos sugerir que se trata del mismo transportador que se ha caracterizado en tejido mamario de rata (43) y probablemente sea similar al transportador de aminoácidos catiónicos, TACm-1, que pertenece al transportador  $\gamma^+$ , ya que posee 100% de identidad.

## 8.CONCLUSIONES

- 1.El tejido mamario de rata durante las etapas: vírgen, lactancia, 24, 48 y 72 horas posdestete mostraron una inducción específica de los transportadores de glutamato/aspartato (GLAST), de aminoácidos catiónicos (TACm-1) y taurina (rB16a), esto significa que existe mensaje (ARNm) que codifica para éstos transportadores en las células alveolares mamarias.
- 2.No se observó expresión para los transportadores de glicina y aminoácidos neutros-básicos, NAA-Tr y D2, lo que sugiere que no existen estos transportadores en tejido mamario.
- 3.En el tejido mamario de 7 y 10 días posdestete no se expresan ninguno de los transportadores.
- 4.Durante la lactancia el tejido mamario tiene mayor expresión de los transportadores de aminoácidos comparado con el destete que sigue una tendencia a disminuir conforme transcurre el tiempo.
- 5.Los fragmentos secuenciados de los productos de RT-PCR correspondientes a los transportadores de glutamato/aspartato (GLAST), de aminoácidos catiónicos (TACm-1) y taurina (rB16a), identificados en el tejido mamario tienen gran identidad con las secuencias de ADNc de los transportadores originales.
- 6.Los resultados sugieren que el transportador de glutamato/aspartato (GLAST), no es la única vía para el transporte de aminoácidos aniónicos en el tejido mamario, pues la expresión observada es baja con respecto a los otros transportadores y la demanda de glutamato por las células alveolares es elevada.
7. El transportador de taurina (rB16a) se expresa más que los transportadores de aminoácidos aniónicos y catiónicos en el tejido mamario y especialmente en la lactancia.
8. El fragmento secuenciado, correspondiente al transportador de aminoácidos catiónicos (TACm-1) en tejido mamario posee 100% de identidad con el descrito como sistema  $y^+$ .

## 9.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- 1.-Avila C.E., Torres T.N, Tovar P.A. Transporte de aminoácidos zwitteriónicos en células de mamíferos. Rev.Invest Clin. 49 323-38 (1997).
- 2.-Kakuda D.K., McLeod C.L. Na<sup>+</sup>-independent transport (uniport) of amino acids and glucose in mammalian cells. J Exp Biol. 196 93-108 (1994).
- 3.-Peña A. Las membranas de las células. Editorial Fondo de Cultura Económica. Primera edición. México, 1986.
- 4.-Howard R. P. Molecular Biology of Membranes.Editorial Plenum Press. USA, 1993.Chapter 4.
- 5.-McGivan J. D., Pastor-Anglada. Regulatory and molecular aspects of mammalian amino acids transport. Biochem J. 299 321-34 (1994).
- 6.-Aulak K.S, Liu J., Wu J., Hyatt S.L., Puppi M., Henning S.,Hatzoglou M. Molecular sites of regulation of expression of the rat cationic amino acid transporter gene.J Biol Chem. 271 29799-806 (1996).
- 7.-McGivan J.D. Mammalian amino acid transporters and their regulation. Biochem Soc Trans. 24 837-8 (1996).
- 8.-Gennis R.B. Biomembranes: molecular structure and function. Editorial Springer-Verlag. Primera edición. USA, 1989.Chapter 8.
- 9.-Barker G.A., Ellory J.C. The identification of the neutral amino acid transport systems.
- 10.-Baumrucker C.R. Symposium: Nutrient Uptake across mammary gland. Amino acid transport systems in bovine mammary tissue. J Dairy Sci. 68 2436-51 (1985).
- 11.-Kilberg M.S., Stevens B.R., Novak D.A. Recent advances in mammalian amino acid transport. Annu Rev Nutr. 13 137-65 (1993).
- 12.-Collarini E.J., Oxender D.L. Mechanisms of transport of amino acids across membranes. Annu Rev Nutr. 7 75-90 (1987).
- 13.-Le Cam A., Freychet P. Neutral amino acid transport. J Biol Chem. 252 148-56 (1977).
- 14.-Avila C. E., Torres T. N, Tovar P.A. Nuevos conocimientos del transporte de aminoácidos aniónicos y catiónicos. Rev.Invest Clin. 49 411-24 (1997).



