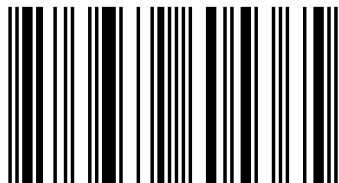


El cáncer de mama en los hospitales militares españoles (2000-2008)

La aparición de tumores mamarios en Medicina Veterinaria y en Medicina Humana es de especial relevancia por cuestiones de supervivencia y bienestar. Afecta mayoritariamente a las hembras. El sucesivo incremento en el número de mujeres que ingresan en las Fuerzas Armadas Españolas hace que sea un tema a considerar como componentes fundamentales en el engranaje militar. El objetivo de este estudio es valorar la importancia de las modificaciones que aparecen en el citoesqueleto celular (en particular a nivel de unos filamentos intermedios denominados queratinas) a lo largo de los diferentes periodos que sufre la glándula mamaria, haciendo hincapié en la lactación. De este modo se podrá caracterizar la expresión y morfología de dichos filamentos en un estado fisiológico en contraposición con estados patológicos, y así establecer un método de diagnóstico precoz complementario a los utilizados en la actualidad. El diseño experimental se ha basado en ratones, comparando los resultados con trabajos ya existentes en humanos, relacionados directa o indirectamente. Los resultados concuerdan con bastante exactitud con otros estudios anteriores y paralelos.

(1) José Manuel Martínez Pérez es Doctor en Veterinaria y trabaja en la Cátedra Timac Agro de la Universidad de Navarra. (2) Isabel Mauriz Turrado es Licenciada en Biología e investigadora en el Centro de Investigación Médica Aplicada de Pamplona. (3) Jesús Ángel Martínez Pérez es Doctor en Historia y Teniente de Artillería en el RAMIX-30 de Ceuta.



978-3-639-60536-5

editorial académica española

adae
editorial académica española



José Manuel Martínez Pérez · Isabel Mauriz Turrado · Jesús Ángel Martínez Pérez

El cáncer de mama en los hospitales militares españoles (2000-2008)

Casuística y diagnóstico previo mediante el estudio del citoesqueleto celular

José Manuel Martínez Pérez
Isabel Mauriz Turrado
Jesús Ángel Martínez Pérez

**El cáncer de mama en los hospitales militares españoles (2000-
2008)**

**José Manuel Martínez Pérez
Isabel Mauriz Turrado
Jesús Ángel Martínez Pérez**

**El cáncer de mama en los hospitales
militares españoles (2000-2008)**

**Casuística y diagnóstico previo mediante el estudio
del citoesqueleto celular**

Editorial Académica Española

Impressum / Aviso legal

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek: Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Alle in diesem Buch genannten Marken und Produktnamen unterliegen warenzeichen-, marken- oder patentrechtlichem Schutz bzw. sind Warenzeichen oder eingetragene Warenzeichen der jeweiligen Inhaber. Die Wiedergabe von Marken, Produktnamen, Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen u.s.w. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutzgesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Información bibliográfica de la Deutsche Nationalbibliothek: La Deutsche Nationalbibliothek clasifica esta publicación en la Deutsche Nationalbibliografie; los datos bibliográficos detallados están disponibles en internet en <http://dnb.d-nb.de>.

Todos los nombres de marcas y nombres de productos mencionados en este libro están sujetos a la protección de marca comercial, marca registrada o patentes y son marcas comerciales o marcas comerciales registradas de sus respectivos propietarios. La reproducción en esta obra de nombres de marcas, nombres de productos, nombres comunes, nombres comerciales, descripciones de productos, etc., incluso sin una indicación particular, de ninguna manera debe interpretarse como que estos nombres pueden ser considerados sin limitaciones en materia de marcas y legislación de protección de marcas y, por lo tanto, ser utilizados por cualquier persona.

Coverbild / Imagen de portada: www.ingimage.com

Verlag / Editorial:

Editorial Académica Española

ist ein Imprint der / es una marca de

ICS Morebooks! Marketing SRL

4, Industrialia street, 3100 Balti, Republic of Moldova

Email / Correo Electrónico: info@omniscryptum.com

Herstellung: siehe letzte Seite /

Publicado en: consulte la última página

ISBN: 978-3-639-60536-5

Zugl. / Aprobado por: León, Universidad de León, 2008-2014.

Copyright / Propiedad literaria &cop José Manuel Martínez Pérez, Isabel Mauriz Turrado, Jesús Ángel Martínez Pérez

Copyright / Propiedad literaria © 2017 ICS Morebooks! Marketing SRL

Alle Rechte vorbehalten. / Todos los derechos reservados. Saarbrücken 2017

EL CÁNCER DE MAMA EN LOS HOSPITALES MILITARES ESPAÑOLES (2000-2008)

CASUÍSTICA Y DIAGNÓSTICO PREVIO MEDIANTE EL ESTUDIO DEL CITOESQUELETO CELULAR



Dibujo del H.M.C. "Gómez Ulla" ["Homenaje al Hospital Español", en *Monografía Beecham*, nº 50, 1991]

AUTORES

JOSÉ MANUEL MARTÍNEZ PÉREZ

- Cátedra "Timac Agro" - CMI Roullier. Universidad de Navarra.
- Dpto. Sanidad Animal (Parasitología y Enf. Parasitarias). Universidad de León.

ISABEL MAURIZ TURRADO

- Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA). Universidad de Navarra.

JESÚS ÁNGEL MARTÍNEZ PÉREZ

- Regimiento de Artillería Mixto (RAMIX) nº 30. Ceuta.

ÍNDICE

- RESUMEN	pág. 4
- INTRODUCCIÓN	pp. 5-16
- MARCO TEÓRICO	
Características del citoesqueleto celular	pp. 17-18
Características de los filamentos intermedios	pp. 18-19
Clasificación general de filamentos intermedios	pp. 19-27
Expresión de las citoqueratinas en la glándula mamaria	pp. 27-29
- MATERIAL Y MÉTODOS	
Diseño experimental	pp. 30-31
- RESULTADOS	
Técnicas utilizadas	pp. 32-33
Estudio de los filamentos intermedios durante la lactación	pp. 33-36
- DISCUSIÓN	pp. 37-41
- CONCLUSIONES	pág. 42
- BIBLIOGRAFÍA	pp. 43-49

RESUMEN

La aparición de tumores mamarios en Medicina Veterinaria y en Medicina Humana es de especial relevancia por cuestiones de supervivencia y bienestar. Afecta mayoritariamente a las hembras. El sucesivo incremento en el número de mujeres que ingresan en las Fuerzas Armadas Españolas hace que sea un tema a considerar como componentes fundamentales en el engranaje militar. El objetivo de este estudio es valorar la importancia de las modificaciones que aparecen en el citoesqueleto celular (en particular a nivel de unos filamentos intermedios denominados queratinas) a lo largo de los diferentes periodos que sufre la glándula mamaria, haciendo hincapié en la lactación. De este modo se podrá caracterizar la expresión y morfología de dichos filamentos en un estado fisiológico en contraposición con estados patológicos, y así establecer un método de diagnóstico precoz complementario a los utilizados en la actualidad. El diseño experimental se ha basado en ratones, comparando los resultados con trabajos ya existentes en humanos, relacionados directa o indirectamente. Se ha desarrollado en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de León. Los resultados concuerdan con bastante exactitud con otros estudios anteriores y paralelos; las diferencias estribarían en modificaciones de parámetros de especie, raciales o generacionales. El estudio que se presenta puede servir como punto de partida para aquellos científicos interesados en este campo que lo quieran continuar. Como diría el ilustre Capitán Médico don Santiago Ramón y Cajal en su ingreso en la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales acerca de las obligadas hipótesis de trabajo, éstas deben ser objetivas y comprobables por otros grupos de investigación, resolver inequívocamente las cuestiones iniciales propuestas y sugerir nuevas controversias.

PALABRAS CLAVE: citoesqueleto, filamentos intermedios, mama, cáncer.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es un problema de enorme trascendencia en la sociedad actual y, por ende, en las Fuerzas Armadas. Afecta principalmente al género femenino. Este cáncer es uno de los primeros de incidencia en humanos; es el cáncer maligno más frecuente en la población femenina española con una tasa de incidencia de 40-75 casos por cada 100 000 mujeres, siendo la primera causa de muerte por tumores en mujeres en España y la segunda en EEUU tras el cáncer de pulmón. Aparece en casi el 75% de las mujeres de más de cincuenta años y es de especial virulencia en edades comprendidas entre treinta y cincuenta años, la edad media de afectación es de cincuenta y dos años. En el caso de varones sólo se reseña una incidencia del 1%. Se considera que en el 9% de los casos los carcinomas pueden tener un componente hereditario. Es el responsable de casi el 30% de fallecimientos por causa de cáncer, aunque esta cifra está disminuyendo poco a poco debido a los avances en detección precoz, diagnósticos y en especial a los nuevos tratamientos.

