

**DISCURSO DE RECEPCIÓN  
DEL ACADÉMICO ELECTO ILMO. SR. DR.  
D. Juan Viña Ribes**

**DISCURSO DE CONTESTACIÓN  
DEL ACADÉMICO NUMERARIO ILMO. SR. DR.  
D. Rafael Carmena Rodríguez**

*Leídos el 13 de diciembre de 2012*  
VALENCIA

**DISCURSO DE RECEPCIÓN DEL ACADÉMICO ELECTO**

**Ilmo. Sr. D. Juan Viña Ribes**

*La glándula mamaria como modelo en investigación biomédica.*

EXCMO. SR. PRESIDENTE DE LA REAL ACADEMIA DE MEDICINA,  
EXCMOS. E ILMOS. SRS. ACADÉMICOS,  
ILMAS. SRAS. ACADÉMICAS,  
SEÑORAS Y SEÑORES:

Es para mí una gran responsabilidad y reto; además de una gran alegría, el pertenecer a la Academia que data su nacimiento en 1830 y que ha tenido a grandes figuras de la medicina de nuestra tierra como académicos. Por lo tanto, mis primeras palabras son de consideración y agradecimiento por haberme elegido para formar parte de esta institución. La plaza que voy a ocupar ha tenido como directos predecesores al Dr. Andrés García Martínez que realizó su trabajo de investigación en la Facultad de Medicina en los Laboratorios de Microbiología; y al Dr. Jesús Calderón Gómez que ejerció mayoritariamente su labor en Castellón. Ambos doctores ejercieron su labor científica en tiempos difíciles para la investigación biomédica pero supieron esforzarse a pesar de los

escasos medios disponibles. **También, quiero expresar mi agradecimiento a los Académicos que presentaron mi candidatura, los profesores Rafael Carmena, Esteban Morcillo y Luis Franco.** Permítanme antes de empezar la lectura de mi discurso, que les comente la lista de consejos que han guiado mi vida científica y que he intentado transmitir a mis colaboradores y alumnos. Entre estos consejos están la importancia de elegir un buen maestro cuando uno comienza la carrera científica (Krebs 1967;1981), formularse preguntas que valgan la pena contestarse utilizando la tecnología más puntera (Bernard 1865; Krebs, 1979), que el método científico es una potenciación del sentido común, que la colaboración científica es un pilar básico de la investigación biomédica moderna (Medawar, 1979,1986) y que nuestra habilidad para solucionar problemas es lo más importante que nos ofrece la ciencia (Brenner 2012). Por último, es bueno tener presente los consejos de Richard Feynman y James Watson de ser audaz, correr riesgos, ser apasionado e intentar evitar la gente aburrida y poco estimulante (Goldstein 2010). La pasión es el gran motor del conocimiento como lo expresó David Hume de forma sucinta “la razón es, y será siempre, esclava de la pasión”

También es importante destacar que desde el punto de vista práctico uno de los problemas que se plantean a los investigadores es la elección del tema, lo que implica la elección del modelo correcto como veremos más adelante. Hans A. Krebs (1979) en una de sus conferencias titulada “On asking the right question in biological research” señaló que el fin de la investigación no es obtener más y más datos, sino obtener datos de valor estratégico, es decir, que aclaren nuevas ideas o que permitan relacionar conocimientos previamente no relacionados (Krebs 1979). De un forma más general, pero en términos similares, se expresó François Jacob (1970) en su libro titulado “La Lógica de lo viviente”, en donde expone que un época o una cultura se caracteriza menos por la extensión de los conocimientos que adquiere que por las preguntas que se plantea. Todo esto, nos lleva a destacar la importancia de la selección de la información científica, ya que la moderna tecnología permite acceder a gran cantidad de publicaciones. Lo importante es seleccionar lo interesante para el desarrollo de nuestros objetivos y su asimilación; ya que poseer la información no es equivalente a conocerla. Además, es importante valorar que el exceso de

conocimiento puede frenar la imaginación; por lo tanto lo aconsejable es leer, pensar y hacer. Los innovadores o rebeldes con éxito son la gente convencional del futuro (Brenner 2006).

### **Importancia de los modelos experimentales: ¿Por qué la glándula mamaria?**

Para estudiar preguntas biológicas relevantes lo importante es elegir bien el modelo experimental y tener presente el principio de August Krogh que indica “que para muchos problemas, hay un animal o tejido que es el más conveniente para contestar las preguntas formuladas” (Krogh 1929, Krebs 1975, Editorial 2003). La colaboración con diferentes grupos del Hospital Clínico Universitario de Valencia, nos ha llevado a unir los esfuerzos entre los estudios básicos y clínicos; y formar una red de colaboración para potenciar la traslación de los conocimientos desde los laboratorios a la clínica y viceversa. Por lo tanto, es interesante entender que la medicina traslacional es un viaje de ida y vuelta; es decir un ciclo completo. Esto es y debe ser así, porque respuestas no esperadas de los pacientes a nuevos tratamientos, junto con ensayos clínicos que han fallado deben ser considerados como trabajos, que estimulan nuevas hipótesis y nuevos experimentos en los laboratorios. Este es uno de los grandes retos de la investigación biomédica actual y que resumió de forma brillante Sydney Brenner en el Congreso de la American Association for Cancer Research en San Diego, California en el año 2008: “No necesitamos buscar modelos experimentales en medicina traslacional, los humanos somos el modelo” (Ledford 2008; Brenner 2012). Este comentario es de gran interés ya que lo enfatiza un investigador que como todos ustedes saben ha sido uno de los mejores científicos de la segunda mitad del siglo XX, y que para contestar diferentes preguntas usó diversos modelos, entre los que destaca el nematodo *C. elegans*, la mosca *Drosophila melanogaster*, el fugu que es el pez globo y los seres humanos como sujetos de investigación biológica para descifrar los mecanismos biológicos de control de diferentes procesos fisiológicos. Todo esto pone de manifiesto la importancia de usar modelos muy variados para

aprender de la diversidad de la vida, lo que facilita la investigación biomédica. Por último, es importante destacar la conexión muy íntima existente entre la investigación básica y su traslación a la investigación clínica; ya que sin la primera no se podría avanzar. Por ejemplo, sería imposible crear tratamientos contra dianas moleculares sin entender primero las características bioquímicas de las diferentes vías de señalización en condiciones normales y sus alteraciones en los procesos patológicos.

Dos líneas básicas han interesado a mi equipo durante varias décadas, y han encontrado en la glándula mamaria el modelo más correcto, una es el control de la utilización de substratos circulantes en sangre y la captación de éstos por los tejidos; y otro es la muerte celular programada y remodelación tisular de la glándula mamaria tras la lactancia, periodo que se conoce como destete o involución. La glándula mamaria está compuesta de células epiteliales y mesenquimales, que incluye adipocitos, fibroblastos, vasos sanguíneos y células del sistema inmunitario. El epitelio mamario está compuesto de diferentes linajes que incluyen las células mioepiteliales y las células lumbinales, que se diferencian en células ductales y alveolares que son productoras de leche. En la actualidad, se sabe que la glándula contiene diferentes tipos de células madre o troncales unipotenciales de vida media larga con capacidad de producir células mioepiteliales o lumbinales (Van Keymeulen 2011).

Durante el desarrollo embrionario, la glándula mamaria aparece en la epidermis ventral y de forma progresiva invade el mesenquima subyacente que es la grasa de la glándula. Durante la pubertad, la glándula mamaria se expande y forma una estructura tubular altamente ramificada y en el ciclo embarazo/lactancia, todavía se ramifica y se expande más y produce leche. Las necesidades metabólicas de este tejido durante la lactancia, implica una redistribución de los substratos circulantes en sangre hacia la glándula mamaria y expresar distintos sistemas de transporte de nutrientes para asegurar las síntesis de proteínas, lípidos, lactosa y otros compuestos que serán secretados a la leche. La proliferación y diferenciación que sufre la glándula durante el ciclo gestación/lactancia cesa al acabar la lactancia y comienza la

involución. Este fenómeno fisiológico se produce en dos fases; la primera fase es reversible, y se caracteriza por la muerte de las células epiteliales secretoras que forman parte de los acini. Hasta el comienzo de la última década, la muerte celular programada era sinónimo de apoptosis; sin embargo, en la actualidad sabemos que existen otros procesos diferentes como veremos más adelante (Watson & Kreuzaler, 2011; Kreuzaler & Watson, 2012). La segunda fase es irreversible y está mediada por una activación de las proteasas que degradan la membrana basal y la matriz extracelular, produciéndose una extensa remodelación tisular. Posteriormente, se induce la diferenciación de los adipocitos de modo que la glándula mamaria queda preparada para un nuevo ciclo embarazo/lactancia (O'Brien y cols 2012).

Se sabe que el embarazo, se asocia epidemiológicamente a una reducción del riesgo de desarrollar cáncer de mama a lo largo de la vida. Sin embargo, en los primeros cinco años tras la gestación, el riesgo de tener un cáncer de mama aumenta y este riesgo transitorio es todavía mayor en mujeres cuyo primer embarazo se produce a partir de los 35 años. Por lo tanto, nos encontramos ante una paradoja científica, ya que la gestación puede aumentar y disminuir el riesgo de cáncer de mama a la vez, dado que el efecto inicial es de aumento del riesgo y el global es de protección como hemos comentado. En la actualidad, los datos de laboratorio realizados en animales sugieren que el riesgo de cáncer tras el embarazo se debe a un microambiente pro-inflamatorio controlado por diferentes vías de señalización que se da en la glándula durante la involución (Lyons y cols 2011; Hughes y cols, 2012), lo que aumenta el potencial carcinogénico de este tejido. Por lo tanto, el conocimiento molecular de los mecanismos que regulan la involución es relevante para entender mejor la etiología del cáncer de mama asociado a la gestación. Además, el hecho de que la glándula mamaria contenga diferentes tipos de células madre de vida media larga es una gran ayuda para estudiar el origen del cáncer de mama.