- 15.-Kilberg M.S., Christensen H.N., Handlogten M.E. Cysteine as a system-specific substrate for transport system ASC in rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 88 744-51 (1979).
- 16.-Shafgat S., Faircloth M.V., Guadaño F.A., Fremeau R.T. Molecular characterization of neurotransmitter transporters. *Molecular Endocrinology.* 7 1517-29 (1993).
- 17.-Vadgamma J.V., Christensen H.N. Wide distribution of pH-dependent service of transport system ASC for both anionic and zwitterionic amino acids. *J Biol Chem.* 259 3648-52 (1984).
- 18.-Bussolati O., Laris P.C., Rotoli B.M., Dall' Asta V. Gazzola G.C. Transport system ASC for neutral amino acids. *J. Biol Chem.* 267 8330-5 (1992).
- 19.-MacLeod C.L. Regulation of cationic amino acid transport. *The Biochemical Society Meeting.* 658 38 (1996).
- 20.-Lambert I. H., Mollerup J. Regulation of the  $\beta$ -system in Ehrlich ascites tumor cells. *Amino Acids.* 9 21 (1995).
- 21.-Uchida S., Kwon H.M., Yamauchi A., Preston A.S. Marumo F., Handler J.S. Molecular cloning of the cDNA for and MDCK cell  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  dependent taurine transporter that is regulated by hypertonicity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89 8230-4 (1992).
- 22.-Liu Q.R., López-Corcuera B., Nelson H., Mandiyan S., Nelson N. Cloning and expression of a cDNA encoding the transporter of taurine and  $\beta$ -alanine in mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89 12145-49 (1992).
- 23.-Liu Q.R., López C.B., Mandiyan S., Nelson H., Nelson N. Cloning and expression of a spinal cord- and brain-specific glycine transporter with novel structural features. *J Biol Chem* 268 22802-8 (1993).
- 24.-Liu Q.R., López-Corcuera B., Mandiyan S., Nelson H., Nelson N. Cloning and expression of a spinal cord -and brain- specific glycine transporter with novel structural features. *J Biol Chem.* 268 22802-8 (1993).
- 25.-Dinkelborg L.M., Kinne R.K.H., Grieshaber M.K. Characterization and pH dependence of L-glutamate transport in sarcolemmal vesicles from rat hearts. *Am J Physiol.* 268 H194-201. (1995).

- 26.-Rothstein J.D., Martin I., Levey A.I., Dykes-Hoberg M., Jin L., Wu D., Nash N., Kunczi W.R. Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron*. 13 713-25 (1994).
- 27.-Arriza J. L., Fairman W.A., Wadiche J.I., Murdach G.H., Kavanaugh M.P., Amara S.G. Functional comparisons of three glutamate transporter subtypes cloned from human motor cortex. *J Neurosci*. 14 5559-69 (1994).
- 28.-Pines G., Danbolt N. C., Bjørås M., Zhang Y., Bendahan A., Eide L. Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature*. 360 464-7 (1992).
- 29.-Fairman W.A., Vandenberg R., Arriza J.L., Kavanaugh M., Amara S. G. An excitatory amino acid transporter with properties of a ligand-gate chloride channel. *Nature*. 375 599-603 (1995).
- 30.-MacLeod C.L. Regulation of cationic amino acid transporter (CAT) gene expression. *Biochem Soc Trans*. 24 846-52 (1996).
- 31.-White M.F., The transport of cationic amino acids across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta*. 822 355-74 (1985).
- 32.-Malandro M.S., Kilberg M.S. Molecular biology of mammalian amino acid transporters. *Annu Rev Biochem*. 65 305-36 (1996).
- 33.-Closs E. Y., Cunningham J. M., Foistermann U. Transport properties of mouse and human cationic amino acid transporters are determined by a protein domain of 40 amino acid. *Amino Acids*. 9 16 (1995).
- 34.-Albritton L.M., Tseng L., Scaddnen D., Cunningham J.M. A putative murine ecotropic retrovirus receptor gene encodes a multiple membrane -spanning protein and confers susceptibility to virus infection. *Cell*. 57 659-66 (1989).
- 35.-Kavanaugh M., Wang H., Zhang Z., Zhang W., Wu Y.N., Dechant E., North R.A., Kabat D. Control of cationic amino acid transport and retroviral receptor functions in a membrane protein family. *J Biol Chem*. 269 15445-50 (1994).
- 36.-MacLeod C.L. Complex regulation of the cationic amino acid transporter, mCAT-2. *Amino Acids*. 9 21-22 (1995).
- 37.-Closs E.I., Lyons C.R., Kelly C., Cunningham J.M. Characterization of the third member of the TACM family of cationic amino acid transporter. *J Biol Chem*. 268 20796-800 (1993).