El uso de la mamografía se justifica en el diagnóstico precoz del cáncer de mama en lesiones no palpables o como método de rastreo en mujeres asintomáticas. Los valores referenciados se explican por el hecho de la aparición de otras técnicas unido al desvío de pacientes a otros hospitales de carácter civil y al cierre de servicios en la red hospitalaria militar, así como a la falta de datos en algunos de ellos (estos últimos están marcados en todas las tablas con una "X").

Otros procedimientos como la estereotaxia suponen un menor trauma psicológico, conllevan un análisis citohistológico más completo posterior y localizan lesiones más dificultosas que no son visibles por ecografía. Estudios recientes sugieren la importancia del tratamiento sobre la propia detección, así como creen necesario retrasar la edad para iniciar los chequeos a cincuenta años. Gracias a ellos la supervivencia se ve incrementada en un 25%.

Aun así se tiene constancia de unos 20 000 nuevos casos cada año en España, sobreviviendo casi el 80% de las mujeres tras cinco años de haberse producido el diagnóstico. La valoración diagnóstica debe ser multidisciplinar, incluyendo una exploración física y mamografías, y si fuera necesario también biopsias, estereotaxia, análisis de marcadores tumorales, etc., aunque algunos autores desaconsejan la realización de estudios genéticos de detección debido a su baja especificidad a la par que otros los defienden. Paralelamente surgen técnicas experimentales cuyo fin es acortar y suavizar el periodo postquirúrgico en tumores y otras patologías mamarias.

Los tratamientos varían según el individuo, el tipo y estirpe de cáncer mamario y su expansión; la cirugía, radioterapia y quimioterapia dependen de cada caso concreto. Se referencian casos donde una respuesta favorable inicial no revierte un posible rechazo o una recidiva o el efecto nulo de paralizar el tratamiento antes de la finalización indicada por el médico facultativo. Tumores histológicamente similares se pueden comportar de modo distinto, por ello el pronóstico y el tratamiento son difíciles de establecer.

Los hospitales militares reseñados son: Hospital del Aire (Madrid), H. M. Burgos, H. N. del Mediterráneo (Cartagena), H. M. "O'Donnell" (Ceuta), H. N. de El Ferrol, H. M. "Generalísimo Franco" (Madrid), H. M. del Rey (Las Palmas), H. M. C. "Gómez Ulla" (Madrid), H. N. "Virgen del Carmen" de Marín, H. M. "Capitán Médico Pagés" (Melilla), H. M. de Palma de Mallorca, H. N. "San Carlos" (San Fernando), H. M. "Vigil de Quiñones" (Sevilla), H. M. "Vázquez Bernabéu" (Valencia), H. M. "Orad Gajias" (Zaragoza), H. M. "Nuestra Señora del Carmen" (Madrid) y el Sanatorio de la Marina "Los Molinos" (Madrid).

Tabla I. Número de mamografías según el hospital militar (2004-2008)

Año	H. N. Cartagena	H. M. Ceuta	H. N. Ferrol	H. M. C. Madrid	H. M. Melilla	H. N. San Fernando	H. M. Valencia	H. M. Zaragoza	Total
2004	539	X	426	6125	X	4079	X	X	11169
2005	1169	265	329	4834	X	888	X	X	7485
2006	X	153	203	3940	X	926	X	X	5222
2007	0	184	41	2993	X	728	X	X	3946
2008	0	260	0	3953	0	736	0	796	5745

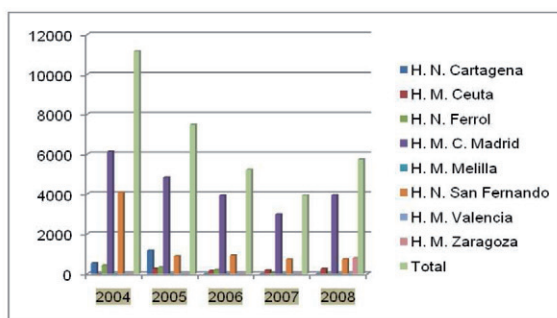


Figura 1. La prueba de mamografía en los hospitales militares españoles

Desde que en 1988 se incorporara la mujer de manera efectiva al ámbito militar en España, la tasa porcentual no ha hecho más que ir aumentando hasta superar el 12%. Por ello es necesario analizar esta patología dentro del conjunto de las Fuerzas Armadas con una proyección especial, ya que los hombres sufren en menor grado esta modalidad de cáncer en comparación con las mujeres.

Destacamos diferentes datos relativos a hospitalizaciones por causa de tumores malignos de hueso, tejido conectivo, piel y mama* (Anuario Estadístico Militar, 2000-2008). Sólo tenemos en cuenta este tipo de cánceres en su etapa maligna ya que las neoplasias de carácter benigno no están separadas por tipología; pese a ello, los datos son muy esclarecedores. En general, la casuística se ha localizado principalmente en los hospitales militares de San Fernando, Zaragoza y el “Gómez Ulla” (Madrid). Si lo analizamos según la edad de los individuos (militares y civiles) se aprecia con claridad cómo se ha ido incrementando la media de afectación superando abiertamente los cincuenta y dos años. Más del 30% de los casos se dan en individuos mayores de sesenta y cinco años, y entre el 53% y el 89% de los enfermos por este tipo de cáncer tienen más de cincuenta y seis años; su incidencia ha disminuido en más del 90% en pacientes con edades comprendidas entre los cuarenta y los cincuenta y cinco años.

Tabla IIa. Hospitalizaciones por tumor de mama* según hospital (2000-2008)

Año	H. del Aire	H. M. Burgos	H. N. Cartagena	H. M. Ceuta	H. N. Ferrol	H. M. Generalísimo	H. M. Las Palmas	H. C. D. Madrid
2000	34	5	29	X	5	4	2	564
2001	25	6	56	5	3	4	1	382
2002	7	3	32	4	5	0	1	336
2003	0	0	8	1	7	0	0	212
2004	0	0	2	2	2	0	0	86
2005	0	0	7	4	1	0	0	113
2006	0	0	3	2	X	0	0	115
2007	0	0	2	6	20	0	0	114
2008	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla IIb. Hospitalizaciones por tumor de mama* según hospital (2000-2008)

Año	H. N. Marín	H. M. Melilla	H. M. Palma M.	H. N. San Fernando	H. M. Sevilla	H. M. Valencia	H. M. Zaragoza	P. N. Madrid	S. M. Molinos	Total
2000	X	0	X	36	107	16	5	X	1	808
2001	X	1	X	15	135	8	13	X	X	654
2002	X	1	0	72	111	9	21	0	0	602
2003	0	X	0	58	0	6	18	0	0	310
2004	0	X	0	107	0	3	17	0	0	219
2005	0	X	0	89	0	5	16	0	0	235
2006	0	X	0	48	0	1	6	0	0	175
2007	0	1	0	29	0	4	2	0	0	178
2008	0	0	0	14	0	0	22	0	0	36

Tabla III. Cáncer de mama* según la edad en hospitales militares (2000-2008)

Año	<1 año	2-12	13-18	19-25	26-40	41-55	56-65	> 65	Total
2008	0	0	0	3	4	5	11	13	36
2007	0	0	1	0	3	16	51	107	178
2006	0	0	1	0	2	27	52	93	175
2005	1	0	1	11	12	25	87	98	235
2004	1	0	5	2	2	49	96	64	219
2003	0	0	10	9	11	71	88	121	310
2002	0	0	1	24	30	200	143	204	602
2001	1	1	0	13	32	256	139	212	654
2000	0	0	7	23	64	259	215	240	808

Han descendido también las muertes y los traslados a otros hospitales en los últimos años, manteniéndose las altas hospitalarias por prescripción médica. Los avances en diagnóstico precoz, tratamiento y prevención, unidos a otros factores, están dando sus frutos. Si valoramos estas últimas cifras y las comparamos con el sexo podemos observar que los principales casos en pacientes menores de veinticinco años tienen lugar preferentemente en hombres. Por el contrario las mujeres padecen este cáncer a partir de esta edad, siendo su incidencia variable según va progresando el tiempo hasta centrarse en torno a los sesenta años como media.

Las tablas presentadas en los hospitales militares españoles nos acercan en cierta manera a la situación general de este problema, pues su dispersión es a lo largo de toda la geografía nacional y a ellos acude personal civil y militar. A partir de las cifras de afectados nos podemos hacer una idea de la enorme trascendencia que tiene y la evolución que sigue año tras año.