Todo lo expuesto demuestra que la glándula mamaria es un un gran modelo para estudiar el abastecimiento de nutrientes a un tejido y los mecanismos de control de la captación de los mismos; ya que durante la lactancia las necesidades son máximas, lo que hace que el flujo metabólico sea

muy elevado. Por otro lado, cuando cesa la lactancia, todos los procesos metabólicos necesarios para la producción de leche disminuyen de forma drástica y entonces tenemos un buen modelo para estudiar los mecanismos de inhibición de estos procesos. Además, al cesar la lactancia comienza la muerte celular programada y la remodelación tisular, lo que hace de este tejido un modelo excelente para estudiar la apoptosis, la autofagia y otros procesos involucrados en la eliminación de las células epiteliales productoras de leche. También es un gran modelo para estudiar la remodelación que implica proliferación celular, sobre todo la formación de nuevos adipocitos.

### **Cambios fisiológicos durante la lactancia y redistribución de nutrientes a la glándula mamaria: estudio especial de los aminoácidos y del glutatión (GSH).**

La lactancia es el último eslabón en el ciclo reproductor y una de las funciones fisiológicas más antigua de los mamíferos, cuya aparición es previa a la gestación placentaria y empezó al final del periodo triásico hace 200 millones de años a partir de las glándulas de la piel que tenían funciones de protección. En la actualidad existen evidencias moleculares que indican que la glándula mamaria y la producción de leche evolucionaron como parte del sistema inmune innato. Por lo tanto, la función nutricional de la glándula es posterior a su función protectora (Vordach y cols 2006). Además, la diversidad de mamíferos y las grandes variaciones en sus diferentes estrategias reproductivas y sobre todo en la lactancia, pone de manifiesto la existencia de ramas filogenéticas evolutivas divergentes (Lefevre y cols 2010).

En la actualidad existen más de 4000 especies de mamíferos (McClellan y cols 2008), que durante la lactancia sufren cambios fisiológicos necesarios para que la madre produzca la leche necesaria para los neonatos. En los animales de experimentación más habituales, así como en los humanos, se pueden observar algunos de las siguientes adaptaciones fisiológicas en la madre: la hiperfagia, el aumento del gasto cardíaco y del flujo sanguíneo hacia la glándula mamaria, la hipertrofia del hígado y del intestino y el correcto abastecimiento de

nutrientes a la glándula (Williamson 1980; 1986). La “hipótesis de energía materna” propone que todos los mamíferos alcanzan su tamaño cerebral máximo y un desarrollo cerebral óptimo, siendo este proporcional a los recursos metabólicos disponibles hacia la madre durante el embarazo y la lactancia (Martin, 1996).

La demanda de nutrientes por la glándula se satisface con el incremento en la ingesta de alimentos, por una redistribución específica de los substratos hacia la glándula que junto con un aumento del flujo sanguíneo, hace que la disponibilidad neta sea muy elevada. Este concepto fisiológico de “dirección específica de los metabolitos en sangre” no implica que un metabolito sólo se dirija hacia un tejido, sino que un tejido en particular, en este caso, la glándula mamaria, predomina en la captación de los substratos del torrente circulatorio (Williamson 1973) Por ejemplo, estudios clásicos demostraron que los triacilglicéridos circulantes durante la lactancia “se dirigen” hacia la glándula mamaria; ya que la expresión y la actividad de la lipoproteinlipasa en este tejido están aumentadas; mientras que en el tejido adiposo están disminuidas (Williamson 1986). La menor expresión del PPAR $\alpha$  y de sus coactivadores en el músculo y en el hígado explican la menor expresión de los genes involucrados en la oxidación de los ácidos grasos en estos tejidos durante la lactancia; que junto con una disminución de la termogénesis tienen como objetivo conservar energía y ácidos grasos para la producción de leche (Gutgessell y cols 2009).

En este contexto de redistribución de nutrientes, nuestros estudios se centraron en esclarecer los mecanismos que se desarrollan para cubrir las necesidades de aminoácidos: entre ellos podemos decir que junto con la hiperfagia hemos demostrado que existe un mecanismo ahorrador de nitrógeno durante la lactancia (Barber y cols 1990) y un mecanismo de redistribución hacia la glándula; ya que el aumento del cociente prolactina /progesterona produce una menor actividad del sistema A de transporte de aminoácidos en el hígado y un aumento de su actividad en la glándula mamaria (García de la Asunción y cols. 1994; Viña y cols 2001).

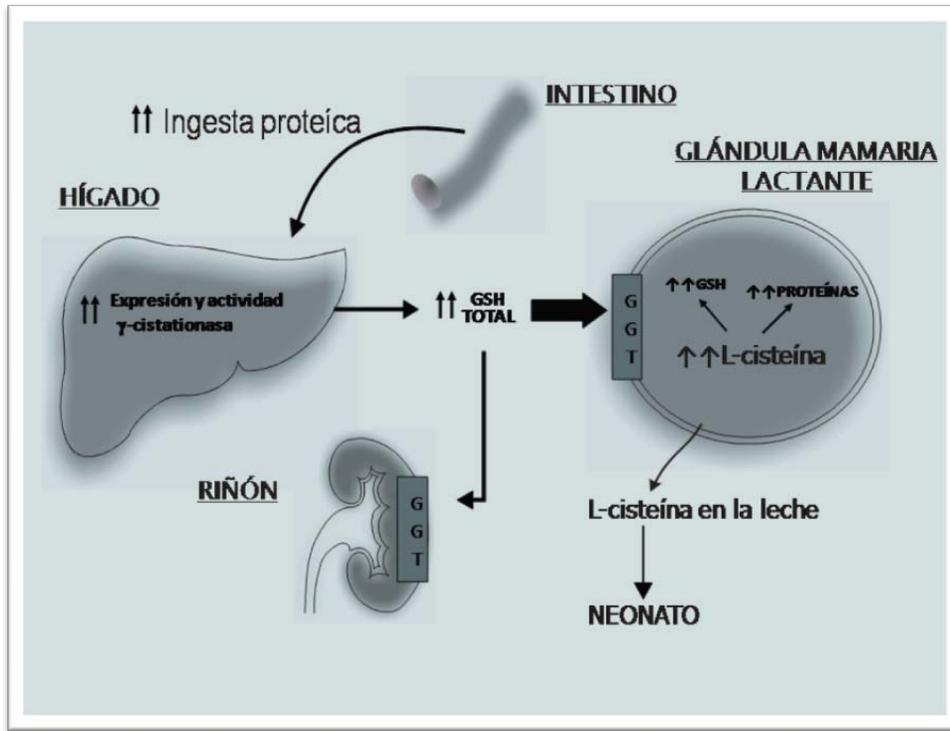
Una vez demostrado que la glándula tiene una mayor disponibilidad neta de aminoácidos durante la lactancia, el siguiente problema que nos planteamos fue estudiar el control de la captación de aminoácidos. La regulación puede ser a largo plazo, lo que implica un control transcripcional de los sistemas de transporte, y a corto plazo que supone una modificación de la actividad sin cambio en la expresión génica. Con respecto a la regulación a largo plazo, demostramos el papel del estado nutricional, de la prolactina que ejerce su acción a través de la fosforilación del factor de transcripción STAT5a/b, de la insulina, y de las gonadotropinas (Viña y cols 1981;1983;1985). Los estudios que realizamos sobre los transportadores Na<sup>+</sup>-dependientes de L- glutamato (EAAT1 y EAAT2) demostraron que se expresan en la glándula durante la lactancia pero no así el transportador EAAT3, y que el transportador EAAT1 está muy regulado; mientras que la expresión del EAAT2 es constitutivo. El ayuno de 24 h producía una disminución de la expresión y de la cantidad del transportador EAAT1 que se revertía tras tres horas de realimentación. El destete de 24 h también producía una disminución de la expresión y de la cantidad del transportador, que se revertía tras la succión y demostramos que no dependía de los cambios de prolactina en sangre (Martínez-López y cols 1998).

Con respecto al control a corto plazo, comprobamos el papel de los cuerpos cetónicos (Viña y cols 1983) y del ciclo del enlace  $\gamma$ -glutamilo. Este ciclo es el responsable de la síntesis y degradación del tripéptido  $\gamma$ -glutamil-cisteinil-glicina, conocido con el nombre de glutatión (GSH) (Meister & Anderson, 1983). La primera reacción de la síntesis de GSH está catalizada por la  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetasa y se forma  $\gamma$ -glutamilcisteína a partir de L-glutamato y L-cisteína. Posteriormente este compuesto junto con la glicina y mediante la GSH-sintetasa forma GSH. La primera enzima se regula por retroalimentación negativa por el GSH, por la disponibilidad de L-cisteína y por fosforilación/desfosforilación (Sun y cols 1996).