- 38.-Palacín M. Chillarón J. Mora C. Role of the b<sup>0+</sup> like amino acid- transport system in the renal reabsorption of cystine and dibasic amino acids. *Biochem Soc Trans.* 24 856-63 (1996).
- 39.-Mosckovitz R., Yan N., Heimer E., Felix A., Tate S.S., Udenfriend S. Characterization of the rat kidney neutral and basic amino acid transporter utilizing anti-peptide antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90 4022-26 (1993).
- 40.-Mosckovitz R., Udenfriend S., Felix A., Tate S.S. Membrane topology of the rat kidney neutral and basic amino acid transporter. *FASEB J.* 8 1069-74 (1994).
- 41.-Metcalf J.A., Sutton J.E., Cockburn D.J. Napper and Beever D.E. The influence of insulin and amino acid supply on aminoacid uptake by the lactating bovine mammary gland. *J Dairy Sci.* 74 3412-20 (1991).
- 42.-Guinard J and Rulquin H. Effect of graded levels of duodenal infusions of caseins on mammary uptake in lactating cows. 1. Individual amino acids. *J. Dairy Sci.* 77 3565-76 (1994).
- 43.-Calvert D.T., Shennan D.B. Evidence for an interaction between cationic and neutral amino acids at the blood-facing of the lactating rat mammary epithelium. *J Dairy Res.* 63 25-33 (1996).
- 44.-Millar I.D., Calvert D.T., Lomax M.A., Shennan D.B. The mechanism of L- glutamate transport by lactating mammary tissue. *Biochim Biophys Acta.* 1282 200-6 (1996).
- 45.-Millar I.D., Calvert D.T., Lomax M.A., Shennan D.B. Sustrate specificity of the mammary tissue anionic amino acid carrier operating in the cotransport and exchange modes. *Biochim Biophys Acta.* 1326 92-102 (1997).
- 46.-Shennan D.B., Millar I.D., Calvert D.T. Mammary tissue amino acid transport systems. *Proc Nutr Soc.* 56 177-91 (1997).
- 47.-Stryer L. *Bioquímica*. Editorial Reverté. Edición cuarta. España, 1995. Tomo 1.
- 48.-Neville M.A., Lobitz C.J., Ripoll E.A., Tinney C. The sites for  $\alpha$ -aminoisobutyric acid uptake in normal mammary gland and ascites tumor cells. *J. Biol Chem.* 225 7311-7316 (1980).
- 49.-Shennan D.B., Mc. Neillie S.A. Characteristics of  $\alpha$ -aminoisobutyric acid transport by lactating rat mammary gland. *J Dairy Res.* 61 9-19 (1994).