Tabla IVa. Casos según sexo y edad en hospitales militares (2000-2008)

EDAD	2000		2001		2002		2003		2004	
	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres
< 1 año	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
2-12	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
3-18	1	6	0	0	0	1	10	0	5	0
19- 25	6	17	6	7	20	4	5	4	1	1
26-40	14	50	8	24	9	21	7	4	2	0
41-55	14	242	11	245	20	180	7	64	2	47
56-65	45	170	31	108	19	124	12	76	14	82
> 65	49	191	38	174	49	155	30	91	5	59

Tabla IVb. Casos según sexo y edad en hospitales militares (2000-2008)

EDAD	2005		2006		2007		2008	
	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres
< 1 año	0	1	0	0	0	0	0	0
2-12 años	0	0	0	0	0	0	0	0
3-18 años	0	1	1	0	1	0	0	0
19- 25 años	10	1	0	0	0	0	3	0
26-40 años	8	4	2	0	0	3	2	2
41-55 años	6	19	6	21	3	13	5	0
56-65 años	7	80	7	45	2	49	0	11
> 65 años	29	69	30	63	45	62	5	8

La meta a la que pretendemos llegar surge de la comparación de la casuística en humanos y en el ratón de laboratorio. Éste es un modelo ideal para la investigación debido a su parecido en la morfología y fisiología glandulares, así como a la frecuencia de aparición de tumores mamarios espontáneos, similar a la diagnosticada en la especie humana.

Se puede observar el porcentaje del personal de Defensa que ha acudido a los hospitales militares españoles en comparación con el civil. Hay una cifra considerable de individuos que aparecen como desconocidos, por lo que los incluimos con el personal no militar. Probablemente una parte de estos pacientes sean militares o familiares de ellos. Con esto queremos decir que, a pesar de tener en cuenta unos números de menor entidad, la relevancia de los casos de cáncer de mama es enorme.

Tabla V. *Motivo de alta en enfermos de mama* en hospitales militares (2000-2008)*

Año	Total	Orden Médica	Fallecimiento	Traslado	Voluntaria	Desconocido
2008	36	13	1	0	0	22
2007	178	168	7	2	1	0
2006	175	166	7	2	0	0
2005	235	20	0	7	1	207
2004	219	86	4	0	2	127
2003	310	229	8	0	0	73
2002	602	521	18	1	4	58
2001	654	547	24	3	3	77
2000	808	749	25	1	2	31

Tabla VIa. *Estancias debidas a cáncer de mama* en hospitales militares (2000-2008)*

Año	H. del Aire	H. M. Burgos	H. N. Cartagena	H. M. Ceuta	H. N. Ferrol	H.M. Generalísimo	H. M. Las Palmas	H. C. M. Madrid	H. N. Marín
2008	0	0	0	X	0	0	0	X	0
2007	0	0	91	42	83	0	0	733	0
2006	0	0	11	66	X	0	0	1264	0
2005	0	0	42	17	8	0	0	1175	0
2004	0	0	11	9	13	0	0	1047	0
2003	0	0	37	1	90	0	0	2857	0
2002	90	32	149	1	31	0	316	4166	X
2001	226	67	164	51	38	581	12	4044	X
2000	257	52	67	X	62	119	61	4209	X

A partir del perfil de expresión de los filamentos intermedios (en especial del patrón citoqueratínico) se pueden establecer analogías y diferencias entre tejidos sanos y neoplásicos, también servir como primera etapa para categorizar el fenotipo tumoral. La segunda parte consistiría en avanzar en el análisis mediante técnicas de Biología Molecular e identificar los genes implicados.

Se considera que todos los cánceres, cualquier estirpe y tipo, tienen un origen genético en su nivel celular por una acumulación de alteraciones y mutaciones a nivel de los genes que producen inestabilidad genómica y una pérdida del control sobre el crecimiento, desarrollo y diferenciación de la célula. No todas las alteraciones van a desarrollar un cáncer pues se necesitan entre tres y seis alteraciones en genes reguladores para que tenga lugar una tumoración.

Varios tipos de genes pueden ser los afectados, principalmente los genes supresores y los genes reparadores. Un fallo en los primeros condiciona un crecimiento sin control de una estirpe celular; una alteración en los segundos ocasiona una amplificación de los errores del código genético. Existen dos tipos de terapias aprobadas en el contexto asistencial que están ofreciendo buenos resultados en la actualidad. Una de ellas centra su diana terapéutica en los receptores de los factores de crecimiento que conducen señales del exterior al interior de la célula. Existe un anticuerpo monoclonal que se dirige al gen Her-2 y bloquea estos receptores. En el cáncer de mama, entre el 15 y el 30% de los casos la célula tumoral emplea este receptor para su crecimiento incontrolado.

Tabla VIb. Estancias debidas a cáncer de mama* en hospitales militares (2000-2008)

Año	H. M. Melilla	H. M. Palma M.	H. N. San Fernando	H. M. Sevilla	H. M. Valencia	H. M. Zaragoza	P. N. Madrid	S. M. Molinos	Total
2008	X	0	127	0	0	92	0	0	219
2007	28	0	287	0	70	21	0	0	1355
2006	X	0	272	0	3	39	0	0	1655
2005	X	0	317	0	21	67	0	0	1647
2004	X	0	329	0	15	117	0	0	1541
2003	X	0	240	0	78	109	0	0	10430
2002	17	0	311	361	42	166	0	0	5682
2001	22	X	195	442	23	198	X	X	6063
2000	X	X	204	539	166	107	X	819	6662

Tabla VII. Personal atendido en hospitales militares españoles (2000-2007)

Año	Pers. Defensa/Fuerzas de Seg.	Civiles/desc.	% Defensa	% Resto	Total
2000	34983	20329	63.25	36.75	55312
2001	34776	18104	65.76	34.24	52880
2002	36649	7182	83.61	16.39	43831
2003	16451	16121	50.51	49.49	32572
2004	16434	15683	51.17	48.83	32117
2005	19164	16765	53.34	46.66	35929
2006	20187	16402	55.17	44.83	36589
2007	12687	19371	39.58	60.42	32058

El epitelio mamario sufre cambios drásticos en respuesta a estímulos hormonales durante la lactación. Estas modificaciones se deben acompañar de cambios ultraestructurales a nivel del citoesqueleto celular. Los filamentos intermedios son los elementos citoesqueléticos más resistentes, en comparación con los microtúbulos y los microfilamentos, formando una red citoplasmática que rodea al núcleo y extendiéndose hasta la periferia celular e interactuando con la membrana plasmática; además, regulan la localización de proteínas y la transmisión de señales intracelulares. Últimas investigaciones revelan un nuevo papel de los filamentos intermedios siendo esenciales en el crecimiento celular y en el tamaño por intervenir en la regulación de la síntesis proteica. Los filamentos intermedios son particularmente prominentes en el citoplasma de células que están sujetas a estrés mecánico. La familia multigénica de este tipo de filamentos está formada por más de sesenta componentes, que se pueden subdividir en seis categorías sintetizadas en células tipo específicas, concordando con su homología de secuencia, su estructura génica y sus propiedades de ensamblaje; la quinta categoría tiene sus propias particularidades. Esta especificidad es fundamental para estudios de índole histogénico y diagnóstico tumoral.

Para determinar si la progresión del epitelio se acompaña de cambios en la estructura del citoesqueleto, en particular en las citoqueratinas, se han usado métodos inmunohistoquímicos para estudiar la expresión celular y la distribución de las citoqueratinas en glándulas mamarias de ratones NMRI en varias etapas de la lactación y en glándulas mamarias en reposo. La familia de citoqueratinas incluye un conjunto de diferentes polipéptidos de distintos pesos moleculares, que constituyen el principal tipo de filamentos intermedios en la mayoría de células epiteliales. La composición de subunidades de citoqueratinas es extremadamente heterogénea, variando con dependencia de la localización anatómica, el crecimiento celular, el ambiente, el estado de diferenciación y el momento de

desarrollo embrionario. La expresión de citoqueratinas en numerosos epitelios es diferente en tejidos normales en contraposición con la de tejidos tumorales, lo que es un criterio diagnóstico muy efectivo con el uso de los anticuerpos anti-citoqueratina apropiados y otras pruebas inmunohistoquímicas. Se encontraron modificaciones en el patrón queratínico en distintos momentos: las citoqueratinas 5, 14 y la vimentina, en todas las etapas; la citoqueratina 8 resultó positiva en todos los períodos excepto durante la primera semana de lactación; las citoqueratinas 6 y 16 fueron identificadas en las células mamarias en reposo, no en las glándulas lactantes y la citoqueratina 7 dio positivo en éstas y negativo en las no funcionales. Estos resultados demuestran que la expresión de citoqueratinas en glándula mamaria de ratón está sujeta a regulación hormonal.

Poco se sabe sobre el comportamiento de los filamentos intermedios en la glándula mamaria en lactación. Debido a los cambios morfológicos y bioquímicos que se detectan en la mama, el patrón de expresión de las citoqueratinas se ve alterado. En este trabajo se muestran los resultados experimentales de los cambios que se dan en la glándula mamaria de ratona (principalmente durante la lactación) y que se acompañan de alteraciones en la expresión del patrón citoqueratínico.