La siguiente reacción del ciclo es extracelular ya que está catalizada por la  $\gamma$ -glutamyltranspeptidasa (GGT), que forma parte de la membrana celular, con el sitio activo dirigido a la sangre. Los substratos de la GGT son el GSH,

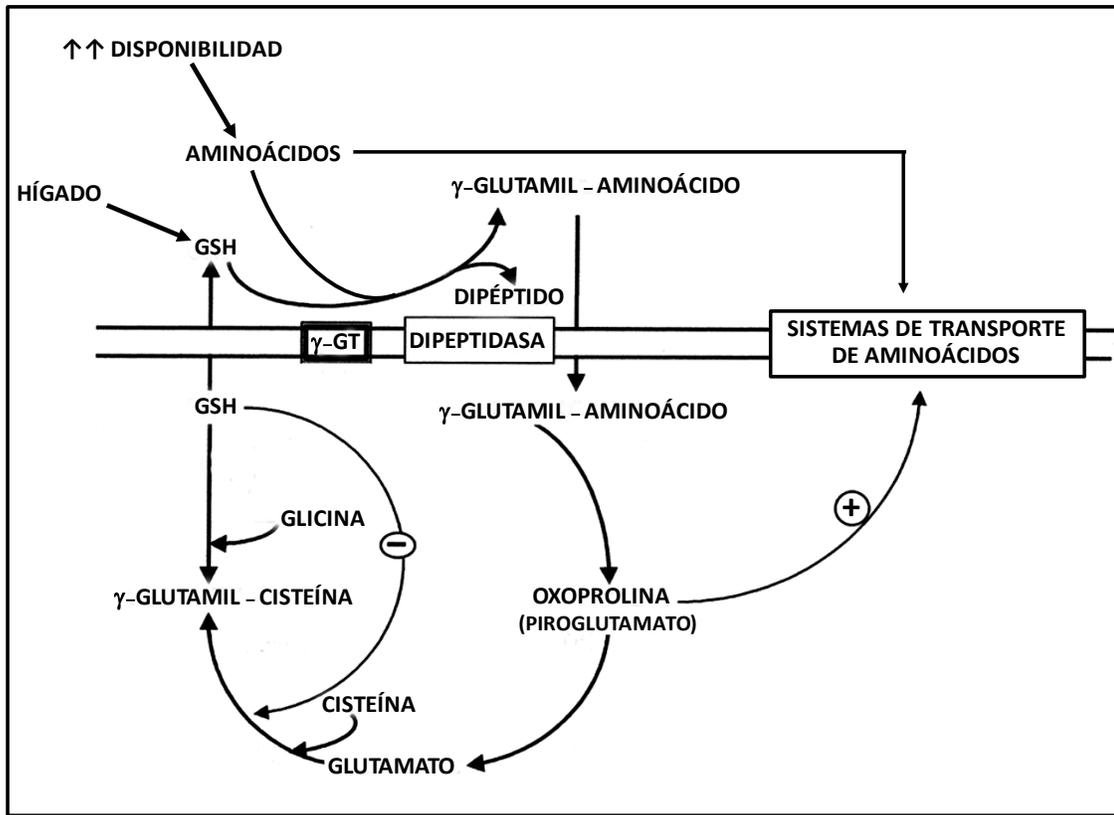
procedente del interior de la célula o por el transportado por la sangre, y los aminoácidos circulantes. Los  $\alpha$ -glutamil-aminoácidos que se forman entran al interior de la célula por un sistema de transporte distinto al de los aminoácidos libres. Intracelularmente, los  $\alpha$ -glutamil-aminoácidos son sustratos de la  $\alpha$ -glutamil-ciclotransferasa, que los convierte en oxoprolina y en el aminoácido libre correspondiente. La oxoprolina por medio de la oxoprolinasa da L-glutamato y cierra el ciclo metabólico, siendo esta última reacción un paso limitante del ciclo.

Como hemos comentado con anterioridad la disponibilidad de L-cisteína es fundamental para el recambio normal de este ciclo. Nuestros estudios han demostrado que la  $\alpha$ -cistationasa no se expresa en la glándula mamaria, luego no se puede sintetizar L-cisteína a partir de L-metionina. Por lo tanto, las necesidades de L-cisteína dependen del abastecimiento que llegue por la sangre. La diferencia arteriovenosa de GSH, es mucho mayor que las de L-cisteína y L-cistina que son mínimas, lo que hace que el GSH sanguíneo sea el mayor proveedor de L-cisteína. En estudios realizados “in vivo” en un modelo murino, hemos demostrado que existe un flujo intertisular de GSH desde el hígado que tiene baja actividad de la GGT, a la glándula mamaria que tiene alta actividad GGT, donde los aminoácidos del GSH son captados. La producción y liberación total de este tripéptido por el hígado durante la lactancia esta aumentada; ya que la actividad y la expresión de las enzimas de la trans-sulfuración está incrementada fundamentalmente por la mayor ingesta de proteínas y no por la acción de la prolactina (Barber y cols 1999). Sin embargo, la L-cisteína es un aminoácido abundante en la leche, lo que pone de manifiesto la importancia que tiene que el GSH que procede del hígado se dirija a la glándula. Esto es un ejemplo del flujo intertisular de sustratos y tiene gran relevancia para el neonato, ya que en los primeros días de vida, la  $\alpha$ -cistationasa en el hígado neonatal no está expresada completamente, lo que implica que en este periodo, la L-cisteína es considerada como un aminoácido esencial y debe ser aportado por la leche para cubrir sus necesidades.



**FIGURA 1:** Flujo intertisular de glutatión y disponibilidad de L-cisteína durante la lactancia. Mecanismo de disponibilidad de L-cisteína por el neonato.

Nuestros estudios han demostrado dos funciones fisiológicas importantes de este ciclo y no descritas con anterioridad. Una de ellas es el control que hace un intermediario del ciclo sobre los sistemas de transporte de aminoácidos, y la otra es el papel del GSH en el control de la expresión génica. Pasemos a continuación a explicarlas de forma sucinta. El recambio del ciclo aumenta con el incremento de la disponibilidad de aminoácidos; y el incremento de la oxoprolina, también conocida como piroglutamato, actúa como activador de los sistemas  $\text{Na}^+$ -dependiente de transporte de aminoácidos tanto en la glándula mamaria en el pico de la lactancia como en otros modelos experimentales (Viña y cols 1989; Lee y cols 1996; Hawkins y cols 2006). Por lo tanto, el ciclo actúa como sistema de regulación positiva; ya que sirve para activar al máximo los sistemas de transporte cuando se incrementa la disponibilidad de aminoácidos y podemos considerar el piroglutamato como un mediador intracelular de este proceso.



**FIGURA 2:** Ciclo del enlace  $\gamma$ -glutamilo: Papel del piroglutamato como regulador de la actividad de los sistemas de transporte de aminoácidos  $\text{Na}^+$ -dependientes.

La otra función está basada en la importancia de mantener la concentración de GSH en la glándula mamaria para asegurar la expresión génica durante la lactancia. Mediante la técnica de “microarray/chips de expresión” estudiamos la expresión de más de 9000 genes y comprobamos un aumento muy significativo de la expresión de genes pro-inflamatorios y de respuesta de fase aguda; y una disminución de los genes que codifican las enzimas de diferentes vías metabólicas, entre ellas la lipogénesis “de novo” durante la involución de la glándula. Al tratar los animales en el pico de la lactancia con un inhibidor de la síntesis de GSH, se mimetizaron los mismos cambios en la expresión génica que los encontrados en las primeras horas de destete; lo que pone de manifiesto la importancia de mantener los niveles de GSH para el normal funcionamiento de la glándula durante la lactancia (Zaragozá y cols 2005). También es muy interesante destacar que en nuestro laboratorio hemos demostrado un nuevo papel del GSH en la regulación de la expresión génica, que supone cambios en la cromatina que van de una forma

represiva a una forma de estructura abierta que permite la accesibilidad de factores de transcripción como el STAT3 cuando la concentración de GSH está disminuida (Torres y cols 2009).

Los aminoácidos captados por la glándula mamaria tienen distintos destinos metabólicos entre los que destacan la síntesis de proteínas estructurales y de la leche, la utilización de ciertos aminoácidos como precursores lipídicos y la liberación como aminoácidos libres a la leche. La concentración de proteínas de la leche es de 0,9 % y diferentes estudios han demostrado que el estado de malnutrición de la madre; así como la suplementación con proteínas no tiene un efecto significativo sobre la concentración proteica en leche (Lonnerdal 1986). Sin embargo, todos estos datos hay que interpretarlos con precaución si no se conoce simultáneamente el volumen de la leche producida, la concentración de proteínas en la leche y la ingesta total de nutrientes. Estudios realizados en pequeñas villas de Nigeria donde las madres tenían una dieta con un bajo nivel de ingesta de proteínas, muy por debajo del aconsejado, la suplementación con 100 gr de proteínas producía un aumento del volumen de leche sin cambio en la concentración de proteínas (Prentice y cols 1983); por lo tanto esto supone un aumento neto de la disponibilidad de proteínas.

La leche posee un alto valor de nitrógeno no proteico que oscila ente 20-25% y es de gran importancia para diseñar fórmulas artificiales, porque se ha sugerido desde hace años que puede ser un factor limitante del crecimiento de los niños (Snyderman y cols 1962). Los aminoácidos libres se encuentran en la leche materna a diferentes concentraciones y su concentración depende mucho de la ingesta de alimentos. En un estudio que realizamos en mujeres de Valencia en la cuarta semana de lactancia, la concentración de aminoácidos libres en la leche difería significativamente si la leche estudiada procedía de las madres tras el ayuno nocturno o tras un desayuno controlado. El ayuno nocturno produce una disminución significativa de todos los aminoácidos libres de la leche estudiada, excepto L-aspártico, L-asparragina, L-glutamina, L-glutamato y L-tirosina si se compara con la leche procedente de las madres que habían tomado el desayuno (Viña y cols 1987). Esto implica la importancia de

la ingesta de alimentos por parte de la madre media hora antes de dar de mamar para asegurar una correcta concentración de aminoácidos esenciales libres en la leche.

### **La glándula mamaria durante la involución tras la lactancia: Importancia de la sinergia entre diferentes vías de señalización**

Una vez revisado el estricto control que tiene el metabolismo durante la lactancia pasemos a comentar lo que ocurre en la glándula durante el destete y las implicaciones médicas que tiene el conocimiento molecular de este proceso. A las pocas horas de comenzar el destete, el flujo sanguíneo hacia la glándula disminuye así como la expresión y la actividad de los transportadores de nutrientes, y la síntesis de proteínas, lípidos y lactosa cae a valores muy bajos. Con el cese de la actividad metabólica tan elevada que ha tenido la glándula durante la lactancia empieza el proceso de la involución controlado por diferentes vías de señalización. Las vías que juegan un papel importante en la involución son la LIF/SAT3, NF- $\kappa$ B, TGF  $\beta$  PI3K/AKT y las de los retinoides, que actúan de forma sinérgica para controlar los diferentes procesos que acontecen en las dos fases de la involución. (Watson & Kreuzaler, 2011). La primera fase es reversible, depende de p53, está regulada por factores locales y requiere la muerte de las células epiteliales estructuradas en acini para tener más tejido adiposo. En la actualidad, además de la apoptosis existen varias alternativas para explicar la muerte celular programada tales como la necroptosis, la mediada por lisosomas, la autofagia y la entosis, que coexisten con la apoptosis o que pueden llegar a ser la vía preferente de muerte celular programada en diversos tejidos. La reversibilidad de esta fase varía mucho entre los diferentes mamíferos; en los modelos murinos dura 48 horas, mientras que en un cierto tipo de focas la lactancia puede volver a reiniciarse tras un periodo de tres semanas, porque la madre esté consiguiendo comida fuera para poder mantener la lactancia. Esto pone de manifiesto, que durante la evolución, la expresión génica de la glándula mamaria durante la lactancia está muy influenciada por el medio ambiente donde tiene lugar la misma.