- 50.-Tedstone A.E., Ilic V., Williamsom D.H. Reciprocal changes in amino acid metabolism in mammary gland and liver of the lactating rat of starvation and refeeding as indicated by the tissue acumulation of  $\alpha$ -amino [1-  $^{14}$ C] isobutyrate. *Biochem J* 268 799-802 (1990).
- 51.-Shillingford J.M., Shennan D.B. and Beechey R.B. The regulation of anion transport in lactating mammary tissue. *Biochem Soc Trans.* 23 26s (1995).
- 52.-Avila C.E. Características del transportador de aminoácidos zwitteriónicos cortos (Sistema A) en hígado y tejido mamario de la rata y su expresión funcional en ovocitos de *Xenopus laevis*. UNAM. México, 1998.
- 53.-Shennan D.B., Mc. Neillie S.A. High affinity ( $\text{Na}^+$ -  $\text{Cl}^-$ ) dependent taurine transport by lactating mammary tissue. *J Dairy Res.* 61 335-343 (1994).
- 54.-Shennan D.B., Cliff M.J., Hawkins P. Volume-sensitive taurine efflux from mammary tissue is not obliged to utilize volume activated anion channels. *Bioscience reports* . 16 459-65 (1996).
- 55.-Hemler M.E., Strominger J.L. Characterization of the antigen recognized by the monoclonal antibody (4F2): different molecular forms on human T and B lymphoblastoid cell lines. *J Immunol.* 129 623-8 (1982).
- 56.-Shennan D.B. Mc. Neillie S.A., Jamieson E.A., Calvert D.T. Lysine transport in lactating rat mammary tissue: evidence for an interaction between cationic and neutral aminoacid. *Acta Physiol Scand.* 151 461- 6 (1994).
- 57.-Baumrucker C.R. Cationic amino acid transport by bovine mammary tissue. *J Dairy Sci.* 67 2500-06 (1984).
- 58.-Millar I.D., Calvert D.T., Lomax M.A., Shennan D.B. Interaction between anionic amino acids and the mammary tissue ( $\text{Na}^+$ -glutamate) cotransporter. *Biochem Soc Trans.* 24 333s (1996).
- 59.-Millar I.D., Calvert D.T., Lomax M.A., Shennan D.B. Evidence for a high affinity  $\text{Na}^+$  dependent glutamate transport system in lactating rat mammary tissue *Biochem Soc Trans.* 23 567s (1995).
- 60.-Schmidt G.H. *Biología de la Lactación*. Editorial Acribia. Primera edición. España, 1974. Capítulos 1-7.

- 61.-Austin C.R., Short R.V. **Reproduction in mammals: 3 Hormonal of reproduction.** Editorial Cambridge University Press. Segunda edición. Great Britain, 1990 .
- 62.-Lesson T.S. **Texto Atlas de Histología.** Editorial Mc Graw Hill. Edición. México, 1990.
- 63.-Bequette B.J. and Colette B.F.R. **Amino acid supply and metabolism by the ruminant mammary gland.** Proc Nutr Soc. 56 593-605 (1997).
- 64.-Viña J., Puertes I.R., Saenz G.T., Viña J.R. **Role of prolactin in amino acid uptake by the lactating mammary gland of the rat.** FEBS Lett. 126 250-2 (1981).
- 65.-Williamsom D.H. **Regulation of metabolism during lactation in the rat.** Reprod Nut Develop. 26 172-85. (1986).
- 66.-Trottier N.L., Shipley C.F. Eastear R.A., **Plasma amino acid uptake by the mammary gland of the lactating sow.** J Anim Sci. 75 1266-78 (1997).
- 67.-De Santiago S. **Adaptaciones en el metabolismo de proteínas en la rata madre durante la lactancia y el destete** *Catabolismo de aminoácidos de cadena ramificada.* UNAM. México, 1997.
- 68.-Clark J.H., Spires H.R., Davis C.L. **Uptakes and metabolism of nitrogenous components by the lactating mammary gland.** FED Proc. 37 1233-38 (1978).
- 69.-Millican P.E., Vernon R.G., Pain V.M. **Protein metabolism in the mouse during pregnancy and lactation.** Biochem J. 248 251-7 (1987).
- 70.-Viña J.R., Williamson D.H. **Effects of L-alanine and L- glutamine by lactating mammary gland of the rat.** Biochem J. 196 757-62 (1981).
- 71.-De Santiago S., Torres N., Tovar A.R. **Leucine, catabolism in mammary tissue, liver and skeletal muscle of dam rat during lactation and weaning.** Archives of medical research. 29 25-32 (1998).
- 72.-Williamson D.H. **Integration of metabolism in tissues of the lactating rat.** FEBS Letters 117 K93-K105 (1980).
- 73.-De Santiago S., Hernandez M.H., Flores H.S., Villalpando S. **Changes in the composition of mammary tissue, liver un muscle of rat dams during lactation and after weaning.** J Nutr. 1991 121 37-43 (1991).
- 74.-Viña J.R., Puertes I.R., Viña J. **Effect of premature weaning on amino acids uptake by the mammary gland of lactating rats.** Biochem J. 200 705-8 (1981).