MARCO TEÓRICO

Características del citoesqueleto celular

Las células eucarióticas tienen sus proteínas estructuradas en forma de esqueleto celular, que es una formación dinámica que modifica sus características morfológicas como consecuencia de cambios estacionales medioambientales. El citoesqueleto, también denominado almacén o retículo trabecular, está constituido por diferentes elementos, los microtúbulos, los microfilamentos y los filamentos intermedios. El tamaño de los primeros es de 22-25 nm de diámetro, tienen una forma tubular y están formados por tubulina. Si se realiza un corte transversal se ve una estructura anular, mientras que tras un corte longitudinal se aprecian dos líneas paralelas de unos 5 nm de grosor. En segundo lugar (aunque no por su tamaño) están los microfilamentos, con unos 6 nm de diámetro, sin forma tubular y formados por actina. Al efectuar un corte transversal se aprecian puntos en lugar de un anillo y, al hacer lo mismo longitudinalmente, líneas simples (en los microtúbulos eran dos pares de líneas). El tercer sistema incluye a los filamentos intermedios, anteriormente englobados dentro del grupo de microfilamentos o considerados como productos de degradación de los microtúbulos o de los microfilamentos gruesos de miosina. Se caracterizan por ser los elementos citoesqueléticos más rígidos y resistentes, forman una red periférica al núcleo y se extienden alrededor de la célula. Su misión es proporcionar resistencia mecánica a la célula e interactuar con otros componentes del citoesqueleto, así como regular la localización de proteínas y la transmisión de señales intracelulares.

Tras la aplicación de nuevos métodos de solubilización de proteínas, técnicas inmunocitoquímicas y microscopía electrónica se lograron identificar e independizar en un único grupo, como determinantes estructurales celulares. Al principio estos filamentos se denominaron según su localización principal; así

tendríamos los tonofilamentos (en las células epiteliales), los neurofilamentos (en las neuronas) o los gliofilamentos (en las células de la glía), entre otros. Pero no sólo en estos lugares, también se han identificado en la mayor parte de las células, como fibroblastos o células endoteliales; se encuentran dispersos heterogéneamente en el citoplasma, con unas dimensiones, función y estructura variables.

La secuencia aminoacídica forma una estructura tripartita común que consiste en un dominio central α -hélice altamente conservado, con dos extremos [N-terminal y C-terminal] y una gran variabilidad de secuencias de aminoácidos. Tienen un diámetro intermedio si los comparamos con los microtúbulos y los microfilamentos, entre 8 y 10 nm. Su función principal es meramente estructural.

Características de los filamentos intermedios

Se sitúan en diferentes tipos de células. Su expresión tiene lugar en localizaciones específicas dentro del compartimento celular. Según dónde se encuentren podemos hablar de neurofilamentos (en las neuronas), gliofilamentos (en células de la glía), citoqueratinas (en células epiteliales), filamentos de desmina (en el músculo liso y estriado), filamentos de vimentina (en células mesenquimales, principalmente), filamentos de periferina (en neuronas que emiten axones por el sistema nervioso periférico) y láminas nucleares. Pero no son completamente específicos de un tipo celular, pueden coexistir en un mismo sitio varios afines, como las citoqueratinas y los de vimentina.

Estructuralmente son muy parecidos. La configuración espacial de la molécula polipeptídica es helicoidal con tres porciones que se despliegan; posee 310 aminoácidos y mide 48 nm de longitud. Cada molécula se une a otra similar dando lugar a un dímero. La unión antiparalela de dos dímeros forma un tetrámero. El

dímero tendría un grosor de 1.5 nm y el tetrámero, del doble. Los tetrámeros se disponen alineados uno a continuación de otro para formar subfilamentos o protofilamentos, que se juntan para dar lugar al filamento intermedio básico. El ensamblaje-desensamblaje de los filamentos intermedios tiene lugar mediante la fosforilación. No está clara la existencia de un centro organizador de filamentos intermedios, bien sea común o específico para cada una de las proteínas. Se conoce la existencia de Proteínas Asociadas a Filamentos Intermedios (IFAP), que pueden unir unos filamentos con otros entre sí (como la sinemina, la paranemina o la filagrina) o filamentos intermedios a microtúbulos mediante las proteínas asociadas de éstos (como la plectina). Últimamente se ha identificado una proteína nueva a la que se le ha denominado tricopleína, muy similar estructuralmente a la tricohialina, la plectina y la cadena pesada de la miosina, y que une a las citoqueratinas 8 y 18, así como interactúa con las citoqueratinas 5, 6a, 8, 14 y 16.

Clasificación general de filamentos intermedios

Neurofilamentos

Están constituidos por tres polipéptidos diferentes (de 65, 105 y 135 Kd), que son los llamados NF-L, NF-M y NF-H, respectivamente. Se encuentran en las neuronas y los axones del sistema nervioso central y periférico. Tienen un diámetro de 10 nm. Cada neurofilamento se relaciona con su vecino a través de unas proteínas asociadas. Su función es fundamentalmente estructural.

Gliofilamentos

Están representados por la GFAP de 55 Kd. No se encuentran en todas las células de la glía, sólo en el citoplasma de los astrocitos y de algunas células asociadas a éstos, de hecho en los oligodendrocitos no aparece. Este filamento es el responsable

de modular el movimiento y proporcionar estabilidad estructural a los procesos astrocitarios, aunque al carecer de las interconexiones que presentan los neurofilamentos tienen menos movimiento. Son densos y su diámetro es de 8 nm.

Citoqueratinas

Están constituidas por numerosas clases de proteínas fibrilares (40-70 Kd), ácidas y básicas, con un diámetro de 8 nm. Constituyen el mayor subgrupo dentro de los filamentos intermedios. Su función principal es proteger a las células epiteliales del estrés mecánico. Últimas investigaciones revelan un nuevo papel de los filamentos intermedios (en particular la citoqueratina 17), siendo esenciales en el crecimiento celular y en el tamaño por intervenir en la regulación de la síntesis proteica. De hecho hay diferencias en la expresión de dichas proteínas entre las distintas células de un mismo vertebrado. Las citoqueratinas no son exclusivas de los epitelios queratinizados, se encuentran también en la mayoría de las células epiteliales incluyendo los endotelios, excepto en los epitelios glomerular, del cristalino o del iris, entre otros. Esta proteína está ligada a otra, la filagrina. Se trata de una proteína estructural, así como interviene en uniones entre células (desmosomas) y es barrera de protección celular frente a ciertas agresiones externas. Estudios realizados con difracción de rayos X a principios de los años cincuenta mostraron que existía un patrón de citoqueratinas típico del tejido epitelial. La composición de subunidades de citoqueratinas es extremadamente heterogénea, variando con dependencia de la localización anatómica, el crecimiento celular, el ambiente, el estado de diferenciación y el momento de desarrollo embrionario. La expresión de citoqueratinas en numerosos epitelios es diferente en tejidos normales si la comparamos con los tejidos tumorales, lo que es un criterio diagnóstico efectivo con el uso de los anticuerpos anti-citoqueratina apropiados. Las denominadas ácidas se engloban en el tipo I, y las básicas en el tipo II.

Filamentos de Desmina

Están formados por la proteína desmina (52 Kd). Comparten localización con los miofilamentos finos y gruesos en el músculo liso, aunque su función no tiene relación con la contracción, sino con la inter-conexión. También se encuentran en los miofibroblastos y en el músculo estriado. En este último, los filamentos de desmina son los encargados de unir los miofilamentos y rodear las líneas Z para que puedan quedar al mismo nivel, así como anexionar el retículo sarcoplasmático y los túbulos T al sarcómero. Su principal función es la estructural, tanto en músculo liso como en estriado. Tienen 10 nm de diámetro.

Filamentos de Vimentina

Están constituidos por la proteína vimentina (de 53 Kd). Se encuentran en células mesenquimales, pero no exclusivamente aquí, también en células epiteliales, células de Schwann o células de la glía. Su configuración espacial es parecida a la de las citoqueratinas, teniendo un núcleo como centro agregativo. Suelen aparecer asociadas a las fibras de desmina, teniendo ambas la proporción más relevante dentro de los filamentos intermedios. Tienen 10 nm de diámetro.

Filamentos de Periferina

Están formados por una proteína similar a la vimentina (también de 57 Kd), denominada periferina. Se encuentran en las neuronas cuyos axones se extienden más allá del sistema nervioso central, como las de los ganglios raquídeos, simpáticos y parasimpáticos, las neuronas sensoriales y las motoras del asta anterior de la médula espinal y de algunos núcleos motores de los nervios craneales, es decir, en el sistema nervioso periférico. Es un polipéptido de 57 Kd parecido a la vimentina, con 10 nm de diámetro.

Láminas nucleares

Están constituidas por tres tipos de polipéptidos (de 74, 72 y 62 Kd), dando lugar a las láminas A, B y C, respectivamente. Forman dímeros de laminina que se juntan a su vez para dar lugar a redes trabeculares. A diferencia del resto de filamentos intermedios, las láminas se disponen en forma de malla o red, mientras que los otros lo hacen en configuración de haz. Son importantes en la organización nuclear y cromatínica.