La segunda fase es irreversible, es independiente del p53, está mediada por cambios en la concentración de diferentes hormonas circulantes, implica un influjo de macrófagos y de células inmunes necesarias para eliminar las células muertas, la ruptura de la matriz extracelular mediada por las metaloproteinasas (MMPs), remodelado de los vasos sanguíneos y rediferenciación de los adipocitos que sustituirán la estructura ductal y alveolar. Es interesante destacar, que las células que sobrevivieron la primera fase de la involución, entran en un programa de muerte celular programada conocido como anoikis, que además de apoptosis incluye autofagia e implica una separación de la matriz extracelular para lo cual es imprescindible la expresión aumentada de la MMPs antes comentada. Las células epiteliales de la glándula mamaria cuando pierden su enganche a la matriz extracelular sufren una deficiencia de ATP debido a una pérdida del transporte de glucosa. La sobreexpresión de ERBB2, que se expresa entre el 25 al 30 % de los cánceres de mama, rescata este déficit restaurando la captación de glucosa a través de la estabilización del EGFR y a una activación de la fosfatidilinositol-3-OH kinasa (Schafer y cols 2009). Por lo tanto, las células cancerosas escapan la anoikis o expresado de otra forma, el proceso de anoikis previene el cáncer tras lactancia. Todos estos estudios comentados han llevado al renacimiento de un área de investigación olvidada en los últimos años que es el metabolismo de las células cancerígenas. A continuación nos centraremos en las vías de los retinoides y del NF- $\kappa$ B, donde hemos trabajado en los últimos años.

## **Papel de los retinoides**

Los retinoides constituyen un grupo de moléculas químicamente relacionadas con la vitamina A que incluye compuestos naturales con actividad vitamínica y análogos sintéticos con o sin actividad vitamínica. Los retinoides están implicados en importantes funciones fisiológicas, destacando su papel en el desarrollo embriológico, la diferenciación y proliferación celular. Estos compuestos ejercen su función uniéndose a receptores específicos y modulando la expresión génica; ya que actúan como factores de transcripción activados

por ligandos específicos. Existen dos clases de receptores nucleares de retinoides, los receptores para el ácido retinoico (RAR) y los receptores X (RXR) que forman heterodímeros entre ellos. Tanto en humanos como en los diferentes modelos murinos, se ha caracterizado tres tipos de receptores RAR que se han designado como RAR $\alpha$ , RAR $\beta$  y RAR $\gamma$  y tres tipos para RXR (RXR $\alpha$ , RXR $\beta$  y RXR $\gamma$ ). En ambas subfamilias de receptores se ha caracterizado un dominio de unión al ADN y un dominio de unión específico al ligando, unidos entre sí por una región que sirve también como señal de traslocación nuclear. Por lo tanto, el ácido retinoico, que se produce por la oxidación máxima del retinol, que es la vitamina A, media una de las vías de señalización más importantes en el mantenimiento, diferenciación y función de las células epiteliales de diferentes tejidos entre los que se encuentran la glándula mamaria (McKenna 2012).

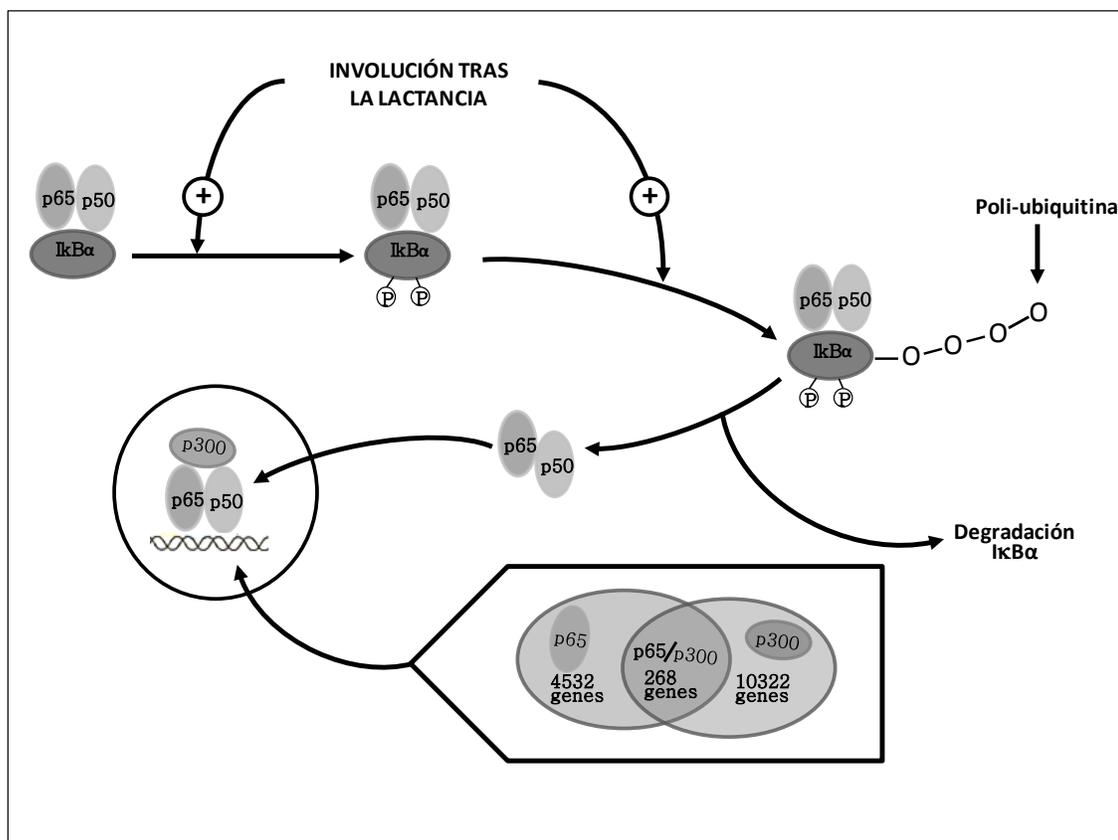
Dentro de esta vía de señalización, además de los receptores antes mencionados, existen proteínas citoplasmáticas que juegan un papel importante, la CRABPI y la CRABPII, que se unen al ácido retinoico y la CRBP que se una al retinol. Esta última, actúa como una chaperona de las enzimas que metabolizan el retinol a retinoico, mientras que la CRABPII y la CRABPI regulan el acceso del retinoico a los receptores nucleares, y el catabolismo del ácido retinoico respectivamente. Nuestros estudios han demostrado que la vía de señalización del ácido retinoico está muy activa durante la involución. Los niveles de proteínas CRABPI y la CRABPII, están muy aumentadas durante el destete si se compara con muestras de glándula mamaria en plena lactancia. En paralelo con estos resultados, demostramos que los receptores nucleares RAR $\alpha$ , RAR $\beta$  y RXR $\alpha$  estaban aumentados a las dos horas de comenzar el destete, mientras que el receptor RAR $\gamma$  aumenta a las 24 horas. Una vez aclarado que esta vía juega un papel en la involución, la pregunta que nos formulamos iba dirigida a comprobar la relación entre el receptor RAR $\alpha$  y las metaloproteinasas. El control de estas proteasas en la glándula mamaria se puede ejercer a través de tres niveles, de la transcripción del mRNA, la activación del zimógeno y a nivel de los inhibidores celulares específicos. Mediante la técnica de inmunoprecipitación de la cromatina demostramos que tras varios días de destete, el receptor RAR $\alpha$  se unía al promotor de la MMP-9

junto con el coactivador p300. Este resultado explicaría el aumento de los niveles de mRNA y de la proteína MMP-9. Junto a esto, también demostramos que existía un aumento de otras metaloproteínas (MMP-2 y MMP-3) y mediante zimografía con geles que contenían gelatina como sustratos de las MMPs, observamos un aumento de la actividad de las MMP-9 y MMP-2 (Zaragozá y cols 2007). Además, el inhibidor fisiológico de las MMPs durante la lactancia, TIMP-1 no era detectable a partir de las 24 horas del comienzo del destete, favoreciendo la activación de las MMPs. Todo esto concuerda con los resultados encontrados en ratones que sobreexpresan TIMP-1 que no tienen el fenotipo de la involución (Green & Lund, 2005). Estos resultados destacan la importancia de mantener un correcto cociente entre las actividades de las MMPs y de las TIMPs para conseguir una remodelación de la glándula; ya que una alteración de esta vía de señalización está asociada al cáncer de mama (Donato & Noy 2005).