- 75.-Trottier N.L. Nutritional control of amino acid supply to the mammary gland during lactation in the pig. *Proc Nutr Soc.* 56 581-91 (1997).
- 76.-Prosser C.G., Davis S.R., Fair V.C., Lacasset P. Regulation of blood flow in the mammary microvasculature. *J Dairy Sci.* 79 1184-97 (1996).
- 77.-Wilde C.J., Addey C., Boddy L.M., Peaker M. Autocrine regulation of milk secretion by a protein in milk. *Biochem J.* 305 51-8 (1995).
- 78.-Holcomb H.H., Costlow M.E., Buschow R.A., Mc Guire W.L. Prolactin binding in rat mammary gland during pregnancy and lactation. *Biochim Biophys Acta.* 428, 104-112 (1976).
- 79.-Hayden T.J., Smith S.V. Effects of bromocriptine and occlusion of nipples on prolactin receptor and lactose synthetase activity in the mammary gland of the lactating rat. *J Endocr.* 91 225-32 (1981).
- 80.-Viña J.R., Williamson D.H. Effects of lactation on L-leucine metabolism in rat. *Biochem J.* 194 941-7 (1981).
- 81.-Meister A. *Biochemistry of the amino acid.* Academic Press Inc. New York , 1957.
- 82.-Wang S., Webb K.E., Akers M.R. Peptide bound methionine can be a source of methionine for the synthesis of secreted proteins by mammary tissue explants from lactating mice. *J Nutr* 126 1662-72 (1996).
- 83.-Pocius P.A., Clark J.H., Baumrucker C.R. Glutathione in bovine blood: Possible source of amino acids for milk synthesis. *J Dairy Sci.* 64 1551- 54 (1981).
- 84.-Ortiz O.N., De Santiago S. Significance of lipid consumption during lactation. *Rev Inv Clin.* 48 473-8 (1996).
- 85.-Chirwin J.M., Przybyla A.E., MacDonald R.J., and Rutter W.J. *Biochemistry.* 18 5294-99 (1979).
- 86.-Chomczynski P., and Sacchi N. *Analytical Biochemistry.* 162 156-9 (1987).
- 87.-Tate S.S., Yan N., Udenfriend S. Expression cloning of a Na<sup>+</sup> independent neutral amino acid transporter from rat Kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89 1-5 (1992).
- 88.-Storck T., Schulte S., Hofmann K., Stoffel W. Structure, expression, and functional analysis of a Na<sup>+</sup> - dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89 10955-59 (1992).

- 89.-Wells R.G., Hediger M.A. Cloning of a rat Kidney cDNA that stimulates dibasic and neutral amino acid transport and has sequence similarity to glucosidases .Proc Natl Acad Sci USA. 89 5596-600 (1992).
- 90.-Smith K.E., Borden L.A., Wang C.D., Hartig P.R. Branchek T.A., Weinsank R.L. Cloning and expression of a high affinity taurine transporter from rat brain. Molecular Pharmacology. 42 563-9 (1992).
- 91.-Manual Oligo 1000 DNA Synthesizer operating instructions. USA, 1992. Chapter 8 .
- 92.-Silver I.A. Vascular changes in the mammary gland during engorgement with milk. Journal of Physiology . 133 65P (1956).
- 93.-Hayden T.J., Bonney R.C., Forsyth I.A. Ontogeny and control of prolactin receptors in the mammary gland and liver of virgin, pregnant and lactating rats. J Endocr. 80 259-69 (1979).
- 94.-Jones E.A. The relationship between milk accumulation and enzymes activities in the involuting rat mammary gland. Biochim.Biophys.Acta. 177 158-60 (1968).
- 95.-Kanai Y., Hediger M.A. Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. Nature. 360 467-71 (1992).
- 96.-Meijer G., Van der Meulen J., Van Vauren M. Glutamine is a potentially limiting amino acid for milk production in dairy cows: a hypothesis. Metabolism. 42 358-64 (1993).
- 97.-Ramírez A.C.I. Utilización y adaptación metabólica a la suplementación con proteínas de la dieta en la mujer lactante con nutrición subóptima. Universidad Iberoamericana.México, 1998.
- 98.-Huxtable R.J., Physiological actions of taurine. Physiological reviews 72 101-63 (1992).