La familia multigénica de este tipo de filamentos está formada por más de sesenta componentes, que se pueden subdividir en seis categorías concordando con su homología de secuencia, su estructura génica y sus propiedades de ensamblaje; la quinta categoría tiene sus propias particularidades. Los tipos I-IV incluyen filamentos intermedios citoplásmicos, mientras que el tipo V genera filamentos nucleares. Siguiendo estos criterios se establece la siguiente clasificación de filamentos intermedios:

- TIPO I: Incluye las citoqueratinas ácidas. Son un grupo de proteínas que forman el citoesqueleto de los filamentos intermedios en las células epiteliales de vertebrados, así como de anejos cutáneos (pelo y uñas). Su peso molecular está entre 40-60 Kd. Tienen un punto isoelectrico menor a 5.7, es ácido. Dentro de este grupo quedan englobadas las citoqueratinas 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 23 y 24.

- TIPO II: Al contrario que las anteriores, aquí están las citoqueratinas básicas. Son diferentes a las de tipo I en características de índole bioquímica, inmune, funcional (en cuanto a capacidad de formación de filamentos) y según su homología de secuencia. Su peso molecular es mayor que las de tipo I, entre 50-70 Kd, aunque las citoqueratinas 10, 12 y 13 también poseen un Pm un superior a 50 Kd. Su punto isoeléctrico es superior a 6 por lo que es básico. Estarían englobadas las citoqueratinas 1, 2, 3, 4, 5, 6a, 6b, 6c, 7, 8, 76, 77, 78, 79 y 80.

- TIPO III: Es un grupo heterogéneo e incluye a los filamentos de vimentina, desmina y gliofilamentos.

- TIPO IV: Engloba los neurofilamentos y la α -internexina. Esta última se encuentra en el sistema nervioso central (médula espinal y nervio óptico), y tiene un peso molecular de 57-150 Kd.

- TIPO V: Aquí entran las láminas nucleares.

- TIPO VI: Incluye la proteína nestina que se encuentra en las células pluripotentes de los neuroepitelios, concretamente en la cresta neural, así como en el músculo estriado. Está implicada en el crecimiento axonal en grosor. Su Pm es de 66 Kd. También estarían incluidas la sinemina, la paranemina y la tanabina.

Tabla VIII. Filamentos intermedios

Tipo	Peso Molecular (Kd)	Diámetro (nm)	Tipos celulares ppales.
Neurofilamentos	65, 105 y 135	10	Neuronas
Gliofilamentos	55	8	Astrocitos
Citoqueratinas	40-70	8	Células epiteliales
Fil. de Desmina	52	10	Células musculares
Fil. de Vimentina	53	10	Céls. mesenquimales
Fil. de Periferina	57	10	Sistema Nerv. Periférico
Lám. nucleares	62, 72 y 74	redes	Todos

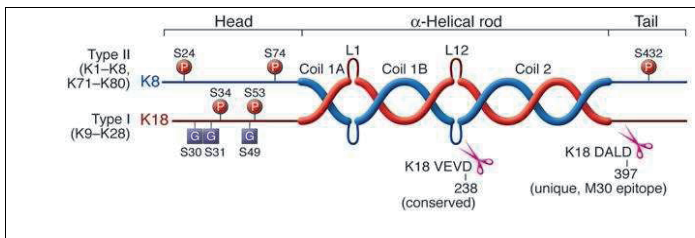


Figura 2. Estructura las queratinas de tipos I y II (Omary et al, 2009)

Los grupos que nos interesan para este estudio son los tipo I y II, en los que se encuentran las citoqueratinas, proteínas responsables de la formación de los filamentos intermedios de células epiteliales. Diversos rasgos distinguen las citoqueratinas de otros filamentos intermedios, su expresión preferente en células epiteliales y su estructura, pues son heteropolímeros obligados no covalentes que incluyen al menos una queratina del grupo I y otra del grupo II.

Las queratinas expresadas principalmente en epitelios simples son llamadas SEK's (Queratinas de Epitelios Simples) y aquí se engloban la 7, 8, 18, 19, 20, 23 y 24. Además, estas SEK's también se pueden encontrar en tejidos con epitelio estratificado (por ejemplo las citoqueratinas 7 y 19 en el epitelio vesical) o en otros tejidos como el muscular (queratinas 8 y 19). En la glándula mamaria podemos encontrar distintas SEK's.

Tabla IX. Localización de las SEK's en tejido mamario

	DISTRIBUCIÓN DE SEK's									
TEJIDO NORMAL	X	5	X	7	8	14	15	17	18	19
TEJIDO NEOPLÁSICO	4	5	6	7	8	14	X	17	18	19

La principal función de las SEK's es servir como protectores celulares evitando en cierta medida la apoptosis y proporcionando una integridad mecánica fundamental.

Las citoqueratinas en general proveen una estabilidad citoplásmica básica, esto se debe a su gran flexibilidad que puede resistir grandes deformaciones si las comparamos con otras proteínas citoesqueléticas, unido a su habilidad para poder estirarse hasta tres veces su longitud original antes de fragmentarse. Su existencia está relacionada con la localización y la función de orgánulos celulares; la rotura de

éstos (como el aparato de Golgi o las mitocondrias) se vincula con la apoptosis y es un factor crítico en desórdenes patogénicos. Las queratinas (en concreto las SEK's) inducen cambios en la apoptosis, modulan la síntesis proteica, contribuyen a la polaridad epitelial y regulan las interacciones con un incremento de la selección de proteínas asociadas (IFAP).

La generación de ratones transgénicos y silenciados para las SEK's ("SEK knockout") son esenciales para obtener información de la función citoqueratínica *in vivo* y son muy útiles para la identificación de enfermedades relacionadas con mutaciones en los genes que codifican para las mismas, siendo diferentes los cambios si los comparamos en otras queratinas. Hasta el momento las únicas SEK's que no han sido descritas en modelos de experimentación animal son las citoqueratinas 7 y 23. Los porcentajes de solubilidad o el nivel de expresión son variables útiles para diferenciar entre SEK's y otras queratinas.

Aparte de las enumeradas, se han encontrado isoformas de las mismas, lo que haría indicar la existencia de mayor número de queratinas y una expresión propia para cada tejido o tipo celular, lo que conlleva cierta especificidad funcional. Por ejemplo, en el genoma de ratón se conocen isoformas de la citoqueratina 6 como la 6a, 6b, 6c o 6hf; cuando los genes que codifican para las isoformas 6a y 6b se encuentran silenciados, el desarrollo de la glándula mamaria parece normal, pero en realidad la pérdida de la expresión de estas dos isoformas citoqueratínicas lleva a un incremento en el número de células positivas a receptores para esteroides, a una hiperproliferación y a un descenso proliferativo subsecuente a la exposición a dichos esteroides.

Dependiendo del momento de desarrollo hay predominancia de unas citoqueratinas sobre otras e incluso una interconversión; las primeras que se expresan son la 8, la 18 y la 19, pero hay un cambio durante el desarrollo del feto, por un lado los epitelios simples presentan las variedades 7, 8, 18 y 19, los epitelios

más complejos (como el pseudoestratificado o el de transición, por ejemplo) expresan la 4, 5, 6, 8, 13, 14, 15, 17, 18 y 20 y, por último la epidermis y algunos epitelios (como el de la boca o la vagina), la 1, 2, 5, 9, 10, 11 y 16.

Debido a su gran diversidad estructural, en número y su expresión específica tisular, las citoqueratinas sirven como marcadores histológicos tumorales importantes y una gran significación durante la embriogénesis y en condiciones de estrés: en la embriogénesis la expresión de las citoqueratinas de tipo II precede a las de tipo I, aunque los componentes de ambas familias se requieren para formar los filamentos intermedios; las condiciones de estrés afectan en mayor medida, no sólo en cuanto al perfil o patrón de expresión citoqueratínico, sino también al nivel expresivo e induce cambios posteriores en el ensamblaje.

Los filamentos de citoqueratina de tipo I y los de tipo II están siempre en número equivalente formando dímeros y tetrámeros. Es decir, son heteropolímeros obligados que requieren la presencia simultánea de polipéptidos de tipo I y de tipo II para la formación de filamentos. El ensamblaje de las proteínas para dar lugar filamentos es un proceso complejo, se sabe que inicialmente se constituyen los dímeros y luego, a raíz de éstos, los tetrámeros.

Expresión de las citoqueratinas en la glándula mamaria

Las citoqueratinas están presentes en células epiteliales; cada tipo epitelial presenta un patrón genuino de las mismas. La asociación entre las diferentes proteínas da lugar a heterodímeros y tetrámeros, pero dicha unión no es al azar, las combinaciones están determinadas. Así por ejemplo, las citoqueratinas 1 y 2 se asocian con la 10; la 5 con la 14; la 6 con la 16 y la 17, y la 8 se une a la 18. De ahí el término de pares de citoqueratinas, acuñado en los años ochenta.

Además, estos pares de proteínas se localizan en regiones concretas, como las citoqueratinas 8 y 18, que suelen presentarse en epitelios simples, o la 5 y la 14, propias de la capa basal de epitelios estratificados. En el epitelio estratificado, a medida que las células migran desde la capa basal hasta la superficie, sufren procesos de diferenciación cesando la expresión de estas citoqueratinas y comenzando a sintetizarse otros pares específicos, es decir, hay un cambio de expresión debido a la diferente situación, tipo celular y condiciones fisiopatológicas.