### **El NF- $\kappa$ B como nodo de amplificación de señal durante el destete.**

El NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción importante en el control de la respuesta inmune e inflamatoria del organismo. La clásica forma del NF- $\kappa$ B es un heterodímero de las subunidades p50 y p65, que se retiene en el citoplasma por sus interacciones con las proteínas inhibitoras I $\kappa$ B, que en respuesta a un estímulo apropiado se fosforilan. Una vez fosforiladas se ubiquitinizan y se degradan en el proteasoma, lo que permite la entrada del NF- $\kappa$ B al núcleo donde actúa como un regulador de la expresión génica. En modelos murinos, la actividad de unión al ADN del NF- $\kappa$ B (p50/p65) en la glándula mamaria durante el embarazo está aumentada y disminuye con la lactancia; para aumentar en la involución (Brantley y cols 2000). La expresión del I $\kappa$ B, la subunidad inhibitora del NF- $\kappa$ B estaba aumentada durante el destete. Además, existe una degradación de los niveles de la proteína I $\kappa$ B dependiente del tiempo de involución, lo que sugiere un papel importante del NF- $\kappa$ B. Esto nos llevó a estudiar el papel de este factor de transcripción en el proceso de reestructuración de la glándula durante la involución.

En estudios “in vivo” mediante la técnica de ChIp-on-chip identificamos 4532 genes que tenían unida en la región promotora el ReIA(p65)-NF- $\kappa$ B (Torres y cols 2011). Entre todos estos genes, solamente 268 tenían unidos el complejo trans-activador p65/p300; y algunos de ellos codifican varias proteínas interesantes como la óxido nítrico sintasa y las calpaínas 1 y 2 que son proteasas dependientes de calcio.

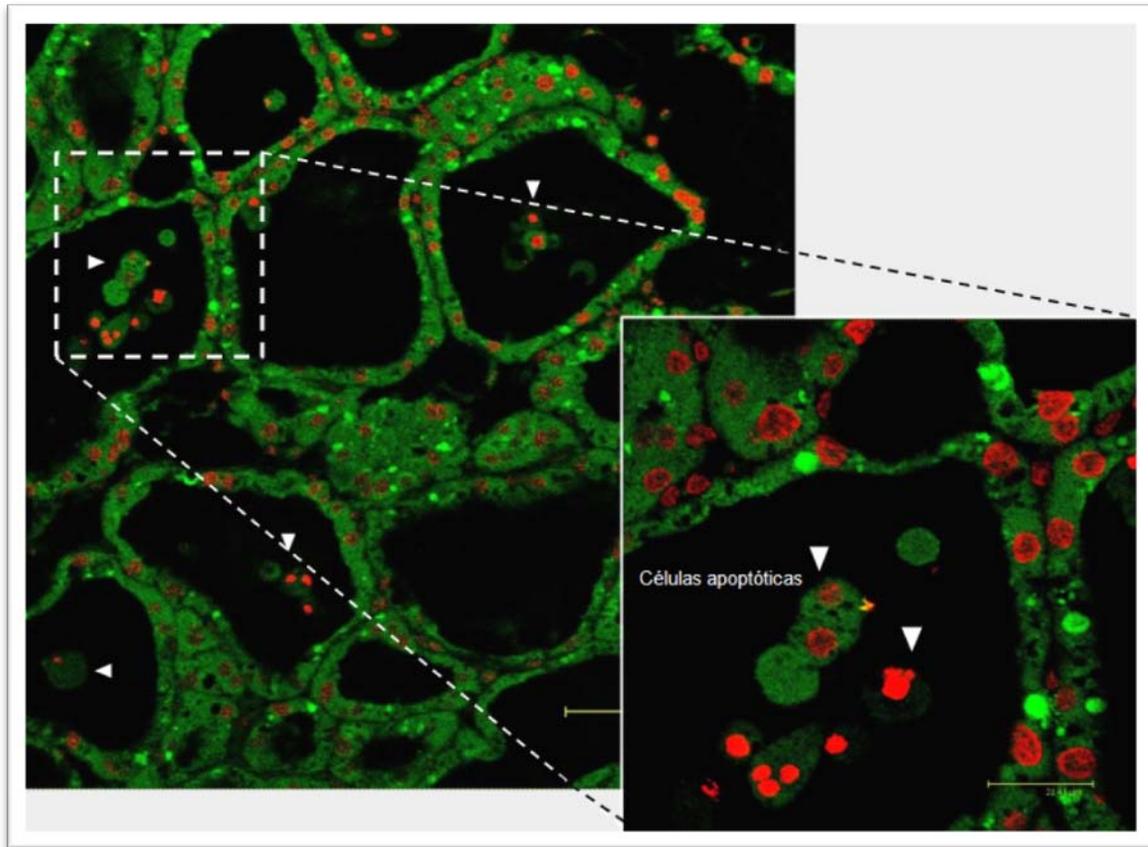


**FIGURA 3:** Activación y translocación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B tras el destete: Importancia en la regulación de la expresión génica.

Mediante la técnica de inmunoprecipitación de cromatina demostramos que el NF- $\kappa$ B se une al promotor de la óxido nítrico sintasa inducible, lo que produce un aumento en la producción de óxido nítrico (NO) y en la nitración de proteínas. Recientemente hemos demostrado que el NO en la glándula mamaria produce modificaciones post-traduccionales específicas, entre las que destaca la nitración de la catepsina D en la tirosina 168, lo que aumenta su actividad proteolítica. Para profundizar más en el papel del NO, demostramos

en ratones modificados genéticamente, que la ausencia de la óxido nítrico sintasa inducible, produce en la involución una menor concentración de NO, lo que conlleva a un retraso en la activación de las vías de señalización más importantes como la STAT3 y la NF- $\kappa$ B (Zaragozá y cols 2010) que produce un retraso en la remodelación tisular. Todo esto produce una alteración en la regulación de sus dianas transcripcionales como, Bcl-3 y la MMP-9 entre otras, y abre el camino para poder considerar la nitración proteica como parte de diferentes vías de de señalización en la remodelación tisular (Zaragozá y cols 2009).

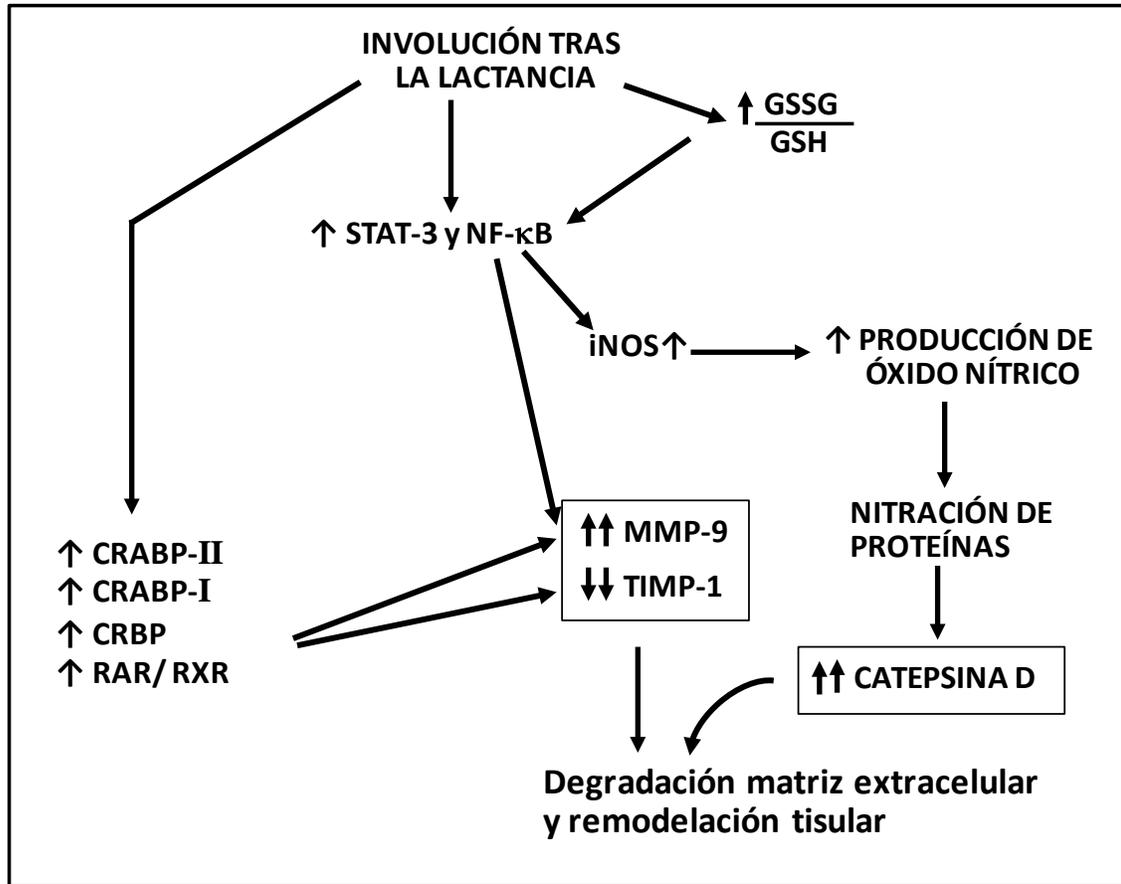
Como he comentado anteriormente, otros genes regulados por NF- $\kappa$ B cuya expresión se encuentra aumentada durante la involución son los que codifican para las calpaínas 1 y 2. En otros modelos experimentales, se ha visto que estas proteasas están implicadas en las vías mitocondrial y lisosomal de la apoptosis en el sistema nervioso. Simultáneamente, en el Mammary Gland Apoptosis and Development Laboratory del Departamento de Patología de la Universidad de Cambridge demostraron que los lisosomas juegan un papel muy importante en la primera fase de la involución y que es independiente de la actividad de las caspasas 3,6 y 7, pero requiere del factor de transcripción STAT3 que aumenta la expresión de las catepsinas B y L, mientras que frena la expresión de los inhibidores endógenos Spi2A (Kreuzaler y cols 2011). La reciente implicación de los lisosomas en la muerte celular programada nos llevó a estudiar estas proteasas en la involución. En nuestro laboratorio, hemos demostrado que las calpaínas se translocan tanto a las mitocondrias como a los lisosomas durante el destete. En las mitocondrias producen la liberación de factores proapoptóticos, mientras que en los lisosomas demostramos que las calpaínas podían degradar la subunidad  $b_2$  de la ATPasa v-tipo  $H^+$ , junto con la proteína de membrana LAMP2a lo que producía una liberación de catepsinas (Arnandis y cols 2012). Además, comprobamos que la muerte celular programada mediada por lisosomas empieza antes que la mediada por las mitocondrias en la restructuración de la glándula durante la involución. Todos estos resultados son interesantes porque ayudan a diseñar nuevas estrategias para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer donde la expresión y/o actividad de NF- $\kappa$ B, STAT3, calpaínas y catepsinas esté aumentada.