**Anexo 1**  
**Reactivos para la extracción de ARN total**

- |  |          |
|--|----------|
| <b>1.- Agua-DEPC al 0.1 %</b>  |          |
| Dietil pirocarbonato   | 3mL      |
| Agua desionizada   | 3000mL   |
| <b>Agitación 4 horas , condiciones del autoclave: 15min a 15 lbs/ pulg<sup>2</sup></b> |          |
| <b>2.- Citrato de sodio 0.75M pH 7.0</b>   |          |
| Citrato de sodio   | 22.05g   |
| Agua-DEPC c.b.p  | 100.0mL  |
| Antes de aforar se ajusta el pH con HCl 1N   |          |
| <b>3.- Sarcosil al 10%</b>   |          |
| Sarcosil   | 10.0g    |
| Agua-DEPC c.b.p  | 100.0mL  |
| <b>4.- Solución desnaturalizante</b>   |          |
| Tiocianato de guanidina  | 47.35 g. |
| Citrato de sodio 0.75M pH 7.0  | 3.33mL   |
| Sarcosil al 10%  | 5.0 mL   |
| Agua-DEPC c.b.p.   | 100.0mL  |
| <b>5.- Solución desnaturalizante con <math>\beta</math>-mercaptoetanol</b>             |          |
| Solución desnaturalizante  | 50.0mL   |
| $\beta$ -mercaptoetanol  | 0.350mL  |
| <b>6.- Acetato de sodio 2M pH 4</b>  |          |
| Acetato de sodio anhidro   | 16.42g   |
| Ácido acético glacial  | 35.0mL   |
| Agua-DEPC c.b.p  | 100mL    |
| Antes de aforar se ajusta el pH con ácido acético glacial                              |          |
| <b>7.- Acetato de sodio 3M pH6.0</b>   |          |
| Acetato de sodio   | 102.06g  |
| Agua-DEPC c.b.p  | 250mL    |
| Antes de aforar se ajusta el pH con ácido acético                                      |          |
| <b>8.- Agua saturada con fenol (fenol acuoso)</b>                                      |          |
| Fenol  | 100g     |
| Agua-DEPC  | 100mL    |
| <b>9.- Tris base 50mM</b>  |          |
| Tris base  | 6.05g    |
| Agua-DEPC c.b.p  | 1000mL   |
| <b>10.- Tris-HCl 100mM pH8.0</b>   |          |
| Tris-HCl   | 15.76g   |
| Agua-DEPC c.b.p  | 1000mL   |
| Antes de aforar se ajusta el pH con KOH  |          |



- |  |        |
|--|--------|
| 11.- Fenol amortiguado pH 8  |        |
| 8-hidroxiquinolina   | 0.5g   |
| Fenol  | 500g   |
| Tris base 50mM   | 1500mL |
| Tris-HCl 100mM pH8.0   | 1750mL |
| 12.- Fenol amortiguado pH 8.0/ cloroformo/ alcohol isoamilico (25: 24:1) |        |
| 13.- Cloroformo/ alcohol isoamilico 49:1 (vol/vol)                       |        |
| 14.- Isopropanol al 100%   |        |
| 15.- Etanol al 75%   |        |
| Etanol absoluto  | 75mL   |
| Agua-DEPC  | 25mL   |
| 16.-Etanol al 70%  |        |
| Etanol absoluto  | 70mL   |
| Agua-DEPC  | 30mL   |