De hecho en la epidermis se sintetiza la citoqueratina 1 y la 10, en la córnea la 3 y la 12, en el esófago la 4 y la 13, en la epidermis palmo-plantar, la 9 y en los brotes terminales, la 6. El endotelio corneal, formado por una capa única de células planas hexagonales, también expresa el complejo 8/18. Regiones de epidermis especializada muestran por tanto distintos patrones de diferenciación celular y expresan citoqueratinas específicas.

Un ejemplo de cambios derivados de condiciones fisiopatológicas tiene lugar cuando hay fenómenos hiperproliferativos, sintetizándose en la epidermis citoqueratina 6 y 16 en lugar de las normales 1 y 10. Estudios en mama de ratona en distintas fases de desarrollo resaltan que cada tipo epitelial mamario posee un patrón característico de citoqueratinas que no sufre variación alguna dependiendo de la etapa. Como complemento está la proteína vimentina, que se expresa en el estroma glandular. En los distintos tipos de células epiteliales mamarias se expresan a la vez citoqueratinas típicas de epitelios simples y estratificados.

El desarrollo de la glándula mamaria de ratón ha sido analizado inmunohistoquímicamente usando anticuerpos monoclonales para células de superficie y proteínas de la membrana basal, así como un anticuerpo policlonal antiqueratínico, identificando tres tipos celulares básicos: basal, mioepitelial y epitelial (este último dividido en luminal tipo I, luminal tipo II y alveolar).

Se pueden establecer analogías con otras especies como la humana, donde se han identificado las citoqueratinas 5, 7, 8, 14, 15, 16, 17, 18 y 19. Mediante Western blotting e inmunofluorescencia se detecta la citoqueratina 14 en células mioepiteliales y en tejido mamario lactante y en reposo, mientras que hay negatividad para la citoqueratina 7 (que aparece débilmente teñida con anticuerpos específicos en las capas basales).

Las citoqueratinas 8, 14, 15, 16, 18 y 19 se encuentran en células epiteliales luminales.

En los conductos terminales, las células luminales expresan también las citoqueratinas 14, 15, 16 y 19.

La citoqueratina 13 no está presente en el epitelio glandular humano.

Los resultados de estos estudios indican que los patrones de expresión de los filamentos intermedios están alterados en la glándula mamaria humana lactante, y que esto puede reflejarse en toda la glándula funcional.

En rata dividimos la glándula en cuatro tipos celulares: luminales tubulares, luminales alveolares, mioepiteliales y basales. Encontraríamos una serie de citoqueratinas entre las que reseñamos la 5, 7, 8, 14, 18 y 19.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño experimental

Animales de experimentación

Para realizar el estudio de los posibles cambios que se producen en el citoesqueleto mamario a lo largo de la lactación, utilizamos como animal de estudio al ratón (*Mus musculus*). Comenzó a ser utilizado como animal de investigación en el S. XIX. El espécimen de ratón utilizado fue el NMRI. Es un ratón albino "Swiss" ideal para investigaciones en los campos de la Fisiología, Histología, Oncología, Farmacología y Toxicología. Se mantuvo como línea pura hasta los años cincuenta y fue muy usado en el Naval Medical Research Institute (de ahí vienen las siglas). Posteriormente se introdujo en el Instituto Central del Laboratorio de Reproducción Animal de Hannover por Charles River Laboratories en 1979 y desde entonces su cría y exportación se localiza en Francia y Alemania. Es idóneo por su prolificidad y adaptabilidad a diferentes ambientes. Suelen vivir entre 2-3 años y su peso medio es de 20-40 gramos. Sus constantes fisiológicas son: frecuencia cardíaca de 500-600 ppm, frecuencia respiratoria de 100-250 rpm y temperatura rectal de 37,5°C. La ratona es una hembra poliéstrica con un ciclo estral de 4-5 días, un celo de 14 horas y un periodo gestacional de 19-21 días. En el experimento se utilizaron cuarenta hembras gestantes de ratón (ocho por cada periodo de estudio), que fueron separadas en el momento del parto y mantenidas con sus crías permitiendo así el inicio de la lactación. Estuvieron controladas con ciclos de iluminación-oscuridad de 24 horas a 22-23 °C. La comida y la bebida no fueron restringidas; de media ingirieron unos 5 gramos de pienso y 5 mililitros de agua al día. El alojamiento no presentaba un área inferior a 180 cm², con una altura mínima en la jaula de 12 cm.

Momento de sacrificio de los animales

Los sacrificios se realizaron mediante desnucamiento cervical, los animales eran pesados y se procedía a la necropsia. Las glándulas mamarias fueron seccionadas en sentido perpendicular a la piel para observar, localizar y describir posibles lesiones. Se realizó el proceso en cuatro fases: 1^a, 2^a, 3^a y 4^a semanas de lactación, y en la 5^a semana postparto (semana postdestete).

Procedimientos inmunohistoquímicos

Las glándulas mamarias fueron extirpadas, congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -70 °C. Las secciones de tejido fueron cortadas con el criostato a 5 µm de espesor. Aproximadamente se congelaron fragmentos de 5 mm³. Estos fragmentos se introdujeron en tubos "ependorf" a los que se había añadido previamente una base de "Tissue Tek O.C.T. Compound" (*Sakura, Finetek*), y se congelaron en nitrógeno líquido. La fijación se llevó a cabo en formol tamponado al 10% durante 24 horas. Fueron incluidos en parafina y seccionados a 4 µm. Las secciones se fijaron con hematoxilina y eosina.

Anticuerpos Mono y Policlonales Anti-Queratina

La expresión de los subtipos de queratina fue evaluada mediante seis anticuerpos diferentes en secciones congeladas usando inmunofluorescencia indirecta. Se utilizaron antisueros procedentes de ratón, conejo y rata (*Jackson ImmunoResearch Company*). El de rata se unió con FITC y el de ratón y conejo reaccionó con el Texas Red. La vimentina se estudió usando el kit comercial de streptavidin-biotina de *Santa Cruz Immunolabs*, con tejidos incluidos en parafina. Las secciones teñidas se catalogaron como resultado negativo (-) [arreactivas], débilmente reactivas (+), moderadas (++) y con gran reactividad (+++).

RESULTADOS

Técnicas utilizadas

Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Mediante esta técnica de elevada sensibilidad, los anticuerpos específicos no marcados se unen en una primera etapa al antígeno para, en un segundo paso, incorporarse al anticuerpo marcado con el fluorocromo. El antisuero no se marca, sino que se emplea con un fluorocromo en una etapa posterior.

Fijamos los cortes histológicos con acetona y efectuamos tres lavados con PBS 1X, pasando de -20 °C a temperatura ambiente, y dejando incubar en suero positivo (a los anticuerpos secundarios) a 37 °C, 20 minutos.

Tras este tiempo se retira el suero y se vuelven a incubar durante 2 horas en la misma cámara los cortes en PBS más BSA (1%) y azida sódica (0.02%), donde estará presente el anticuerpo primario (de ratón, rata o conejo).

Finalmente procedemos al lavado con PBS y la última incubación con los anticuerpos secundarios unidos a los fluorocromos FITC y Texas Red, durante una hora en iguales condiciones de temperatura, tras lo cual se vuelve a lavar con PBS y preparar el cubreobjetos con Mowiol (*Calbiochem*). De este modo los anticuerpos deben reconocer las citoqueratinas 1, 5, 6, 7, 8, 13, 14, 16 y 19.

La 1 se vería en el epitelio estratificado queratinizado; la 5 y la 14 en el estrato basal de epitelios estratificados; la 7, 8 y 19, en epitelios simples, y la 13 en epitelios estratificados no queratinizados.

Doble Inmunofluorescencia Indirecta (dIFI) y ABC-Peroxidasa

Su finalidad fue reconocer las citoqueratinas 5, 6 y 8. Se diferencia de la técnica anterior en que las dos últimas incubaciones implicaron el uso de mezclas de anticuerpos primarios (TROMA 1, anti-CK5 y anti-CK6) y secundarios con el fluorocromo (FITC y Texas Red). De esta forma se ve la expresión de estas tres citoqueratinas en sus respectivos tipos celulares.

La ABC-Peroxidasa posee una elevada sensibilidad. El sitio de unión de la avidina libre sirve para que el anticuerpo biotinilado se fije, dejando el complejo avidina-biotina-peroxidasa completo. Como anticuerpo primario utilizamos Monoclonal Anti-Vimentin (*Sigma Aldrich*) derivado del hibridoma LN-6 y como anticuerpo secundario, Antimouse biotinilado (*Santa Cruz Biotechnology Incorporated*).

Estudio de los filamentos intermedios durante la lactación

El objetivo experimental fue el análisis del patrón de expresión citoqueratínico en glándulas mamarias de ratona en los periodos de lactación y de reposo. Para ello se llevó a cabo una técnica de inmunofluorescencia. Se presentan los resultados para las diferentes citoqueratinas dependiendo de la etapa de estudio.