**FIGURA 4:** *Inmunofluorescencia de una sección histológica de tejido mamario a las 24 horas de destete. En color verde se detecta la calpaína 1 distribuida en el citoplasma de las células epiteliales y en color rojo se representa la histona H3. Las células epiteliales apoptóticas se encuentran en el lumen de los acini. La escala es de 75  $\mu\text{m}$  y de 20  $\mu\text{m}$  en la ampliación.*

Por último es interesante destacar, como ya he comentado al principio, que el riesgo de cáncer de mama tras el embarazo se debe a un microambiente pro-inflamatorio mediado por macrófagos y controlado por diferentes vías de señalización que se da en la glándula durante la involución, entre la que destacan la sinergia entre las vías STAT3 y NF- $\kappa$ B (Asztalos y cols 2010). Las mujeres que tienen un cáncer tras el embarazo tienen un pronóstico peor y la supervivencia es mucho menor cuando se compara con mujeres que tienen cáncer de mama y que no han tenido un embarazo recientemente. Este tipo de cáncer se acompaña de un incremento en la acumulación de colágeno, una expresión aumentada de ciclooxigenasa-2 en el tumor que se correlaciona con la expresión aumentada de la aromatasa, enzima responsable de convertir los andrógenos en estrógenos (Lyons y cols 2011). Además, la prostaglandina E2,

un producto de la activación de la vía COX-2, aumenta la expresión de la aromatasa (Baumgarten & Frasor 2012). Estas investigaciones apoyan la importancia de futuros estudios clínicos que determinen si las mujeres con riesgo elevado de cáncer de mama post-parto se beneficiarían del tratamiento con fármacos anti-inflamatorios no esteroideos durante el periodo de involución.



**FIGURA 5:** La nitricación de proteínas y la vía de los retinoides en la glándula mamaria durante la involución.

### Comentarios finales y agradecimientos

Hemos visto a largo de esta presentación que durante la regulación de la involución de la glándula mamaria tras la lactancia, intervienen diferentes procesos biológicos que están muy controlados, que se suceden en el tiempo y que en muchas ocasiones se superponen y cuyo objetivo final es devolver la glándula mamaria al estado que se encontraba antes del comienzo del ciclo

embarazo/lactancia. La inducción simultánea de señales de muerte celular programas como apoptosis, la mediada por lisosomas y autofagia junto con las señales de inflamación y proliferación están muy reguladas durante este proceso. Podríamos decir que la homeostasia de la glándula durante la involución es un autentico ejercicio de equilibrio de las diferentes vías de señalización, porque en caso contrario supondría un grave conflicto celular. Si esto no ocurriera así, tendríamos un ambiente bioquímico que favorecería el cáncer; ya que no debemos olvidar que la mayor parte de las vías de señalización que regulan la involución fisiológica de la glándula mamaria también han sido identificadas como oncogenes y factores de transcripción que se activan durante la transformación neoplásica (Siegel & Muller 2010). Todo esto pone de manifiesto la importancia de este modelo experimental, el de la glándula mamaria durante la involución, para comprender mejor las ocho claves del cáncer, que los Drs Hanahan y Weinberg (2011) en su clásico trabajo titulado “Hallmarks of Cancer: The Next Generation” han propuesto y que cito a continuación: mantenimiento de las vías de señalización proliferativa, evitar los supresores del crecimiento, resistir la muerte celular, favorecer la replicación de forma continuada, inducción de la angiogénesis, activación de la invasión y metástasis, reprogramación del metabolismo energético y escapar la destrucción por el sistema inmune.

Todo este trabajo que les he comentado no hubiera sido posible sin mis maestros, mis colaboradores y sin las diferentes Universidades que me aceptaron para poder trabajar en ellas. Por lo tanto, debo agradecer al Metabolic Research Laboratory del Nuffield Department of Clinical Medicine de la Universidad de Oxford, al Hershey Medical School de la Pennsylvania State University y a la Rosalind Franklin University of Medicine and Science en Chicago; pero merece una especial mención, mi querida Universidad de Valencia a la que le debo la parte fundamental de mi formación y mi trabajo diario. Entre mis maestros, quiero destacar a tres personalidades importantes en mi vida; a mi padre, a quien sencillamente le debo todo lo que soy, al Dr. Derek H. Williamson, mi mentor en la Universidad de Oxford que me enseñó a entender la regulación del metabolismo, a no enamorarme de las ideas propias y a tener una visión escéptica de la organización académica; y al Dr. Richard

Hawkins que me dio la oportunidad de trabajar en USA, me enseñó bioquímica de la barrera hematoencefálica y los principios generales que debe tener la gestión eficaz de una institución dedicada a la investigación dentro de un contexto hospitalario; pero sobretodo le agradezco su amistad y la de su familia.

En el apartado de los colaboradores científicos y alumnos quiero dejar claro que son el colectivo más importante que tienen las Universidades y centros de investigación porque proporcionan ideas frescas, pasión, ambición por saber y supone la renovación constante. Esto lo expresó de forma brillante Santiago Ramón y Cajal: “no hay temas acabados, sencillamente hombres acabados en temas”. Claramente, las instituciones que no se renuevan constantemente están castigadas a la mediocridad. Mi lista de colaboradores es larga pero quiero agradecer en especial a los de los últimos años: Rosa Zaragozá, Elena Ruiz García-Trevijano, Vicente Miralles, Luis Torres, Estefanía Fernández, Ana Bosch, Desamparados Roda y Teresa Barber; y los becarios Teresa Arnandis e Iván Ferrer. Especial mención merece la técnico Dña. Concha García que durante los últimos 33 años hemos compartido una vida de laboratorio intensa y apasionante.

Llego al final, y me gustaría compartir con ustedes una actitud que ha regido mi vida y que aprendí de adolescente en el colegio Dane End House, en el condado de Hertfordshire, Inglaterra y que se puede leer en el prólogo de la Autobiografía de Bertrand Russell: “Tres pasiones intensas, pero sobrecogedoras han gobernado mi vida, el ansia de amor, la búsqueda del conocimiento y una insoportable piedad por el sufrimiento humano.”

Muchas gracias por su atención.

## **Bibliografía.**

- Arnandis T, Ferrer-Vicens I, García-Trevijano ER, Miralles VJ, García C, Torres L, Viña JR & Zaragoza R (2012) Calpains mediate epithelial-cell death during mammary gland involution: mitochondria and lysosomal destabilization. *Cell Death Differentiation* EPub ahead of printing
- Asztalos S, Gann PH, Hayes MK, Nonn L, Beam CA, Dai Y, Wiley EL & Tonetti DA (2010) Gene expression patterns in the human breast after pregnancy. *Cancer Prev Res* 3:301-311.
- Baumgarten SC & Frasor J (2012) Minireview: Inflammation: An Instigator of more aggressive estrogen receptor (ER) positive breast cancers. *Mol Endocrinol* 26:360-371.
- Barber T, García de la Asunción J, Puertes IR & Viña JR (1990) Amino acid metabolism and protein synthesis in lactating rats fed on a liquid diet. *Biochem J* 270:77-82.
- Barber T, Triguero A, Martínez-López I, Torres L, García C, Miralles VJ & Viña JR (1999) Elevated expression of liver  $\gamma$ -cystathionase is required for the maintenance of lactation in rats. *J. Nutr.* 129:928-933.
- Bernard C (1865) *Introduction à l'étude de la médecine expérimentale*. Cour au Collège de France. Paris. Traducción, presentación y notas de Jaime Pi-Sunyer (1976) *Introducción al estudio de medicina experimental*. Editorial Fontanella. Barcelona. España.
- Brantley DM, Yull FE, Muraoka RS, Hicks DJ, Cook CM & Kerr LD (2000) Dynamic expression and activity of NF-kappaB during postnatal mammary gland morphogenesis. *Mech Dev* 97,149-155.
- Brenner S (2006) Sydney Brenner, Mi vida en la ciencia. Càtedra de Divulgació de la Ciència. Publicacions de la Universitat de València.

-Brenner S (2012) Entrevista a Sydney Brenner realizada por el Dr. Ginés Morata. CICNetwork ([www.cicnetwork.es](http://www.cicnetwork.es)) n°11: 6-13.

-Donato LJ & Noy N (2005) Suppression of mammary carcinoma growth by retinoic acid proapoptotic genes are targets for retinoic receptor and cellular retinoic acid-binding protein II signaling. *Cancer Res* 65:8193-8199.

-Editorial (2003) Krogh's principle for a new era. *Nature Genetics* 34:345-346.

-García de la Asunción J, Devesa A, Viña JR & Barber T (1994) Hepatic amino acid uptake is decreased in lactating rats. In vivo and in vivo. *J. Nutr.* 124:2163-2171

-Goldstein JL (2010) How to win a Lasker? Take a close look at the Bathers and Bulls. *Nature Med* 16: 1091-1096.

-Green KA & Lund LR (2005) ECM degrading proteases and tissue remodeling in the mammary gland. *Bioessays* 27:894-903.

-Gutgesell A, Ringseis R, Schmidt E, Brandsch C, Stangl GI & Eder K (2009) Down regulation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha and its coactivators in liver and skeletal muscle mediates the metabolic adaptations during lactation in mice. *J. Mol Endocrinol* 43:241-250.

-Hanahan D & Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646-674.

- Hawkins RA, Simpson IA, Mokashi A. & Viña JR (2006) Pyroglutamate stimulates Na<sup>+</sup>-dependent glutamate transport across the blood-brain barrier. *FEBS Lett* 580: 4382-4386.