#### Anexo 2

#### Reactivos para la Ultrapurificación del ARN con DNAsa.

- |   |         |
|---|---------|
| 1.- Etanol al 75%   |         |
| Etanol absoluto   | 75mL    |
| Agua-DEPC   | 25mL    |
| 2.- Etanol al 100% etanol absoluto  |         |
| 3.- Acetato de sodio 3M pH 5.3  |         |
| 4.- Sulfato de magnesio 1M  |         |
| 5.- Amortiguador para DNAsa 5X  |         |
| Acetato de sodio 3M pH 5.3  | 1.666mL |
| Sulfato de magnesio 1M  | 0.25mL  |
| Agua-DEPC   | 10mL    |
| Antes de aforar ajustar el pH con ácido acético   |         |
| 6.- DNAsa I 2unidades/ $\mu$ L (Desoxiribonucleasa I) digiere ADN de cadena sencilla y doble con el fin de que el ARN quede libre de contaminantes como son el ADN y proteínas unidas al ADN. (Gibco BRL) |         |
| 7.- Hidróxido de sodio 2N   |         |
| Hidroxido de sodio  | 4g      |
| Agua-DEPC   | 50mL    |

**8.-Fenol saturado pH 8**

Fenol	10g
8-hidroxiquinoleina	0.01g
Agua-DEPC	20mL
Ajustar el pH con NaOH 2N en agua-DEPC	

**9.- Cloroformo:Alcohol isoamilico (24:1)**

**Anexo 3**

**Reactivos para la extracción de ARN total con trizol**

1.-Trizol LS Reagent Ultrapure. GIBCO BRL.

2.-Cloroformo

3.- Isopropanol al 100%

4.- Etanol al 75% en agua-DEPC

**Anexo 4**

**Reactivos para la cuantificación en el espectrofotómetro de ARN**

1.- EDTA 0.4M pH 8

EDTA	7.44g
Agua desionizada c.b.p	50mL

2.- Amortiguador TE pH 7.5 (Tris-EDTA)

Tris-HCl 10mM pH 7.5	
Tris-HCl	1.578g
EDTA 0.4M pH8	2.5mL
Agua desionizada	1000mL
Antes de aforar ajustar el pH con NaOH	

**Anexo 5**

**Reactivos para la electroforesis de ARN**

1.-EDTA 0.4M pH 8

EDTA	14.88g
Agua-DEPC c.b.p	100mL

2.-Amortiguador de corrimiento 10X

Mops 0.4M pH 7.0	87.32g
(3- [N-Morfolino ácido propano sulfónico] )	
Acetato de sodio 100mM	13.6g
EDTA 4M pH 8.0	2.5mL
gua-DEPC c.b.p	1000mL
Antes de aforar se ajusta el pH a 7.0	

3.-Amortiguador de corrimiento 1X	
Amortiguador de corrimiento 10X	30mL
Agua desionizada	270mL
4.- EDTA 0.5M pH8.0	
EDTA	1.861g
Agua desionizada c.b.p	10mL
5.-Amortiguador de carga	
EDTA 0.5M pH 8.0	200µL
azul de bromofenol al 0.25%	250mg
cianol xileno al 0.25%	250mg
glicerol al 50%	100mL
6.- Formaldehido al 36.7%	
7.- Formamida	
8.-Bromuro de etidio 2mg/mL	
Bromuro de etidio	100mg
Agua desionizada c.b.p	50mL

**Anexo 6**  
**Reactivos para RT-PCR**  
( transcripción reversa- reacción en cadena de la polimerasa)

**Transcripción reversa**

- 1.- Amortiguador de la transcriptasa reversa 5x  
(5X First Strand Buffer de GIBCO BRL)  
    Tris-HCl 250mM pH 8.3  
    Cloruro de potasio 375mM  
    Cloruro de magnesio 15mM

- 2.- Mezcla de dNTP (2'- deoxinucleosido 5'- trifosfato) de GIBCO BRL  
la mezcla contiene dATP, dCTP, dGTP, dTTP.