El patrón de expresión para la citoqueratina 5 es similar en glándulas funcionales y no funcionales en la primera semana en lactación. La mayoría de las tinciones se encontraron en las células mioepiteliales y basales, mientras que las células de los conductos secretores y las alveolares fueron claramente negativas. Las células mioepiteliales reaccionaron con intensidad al anti-CK5 durante la etapa en lactación, pudiendo observarse las proyecciones citoplásmicas características de este tipo celular rodeando al alveolo mamario. Las células basales de los conductos excretores dieron positivo a la reacción en glándulas mamarias lactantes y en reposo.

En algunos casos la citoqueratina 7 se detectó en tejidos procedentes de glándulas mamarias en lactación; las células positivas eran tanto las que revisten los conductos excretores como las alveolares.

El número de positivos fue reducido, pero siempre presentaron una reactividad alta con una fuerte fluorescencia. Con respecto a las glándulas de la quinta semana, se encontraron respuestas positivas aisladas en el alveolo, aunque en dos de los animales analizados esta queratina fue hallada en todas las células ductales.

Tabla X. Denominación de las citoqueratinas (Aquino y Jurado, 2008)

TIPO I		TIPO II	
Denom. previa	Denom. actual	Denom. previa	Denom. actual
K9	K9	K1	K1
K10	K10	K2	K2
K11	K11	K3	K3
K12	K12	K4	K4
K13	K13	K5	K5
K14	K14	K6a	K6a
K15	K15	K6b	K6b
K16	K16	K6e/h	K6c
K17	K17	K7	K7
K18	K18	K8	K8
K19	K19	K2p	K76
K20	K20	K1b	K77
K23	K23	K5b	K78
K24	K24	K6I	K79
		Kb20	K80

El anticuerpo LP1K que reconoce a la citoqueratina 7 aparece en células aisladas durante los cuatro primeros periodos de estudio, la positividad corresponde tanto a células alveolares como a células que revisten los conductos excretores; el número de células positivas resultó muy escaso, pero la intensidad de su fluorescencia fue grande. Los resultados obtenidos con LP2K (que es específico para la citoqueratina 19) fueron más difusos y solamente unas pocas células lumbales tubulares dieron positivo en alguno de los individuos.

La citoqueratina 8 fue reconocida mediante el anticuerpo monoclonal TROMA 1. Se observó una clara respuesta, con una distribución homogénea tanto en células secretoras alveolares como las que revisten los conductos en la glándula mamaria durante la segunda, tercera y cuarta semana en lactación. En tejidos mamarios obtenidos durante la quinta etapa, hubo una intensa reactividad en células de la luz de los conductos, y en ocasiones en algunas células alveolares en regresión. Sin embargo no se encontraron células en tejidos procedentes de glándulas mamarias en la primera semana de lactación.

Las citoqueratinas 6 y 16 fueron identificadas con una fluorescencia débil en las células mamarias en reposo, no en las que estaban en lactación. Para la citoqueratina 16 (revelada con LLO25), algunas células resultaron positivas durante la primera y tercera semanas en lactación, pero fue un hecho aislado, pues no estuvo presente en todas las muestras analizadas y hubo heterogeneidad dependiendo de los individuos. Estas citoqueratinas son características de células suprabasales y de queratinocitos en proliferación, y han sido encontradas también en algunos epitelios estratificados.

Respecto a la citoqueratina 14, los anticuerpos anti-CK14 produjeron una reacción moderada en células acinares y ductales. La capa basal de las células epiteliales de los conductos resultó ser negativa en los cuatro periodos en lactación en todas las muestras analizadas. No hubo diferencias significativas al utilizar el método de

tinción LLOO1. En las muestras procedentes de la quinta semana no se localizaron células con reacción positiva clara.

Las células mioepiteliales expresan las citoqueratinas 5 y 14. La citoqueratina 8 no se pudo detectar en los individuos durante la primera semana de lactación, lo que implica que la existencia de cambios morfológicos en el inicio de la lactación origina modificaciones en el citoesqueleto celular llevando, en este caso, a un solapamiento de esta citoqueratina, característica de epitelios simples glandulares. Del mismo modo las citoqueratinas 1 y 13 resultaron negativas en todas las fases del estudio.

Tabla XI. Expresión de las citoqueratinas en varios tipos celulares

TIPO CELULAR				
Semanas postparto	Células mioepiteliales	Células alveolares de los conductos	Células luminales	Células basales
1	CK14, CK5	CK7	CK7	CK5
2	CK14, CK7	CK7 y CK8	CK7 y CK5	CK5
3	CK14, CK5	CK7 y CK8	CK7 y CK8	CK5
4	CK14, CK5	CK7 y CK8	CK7 y CK8	CK5
5	X	CK7, CK8, CK16 y CK6	CK7 y CK8	CK5

Paralelamente al curso de las fases se pudo apreciar un incremento del número de células positivas a la citoqueratina 7, llegándose a detectar en todas las células de los conductos excretores. Esto recalca lo señalado antes, aunque no puedan detectarse diferencias entre células de los conductos excretores en un estudio convencional, hay cambios en el citoesqueleto celular que se muestran mediante inmunohistoquímica, sin obviar el momento funcional en el que se encuentre.

DISCUSIÓN

La caracterización inmunofenotípica de la tipología celular en la glándula mamaria provee información en cuanto a los procesos de diferenciación, la dinámica e interacción celular y el efecto de las hormonas en el desarrollo de la propia glándula (Fernández y Russo, 2010). En secciones histológicas, la glándula mamaria lactante de ratona está principalmente constituida por tejido adiposo con conductos y lóbulos alveolares dispersos. Un gran nódulo linfático está presente en el medio de la almohadilla mamaria. El desarrollo lóbulo-alveolar alcanza su máximo punto durante la preñez y la lactación. Tras éstas, decrece; la glándula mamaria en reposo está compuesta fundamentalmente por conductos y pequeñas ramas terminales. La interpretación de los resultados indicaría que el compartimento de la luz de los conductos está compuesto por una gran variabilidad celular, la diferenciación se logra mediante cambios evidentes en la coloración con los elementos empleados, el grado de marcaje de casi todas las citoqueratinas del estudio depende de la fase de desarrollo de la glándula mamaria y la naturaleza de las citoqueratinas expresadas en células de la luz y basales está conservada a través de todo el árbol mamario, aunque los niveles de expresión dependen de su localización específica. La cantidad de marcadores de diferenciación expresados por las células de la luz de los conductos y las basales (Painter, Clayton y Herbert, 2010) fue incrementando paulatinamente durante la morfogénesis mamaria. La pubertad está asociada con el comienzo de la expresión de la citoqueratina 5. Es interesante saber que las células basales adquieren su fenotipo contráctil (por la expresión del complejo SMA) antes que se establezca el patrón citoqueratínico.

Las células mioepiteliales de la ratona durante la pubertad y posteriormente pueden diferenciarse de las células de la luz de los conductos ya que expresarían la citoqueratina 5, un rasgo ya identificado en humanos y en ratones usando anticuerpos menos específicos y secciones histológicas congeladas. En nuestro caso, las células mioepiteliales de todas las glándulas en lactación expresaron la citoqueratina 14 (típica de epitelios estratificados), pero con el anticuerpo usado no se detectó su expresión en las células basales de los conductos en ninguna de las etapas. Estos resultados concuerdan con otros anteriores (Bässler y Katzer, 1992; Sapino *et al*, 1993). Por el contrario, Lichtner (1991) encontró en glándula mamaria de rata esta citoqueratina tanto en células mioepiteliales como en células basales, en glándulas lactantes y en reposo. Las citoqueratinas 14 y 6 son detectadas en el tejido epitelial de ratón, principalmente en casos de neoplasia. La 6 está confinada a una pequeña cantidad de células epiteliales mamarias asociadas con el crecimiento de los brotes terminales y del epitelio de la luz de los conductos, mientras que la 14 aparece expresada especialmente en células mioepiteliales (Zhang *et al*, 2003). Estudios posteriores que se reflejan más adelante señalan otros resultados en la citoqueratina 6.

Con respecto a la citoqueratina 5, los resultados obtenidos muestran que esta proteína es expresada en células mioepiteliales y basales de los conductos. Es característica de epitelios estratificados. Esto también se refleja en otros estudios de ratón, rata, felinos y humanos (Ivanyi *et al*, 1992). Se observa que las células mioepiteliales expresan la citoqueratina 5 en la fase lactante. Las proyecciones citoplasmáticas típicas de estas células (llamadas comúnmente "basket cells") se reflejaron perfectamente. No debemos olvidar que las citoqueratinas 5 y 14 se suelen encontrar en la capa basal de la epidermis y en anejos organizándose formando una pareja en forma de grandes filamentos (Lee y Coulombe, 2009). El marcaje de estas dos citoqueratinas, consideradas marcadores celulares, se ha

detectado en células de los grandes conductos en humanos. Smith (1990) también identificó la citoqueratina 14 marcada, aunque su patrón era más importante al principio de la preñez, y estaba limitado en las glándulas mamarias prepuberales y puberales. La expresión de estas dos citoqueratinas debe ser asincrónica durante el desarrollo mamario, detectándose la citoqueratina 5 como muy pronto a los 21 días de edad; esto puede ser debido a que esta última no sólo se una a la 14, sino a otras citoqueratinas mediante proteínas (Matsumoto, 2003).