- Hughes K., Wickenden JA, Allen JE E Watson CJ (2012) Conditional deletion of Stat3 in mammary epithelium impairs the acute phase response and modulates immune cell numbers during post-lactational regression. *J Pathol* 227:106-117.

- Jacob F (1970) *La logique du vivant: Une histoire de l'hérédité*. Paris: Gallimard.

-Krebs HA (1967) The making of a scientist. *Nature* 215:1244-1248.

-Krebs HA (1975) The August Krogh principle: For many problems there is an animal on which it can be most conveniently studied. *J Exp. Zool* 194: 221-226.

-Krebs HA (1979) On asking the right kind of question in biological research. Conferencia Inaugural-XVIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas-Libro de Actas pp 13-22.

-Krebs HA (1981) *Reminiscences and Reflexions*. Clarendon Press Oxford

-Kreuzaler PA, Staniszewska AD, Wenjing L, Omidvar N, Kedjouar B, Turkson J, Poli V, Flavell RA, Clarkson RWE & Watson CJ (2011) Stat3 controls lysosomal-mediated cell death in vivo. *Nature Cell Biol.* 13:303-311.

- Kreuzaler P A & Watson CJ (2012) Killing a cancer: what are the alternatives? *Nat Rev Cancer* 12:411-424.

-Krogh A. (1929) Progress of physiology. *Am. J. Physiol.* 90:243-251.

-Lee WJ, Hawkins RA, Peterson DR & Viña JR (1996) Role of oxoproline in the regulation of neutral amino acid transport across the blood-brain barrier. *J Biol Chem* 271:19129-19133.

-Lefevre C., Sharp JA & Nicholas KR (2010) Evolution of lactation: Ancient origin and extreme adaptations of the lactation system. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 11:219-238.

- Ledford H (2008) The full cycle. *Nature* 453:843-845

-Lonnerdal B (1986) Effect of maternal intake on human milk composition *J Nutr.* 116:499-513.

-Lyons TR, O'Brien J, Borges VF, Conklin MW, Keely PJ, Eliceiri KW, Marusyk A, Tan A.Ch,& Schedin P (2011) Postpartum mammary gland involution drives progression of ductal carcinoma in situ through collagen and COX2. *Nature Med* 17:1109-1115

-Martin RD. (1996) Scaling of the mammalian brain: The maternal energy hypothesis. *NIPS* 11:149-156.

Martínez-López I, Garcia C, Barber T, Viña JR & Miralles VJ (1998) The L-glutamate transporters GLAST (EAAT1) and GLT-1 (EAAT2); expression and regulation in the lactating rat mammary gland. *Mol. Membr. Biol* 15: 237-242.

-McClellan HL, Miller SJ, Hartmann PE (2008) Evolution of lactation: Nutrition v. protection with special reference to five mammalian species. *Nutr. Res Rev* 21:97-116.

-McKenna NJ (2012) *EMBO Retinoids 2011: Mechanisms, biology and pathology of signaling by retinoic acid receptors*. *Nucl Receptor Signal* 10: In press

-Medawar PB (1979) *Advice to young scientist*. Harper & Row Publishers. New York.

-Medawar PB (1986) *Memoir of a Thinking Radish*. Oxford University Press

-Meister A & Anderson ME (1983) Glutathione. *Ann. Rev. Biochem* 52:711-760.

- O'Brien J, Martinson H., Durand-Rougely C. & Schedin P (2012) Macrophages are crucial for epithelial cell death and adipocyte repopulation during mammary gland. *Development* 139:269-275.

-Prentice A M, Roberts S B, Prentice A, Paul A A, Watkinson M, Watkinson AA & Whitehead RG (1983) Dietary supplementation of lactating Gambian women. I Effect on breast-milk volume and quality. *Human Nutr.* 37:53-64.

-Schafer ZT, Grassien AR, Song L, Jiang Z Gerhart-Hines Z Irie HY, Gao S, Puigserver P & Brugge JS (2009) Antioxidant and oncogene rescue of metabolic defects caused by loss of matrix attachment. *Nature* 461:109-113.

-Siegel PM & Muller W (2010) Transcription factor regulatory networks in mammary gland epithelial development and tumorigenesis. *Oncogene* 29: 2753-2759.

- Snyderman SE, Holt LE; Dancis J, Rotman E & Boyer A (1962) Unessential nitrogen: a limiting factor for human growth *J. Nutr* 76:57-67

-Sun WM, Huang ZZ & Lu Sc (1996) Regulation of glutamylcysteine synthetase by protein phosphorylation. *Biochem J* 320:321-328.

-Torres L, Sandoval J, Penella E, Zaragoza R, García C, Rodríguez JL & Viña JR & García-Trevijano ER (2009) In vivo GSH depletion induces c-myc expression by modulation of chromatin protein complexes. *Free Rad. Biol Med* 46: 1534-1542.

-Torres L, Serna E, Bosch A, Zaragoza R, GarcíaC, Miralles V, Sandoval J, Viña JR & García-Trevijano ER (2011) NF- $\kappa$ B as node for signal amplification during weaning. *Cell Physiol Biochem* 28:833-846.

-Van Keymeulen A., Rocha AS., Ousset M., Beck B., Bouvencourt G., Rock J., Sharma N., Dekoninck S. & Blanpain C (2011) Distinct stem cells contribute to mammary gland development and maintenance. *Nature* 479:189-193.

-Vorbach C, Capecchi MR & Penninger JM (2006) Evolution of the mammary gland from the innate immune system? *BioEssays* 28:606-616.

-Viña J, Puertes IR, Sáez GT & Viña JR (1981) Role of prolactin in amino acid uptake by the lactating mammary gland of the rat. *FEBS Lett* 126:250-252.

-Viña JR, Puertes IR, Montor JB & Viña J (1983) Effect of starvation and refeeding on amino acid uptake by mammary gland of the lactating rat. *Biochem.J.* 216:343-347.

-Viña JR, Puertes IR, Montoro JB, Sáez GT & Viña J (1985) Gamma-glutamyl-amino acids as signals for the regulaci3n of amino acid uptake by the mammary gland of the lactating rat. *Biol. Neonate* 48:250-256.

-Viña JR, Puertes IR, Rodriguez A., Sáez GT, & Viña J (1987) Effect of fasting on amino acid metabolism by lactating mammary gland: studies in women and rats. *J. Nutr* 117:533-538.

-Viña JR, Palacín M, Ouertes IR, Hernández R & Viña J (1989) Role of the  $\square$ glutamyl cycle in the regulation of amino acid translocation. *Am. J. Physiol.* 257 (Endocrinol. Meta. 20) E916-E922.

-Viña JR, García C & Barber T (2001) Regulation of amino acid during lactation. *Recent Res Devel. Nutrition* 4:101-111.

- Watson CJ & Kreuzaler PA (2011) remodeling mechanisms of the mammary gland during involution. *Int J. Dev Biol* 55:757-762.

- Williamson DH (1973) Tissue-specific direction of blood metabolite. *Society for Experimental Biology Symposium* 27:283-298.

-Williamson DH (1980) Integration of metabolism in tissues of the lactating rat. *FEBS Letters* 117:K86-K92.

-Williamson DH (1986) Regulation of metabolism during lactation in the rat. *Reprod. Nutr. Develop.* 26:597-603.

- Zaragozá R, Miralles VJ, Rus AD, García C, Carmena R, García-Trevijano ER, Barber T, Pallardó FV, TorreL & Viña JR (2005) Weaning induces NOS-2 expression through NF-kB modulation in the lactating mammary gland: Importance of GSH. *Biochem J.* 391:581-588.

-Zaragozá R, Gimeno A, Miralles VJ, García-Trevijano ER, Carmena R, García C, Mata M, Puertes IR, Torres L & Viña JR (2007) retinoids induce MMP-9 expression though RAR $\alpha$  during mammary gland remodelling. *Am. J. Physiol (Endocrinol Metab)* 292: E1140-E1148.

-Zaragozá R, Torres L, García C, Eroles P, Corrales F, Bosch A, Lluch A, García-Trevijano ER & Viña JR (2009) Nitration of cathepsin D enhances its proteolytic activity during mammary gland remodelling after lactation. *Biochem J* 419:279-288.

-Zaragozá R, Bosch A, García C, Sandoval J, Serna S, García:trevijano ER, Viña JR (2010) Nitric oxide triggers mammary gland involution after weaning: remodeling is delay but not impaired in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Biochem J* 428-451-462.

## **DISCURSO DE CONTESTACIÓN DEL ACADÉMICO NUMERARIO**

**Ilmo. Sr D. Rafael Carmena Rodríguez**

Excmo. Sr. Presidente,  
Excmos. E Ilmos. Sres. Académicos,  
Señoras y Señores:

Agradezco sinceramente al Excmo. Sr. Presidente el haberme designado para pronunciar estas palabras de contestación al discurso de ingreso de nuestro nuevo académico, el Dr. Juan Viña Ribes.

La recepción de un nuevo académico es siempre un acto de particular relieve y uno de los más importantes de los que periódicamente celebra esta Real Academia. Considero, por tanto, un honor representar hoy a nuestra institución dando respuesta al discurso del Dr. Viña. Constituye, además, una satisfacción personal por cuanto con la familia Viña me unen viejos lazos de amistad que se remontan a la que ya tuvieron nuestros padres, D. José Viña Giner y D. Miguel Carmena Villarta.

El Dr. Juan Viña finalizó brillantemente sus estudios de Licenciatura de Medicina en nuestra Facultad en 1979, habiendo desempeñado durante tres años el puesto de Alumno Interno del Departamento de Bioquímica.

Desde 1979 a 1981 trabajó como Doctorando en el MetabolicResearchLaboratory de la Universidad de Oxford (Reino Unido) bajo la dirección del Premio Nobel Sir Hans Krebs. En 1982 obtuvo el grado de Doctor con Premio Extraordinario en la Universidad de Valencia. Completó su formación investigadora en Estados Unidos, con estancias en el Hershey Medical Center, (Pensilvania) y en la Chicago Medical School.