3.- Oligo dT

(Oligo (dT)(12-18) primer, GIBCO BRL)

Se usa como un primer para la síntesis de la primera cadena de ADN complementario con la transcriptasa reversa, lo que hace el primer es hibridizar a la cola poliA del ARN mensajero, se almacena en agua-DEPC.

- 4.- DTT 0.1M de GIBCO BRL

5.- Enzima Transcriptasa reversa

(Reverse Transcriptase, Moloney Murine Leukemia Virus M-MLV, GIBCO BRL)

Es una ADN polimerasa que sintetiza una cadena de ADN complementaria a partir de una cadena simple de ARN.

**Amortiguador de almacenamiento de la enzima:**

Tris-HCl 20mM , pH 7.5  
Na<sub>2</sub>EDTA 0.1mM  
DTT 1mM  
NaCl 0.1M  
Nonidet-P40 0.01% (v/v)  
Glicerol al 50% (v/v)

**6.- Inhibidor de Ribonucleasas.**

(RNase Inhibitor, cloned GIBCO,BRL)

Es un potente inhibidor no competitivo de ribonucleasas, que se utiliza en la transcripción reversa del ARN mensajero y es obtenido de una cepa recombinante de E.coli, el inhibidor se almacena en:

HEPES-KOH 20mM pH 7.6  
Cloruro de potasio 50mM  
DTT 8mM  
Glicerol al 50% (v/v)

**Reacción en cadena de la polimerasa**

**1.- Amortiguador de PCR 10X con 15mM de Cloruro de magnesio  
(10X PCR Buffer GIBCO BRL)**

Tris-HCl 200mM , pH 8.4  
Cloruro de potasio 500mM  
Cloruro de magnesio 50mM

**2.- Mezcla de dNTP (2'- deoxinucleosido 5'- trifosfato) de GIBCO BRL  
la mezcla contiene dATP, dCTP, dGTP, dTTP.**

**3.- Cadena sentido [ 10 µM]**

**4.- Cadena antisentido [ 10 µM]**

**5.- Enzima Taq ADN polimerasa  
(Taq DNA polymerase , GIBCO)**

Esta enzima aislada de *Thermus aquaticus* YT1, es un polipeptido simple con un peso molecular de 94 kDa, es una enzima estable al calor, capaz de sintetizar ADN a temperatura elevada a partir de un templete simple ADNc en presencia de oligonucleótidos (iniciadores).

**Amortiguador de almacenamiento de la enzima:**

Tris-HCl 20mM , pH 8.0  
EDTA 0.1mM  
DTT 1mM  
Glicerol al 50% (v/v)  
Estabilizadores

**Anexo 7**  
**Reactivos para electroforesis de ADN**

1.-Amortiguador TAE 50X	
Tris-base	60.5g
Acido acético glacial	14.27mL
Na <sub>2</sub> EDTA 2H <sub>2</sub> O	9.3g
c.b.p.	1000 mL
2.-Amortiguador TAE 1X	
Amortiguador TAE 50X	7mL
Agua desionizada	343mL
3.- Bromuro de etidio 2mg/mL	
Bromuro de etidio	100mg
Agua desionizada c.b.p	50mL
4.-Gel de Agarosa al 1.5%	
Agarosa	0.825g
Amortiguador TAE 50X	1.1mL
Agua desionizada	55mL
Bromuro de etidio	5µL
5.-EDTA 0.5M pH8.0	
EDTA	1.861g
Agua desionizada c.b.p	10mL
Antes de aforar ajustar el pH con NaOH	
6.-Amortiguador de carga	
EDTA 0.5M pH8.0	200µL
azul de bromofenol al 0.25%	250mg
cianol xileno al 0.25%	250mg
glicerol al 50%	100mL

Marcador de peso molecular, obtenido de  $\phi$ X174 RF DNA/HAE III Fragments de GIBCO BRL. El ADN de  $\phi$ X174 RF ha sido digerido con la enzima de restricción HAE III, el marcador presenta fragmentos de 72 a 1353 pares de bases, que pueden ser visualizados con bromuro de etidio.

También se utilizó una escalera de DNA de 100 pb en 100 pb hasta llegar a 1500 pb de BOEHRINGER MANNHEIM.