En 1984 obtuvo por oposición la plaza de Profesor Titular y, desde 1990, es Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular en nuestra Universidad. Ha sido Director del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Director

General de la Fundación para la Investigación (INCLIVA) del Hospital Clínico Universitario de Valencia desde 2001 hasta 2011 y es miembro del Patronato de la Fundación Cañada Blanch, de la Fundación ADEIT y de la Fundación Mediterránea de Derechos Humanos.

Su actividad investigadora ha sido y es notablemente intensa y fructífera. Desde 1985 hasta la fecha ha participado, como Investigador Principal, en cerca de treinta Proyectos I+D+i financiados en convocatorias competitivas de administraciones o entidades públicas o privadas.

En estrecha relación con lo anterior, el Dr. Viña ha sabido crear un grupo de investigación potente y cohesionado que hasta la fecha lleva publicados más de un centenar de trabajos en revistas internacionales y otras tantas ponencias o comunicaciones a congresos.

En el capítulo de méritos y premios, el Dr. Viña obtuvo en 1982 el Premio Extraordinario de Doctorado de nuestra Universidad, Premio García Blanco a la Investigación en Bioquímica, Premio Grande Covian de la Sociedad Española de Nutrición Básica y Aplicada y Premio a la trayectoria científica del Instituto Danone. Es miembro, entre otras, de la American Physiological Society, la Nutrition Society y la Biochemical Society.

Tras este, por fuerza, resumido recorrido de la vida científica del nuevo académico, no debe sorprendernos la extraordinaria calidad y el profundo contenido científico del discurso que acabamos de escuchar.

En su brillante planteamiento inicial, después de enumerar las admoniciones que han guiado su vida científica, el Dr. Viña nos ha recordado la cita de David Hume, “la pasión es el gran motor del conocimiento y la razón es y será siempre esclava de la pasión”.

Creo interpretar que, la inclusión de esta cita en el preludio de su discurso, significa que la pasión ha guiado al Dr. Viña a investigar buscando adquirir nuevos conocimientos. Le ha llevado, en suma, a formularse preguntas y a utilizar modelos experimentales válidos para ese viaje de ida y vuelta que es la medicina traslacional, punto de encuentro entre la investigación básica y su

traslación a la investigación clínica. Se trata, en definitiva, de buscar en laboratorio respuestas y soluciones a la enfermedad humana.

El Dr. Viña y su equipo han dedicado las últimas décadas al estudio de dos líneas básicas de investigación: la utilización de substratos circulantes en sangre y su captación por los tejidos y la muerte celular programada y consiguiente remodelación tisular.

El modelo experimental elegido ha sido la glándula mamaria de la rata, que ofrece la posibilidad de responder a las dos interrogantes arriba señaladas: la necesidad de la glándula mamaria de aumentar la captación de substratos válidos para la lactancia y la involución que fisiológicamente sufre esta glándula tras el destete.

La lactancia es una de las funciones fisiológicas más antiguas de los mamíferos y es interesante resaltar, como nos ha recordado el Dr. Viña, que la glándula mamaria y la producción de leche evolucionaron, durante los últimos 200 millones de años, como parte del sistema inmune innato.

La leche constituye el único alimento de los mamíferos recién nacidos. La composición química de la leche de los diferentes mamíferos se adapta a la velocidad de crecimiento de las crías de las respectivas especies y está en relación directa con su contenido en proteínas. La relación entre el logaritmo decimal de la concentración de proteínas de la leche en gramos por decilitro y el logaritmo decimal del tiempo necesario para duplicar el peso del nacimiento, en días, es aparentemente lineal.

Recordemos que el contenido de la leche de rata en proteínas es 10 veces mayor que en la leche de mujer, lo que permite doblar el tamaño de la cría en 4 días, mientras que en la especie humana esto ocurre a los 120 días.

La leche materna es el alimento idóneo durante los primeros 4-6 meses de vida postnatal ya que su composición se adapta a las limitaciones fisiológicas del tubo digestivo, del metabolismo intermediario y de la función renal. Por otra parte, no debemos olvidar el importante papel de la leche humana en la

protección de infecciones gracias a su contenido en IgA, lactoferrina, lisozima, oligosacáridos y otros factores.

La lactancia materna juega también un papel fundamental como protector y frenador de la obesidad en la infancia y adolescencia, comparada con la alimentación de fórmula. Este efecto protector de la lactancia materna frente a la obesidad parece estar relacionado con el contenido en leptina, que se encuentra más elevado en los lactantes que toman leche materna.

Conviene dejar sentado que la fundación de Roma, en el año 753 antes de Cristo, no hubiera tenido lugar si los hermanos Rómulo y Remo hubieran sido amamantados por una loba, como así lo describe la tradición histórica. La leche de loba tiene una composición que haría imposible su asimilación por el tubo digestivo del lactante y los hermanos no hubieran podido sobrevivir con este tipo de alimentación.

Por todo ello, en estos tiempos convulsos, proclives a mitos y leyendas sobre los llamados alimentos naturales, es necesario aclarar que, como solía repetir mi maestro, el Prof. Francisco Grande Covian, el único alimento natural para el ser humano es la leche materna.

Se conocen bien los cambios fisiológicos necesarios para que la madre gestante produzca la leche necesaria para los neonatos. La demanda de nutrientes por la glándula en esta fase se satisface aumentando la ingesta de alimentos y llevando a cabo una redistribución específica de nutrientes hacia la glándula. La regulación a largo plazo de este proceso implica la participación de diversas hormonas, como la prolactina, insulina y gonadotrofinas.

Además, la expresión y actividad de la enzima lipoproteinlipasa en la glándula mamaria se hallan aumentadas, permitiendo la captación de triglicéridos circulantes. El 99% del contenido graso de la leche son triglicéridos. Cabe destacar, al comentar el contenido en grasa de la leche humana, cercano a los 5 g/dl, el predominio de ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga, en cantidad 30 veces superior a la hallada en la leche de vaca.

Estos ácidos grasos son indispensables para el adecuado desarrollo cerebral y retiniano del recién nacido y lactante pretérmino.

Otro aspecto crucial, estudiado en profundidad por el Dr. Viña y su grupo, es el control de la captación de aminoácidos y los mecanismos ahorradores de nitrógeno. El flujo intertisular del glutatión juega aquí un papel decisivo al ser el mayor proveedor de l-cisteína a la glándula mamaria. La disponibilidad de l-cisteína para el neonato es importante ya que está considerada como un aminoácido esencial de la leche humana. La concentración de proteínas en la leche humana es aproximadamente de 0,9 g/dl, es decir, más baja que la encontrada en la leche de otros mamíferos; recordemos que la leche de vaca contiene 3,5 g/dl

La leche humana posee, por otra parte, un alto contenido de nitrógeno no proteico, que oscila entre 20-25%, probablemente el más alto entre los mamíferos. Estos datos se han tenido siempre en cuenta para el diseño de fórmulas artificiales ya que, como dijimos, el contenido de nitrógeno es un factor limitante del crecimiento del recién nacido.

La leche humana posee un alto contenido de alfa-lactoalbúmina y lactoferrina. Destaca la ausencia de beta-lactoalbúmina, que es en cambio muy abundante en la leche de vaca. Precisamente, la riqueza de la leche de vaca en albúmina bovina continua siendo motivo de debate por su posible implicación, como antígeno, en el desencadenamiento de las reacciones inmunológicas que terminan destruyendo las células beta del islote pancreático y causando la diabetes mellitus tipo 1. Varios estudios ha puesto de manifiesto que la lactancia artificial con leche de vaca se asocia a la aparición de concentraciones elevadas de anticuerpos IgG dirigidos contra la albúmina bovina en niños con diabetes tipo 1 recién diagnosticada. Estos anticuerpos poseen una reactividad cruzada con otros antígenos presentes en las células beta pancreáticas.

En el apartado dedicado a la involución de la glándula mamaria tras el destete nos ha señalado nuestro nuevo académico la importancia que tiene la sinergia entre las diferentes vías de señalización. A las pocas horas de comenzar el destete cesa la elevada actividad metabólica y empieza el proceso

de involución, controlado por dichas vías. El Dr. Viña se ha ocupado especialmente de estudiar dos de las implicadas en este complejo proceso, la vía de los retinoides y la del factor de transcripción NF- $\kappa$ B.

Los primeros actúan modulando la expresión génica y mediando una vía de señalización importante en el mantenimiento, diferenciación y función de las células epiteliales de la glándula mamaria. El segundo es un importante factor que controla la respuesta inmune e inflamatoria del organismo.

Como acabamos de escuchar, del estudio llevado a cabo por el Dr. Viña y su grupo sobre los procesos de involución de la glándula mamaria tras el destete se derivan importantes conclusiones que podrían relacionar la fase de involución con la aparición del cáncer de mama. El microambiente proinflamatorio que se da en la glándula mamaria durante la involución puede favorecer la aparición de cáncer de mama tras el embarazo.

La homeostasis de la glándula en este estadio es un auténtico ejercicio de equilibrio entre las diferentes vías de señalización y si el equilibrio se rompe quedaría favorecida la activación de oncogenes que colaborarían a la transformación neoplásica. Una aplicación interesante del estudio de la fase de involución y remodelación de la glándula mamaria sería por lo tanto el diseño de nuevas dianas y estrategias para el tratamiento del cáncer de mama. Volvemos, pues, a las consideraciones iniciales del discurso de nuestro nuevo académico, volvemos en definitiva al viaje de ida y vuelta de la investigación traslacional.

La Real Academia de Medicina de la Comunidad Valenciana se congratula y se enriquece hoy con la entrada de un nuevo e ilustre miembro, cuyo brillante discurso he tenido el honor y el privilegio de contestar.

Me felicito y felicito también a la Academia por acoger hoy al Dr. Juan Viña Ribes y a quien con todo afecto damos la bienvenida.