La citoqueratina 8 apareció clara y uniformemente distribuida en la glándula mamaria durante la segunda, tercera y cuarta semanas de lactación, y la quinta postparto. Las células positivas a la reacción fueron las alveolares y las de la luz de los conductos. Sin embargo no se reconocieron en la primera semana de lactación. Esto contrasta con resultados publicados anteriormente donde la expresión de esta citoqueratina ha sido detectada en ratones y ratas; las razones de esta discrepancia pueden deberse a la técnica empleada. Podría ser que en la primera semana de lactación, durante los cambios fisiológicos controlados por el estado hormonal, hubiera alteraciones en la estructura celular que supusieran una inaccesibilidad de esta proteína al anticuerpo utilizado en este estudio. Es típica de epitelios simples. Las células de la luz de los túbulos han sido igualmente positivas en otros estudios a la citoqueratina 8 (unida a la 18 mediante las proteínas de unión ya mencionadas). Igualmente en el caso de humana (Michalczyk *et al*, 2001). Asimismo unas pocas células suprabasales podrían parecer positivas a la reacción, pero no de una forma clara, lo que se debe a su localización y tamaño, así como su diferenciación según la etapa de estudio (Ersahin *et al*, 2010). El complejo de citoqueratinas 8/18 es considerado un marcador específico de células de la luz de los conductos y de epitelios simples de humana, algo que puede diferir si lo comparamos con un estudio en ratones, debido principalmente a los anticuerpos que reconocen proteínas diferentes. El patrón de expresión de las citoqueratinas 8 y

18 puede ser actualmente monitorizado mediante ingeniería transgénica en ratones a partir de una proteína verde fluorescente bajo el control del promotor de una de dichas citoqueratinas (Renou *et al*, 2003); este es un hecho fundamental para el avance en el estudio de estos filamentos (Jirsova *et al*, 2007).

La citoqueratina 7 fue positiva en todas las etapas de estudio; los resultados obtenidos para la citoqueratina 19 no fueron claros con el anticuerpo utilizado. Esto coincide con estudios efectuados en glándula mamaria de humana por investigadores anteriores, aunque éstos sí obtuvieron resultados claramente positivos para la citoqueratina 19 en células alveolares y de la luz de los conductos (Dairkee y Heid, 1993; Su, Morgan y Lane, 1996). Se puede deber a que el anticuerpo empleado no fuera el adecuado y diera falsos resultados. La positividad se mostró en algunas células dispersas de la luz de los conductos correspondientes a la primera semana de lactación y a la quinta postparto. Un incremento en el número de células positivas para la citoqueratina 7 se observa a medida que la lactación progresaba, hasta que se completa en todas las células de los conductos mamarios. Significa que aunque no se encuentren diferencias a nivel histológico sí existen cambios en el citoesqueleto celular que pueden ser debidos a la distinta capacidad funcional celular, según la variabilidad del patrón citoesquelético. La citoqueratina 7 es considerada uno de los marcadores más importantes de diferenciación ductal, siendo expresada en carcinomas mamarios. Junto con la queratina 20 es muy útil en el diagnóstico de cánceres de difícil detección por estar poco diferenciados.

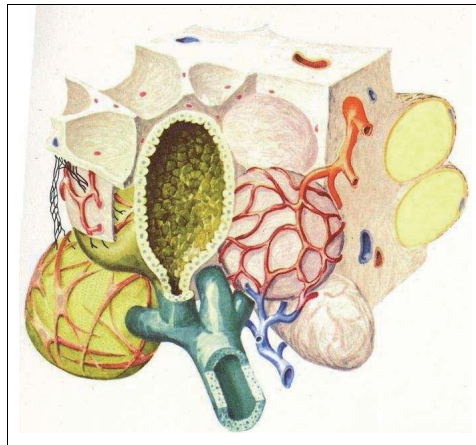
Los resultados obtenidos para las citoqueratinas 6 y 16 se restringieron a algunas células en reposo, así como a un pequeño número de células catalogadas como positivas durante la primera y tercera semana en lactación. Anteriormente ya se había dicho que la citoqueratina 16 es un claro constituyente de las células de la luz de los conductos en glándulas mamarias humanas (Pellegrino *et al*, 1988). Por otro

lado Lichtner (1991), tras usar inmunofluorescencia indirecta en tejido mamario procedente de rata, no obtiene resultados positivos para la citoqueratina 6; en glándula mamaria de ratona hay controversia por la negatividad en su detección y la positividad en los brotes terminales (Sapino *et al*, 1993). El estudio que aquí se relata revela algunas células alveolares de los conductos positivas para la citoqueratina 6 en glándula mamaria de ratona tras usar inmunofluorescencia indirecta. Asimismo esta citoqueratina no fue detectada en ninguna etapa del desarrollo de la glándula mamaria en el experimento de Mikaelian (2006), contrastando con las observaciones efectuadas por Smith (1990), que la identificó mediante inmunofluorescencia en brotes terminales y en algunas células de los conductos intralobulares, y que indujo a otros a considerarla como marcador (Li *et al*, 2003; Welm *et al*, 2003) de células pluripotentes mamarias. De todas formas, la citoqueratina 6 está asociada con la proliferación epidérmica y es expresada en casos de hiperplasia epidérmica, en conjuntiva, mucosa oral y en algunas lesiones mamarias tumorales (Li *et al*, 2000). La citoqueratina 13 no se expresa en la glándula mamaria de ratona, en cambio sí se ha identificado en el caso de humana. Algo parecido ocurre con las citoqueratinas 1 y 10 (y otras proteínas como la filagrina o la involucrina), que sólo se expresarían en procesos carcinogénicos, en concreto de modelos de ratones transgénicos y en neoplasias de glándula mamaria humana (Tsuda *et al*, 1997).

La expresión de vimentina se concentró en fibroblastos y en adipocitos, que son componentes estromáticos. Sin embargo no hubo positividad para células mioepiteliales, en contraposición con otros resultados previos de algunos investigadores (Lichtner *et al*, 1991). Los resultados que se reseñan suponen una expresión bastante precisa de citoqueratinas durante el ciclo mamario de los ratones y pone sobre la palestra cómo estos cambios se deben al estado fisiológico de la glándula mamaria.

CONCLUSIONES

- Destacar la importancia de los tumores mamarios referenciados en personal militar y civil en hospitales militares españoles en la última década.
- La expresión de las citoqueratinas varía con cambios fisiológicos celulares y en células tumorales. Hay particularidades en la expresión de dichas proteínas entre las distintas células de un mismo individuo.
- La comparación entre diferentes especies indica ciertas similitudes en el patrón de expresión de las citoqueratinas.



"Fragmento de un lobulillo, a mayor aumento. Sección de un alveolo y de un conducto excretor. Encima de las vesículas adenoideas, células mioepiteliales fusiformes y ramificadas, membrana basal, retículo capilar y fibras nerviosas, que llegan hasta el epitelio glandular y penetran entre el mismo. A la derecha, dos secciones correspondientes a células adiposas" (Hippéli, 1967).

BIBLIOGRAFÍA (principales referencias consultadas)

- Albers K, Fuchs E. The molecular biology of intermediate filament proteins. *International Review of Cytology* 1992; 134: 243-279.
- Anbazhagan R, Osin PP, Bartkova J, Nathan B, Lane EB, Gusterson BA. The development of epithelial phenotypes in the human fetal and infant breast. *The Journal of Pathology* 1998; 184(2): 197-206.
- Aquino CG, Jurado F. Citoqueratinas en dermatología. *Revista Mexicana de Dermatología* 2008; 52(6): 254-262.
- Asch HL, Asch BB. Expression of keratins and other cytoskeletal proteins in mouse mammary epithelium during the normal developmental cycle and primary culture. *Developmental Biology* 1985; 107: 470-482.
- Bartkova J, Lukas J, Strauss M, Bartek J. Cell cycle-related variation and tissue-restricted expression of human cyclin D1 protein. *The Journal of Pathology* 1994; 172(3): 237-245.
- Bässler R, Katzer B. Histopathology of myoepithelial (basocellular) hyperplasias in adenosis and epitheliosis of the breast demonstrated by the reactivity of CKs and S100 protein. *Virchows Archives A, Pathological Anatomy and Histology* 1992; 421: 435-442.
- Beckmann MW, Picard F, An HX, Van Roeyen CR, Dominik SI, Mosny DS *et al.* Clinical impact of detection of loss of heterozygosity of BRCA1 and BRCA2 markers in sporadic breast cancer. *British Journal of Cancer* 1996; 73: 1220-1226.
- Bennett CN, Green JE. Genomic analyses as a guide to target identification and preclinical testing of mouse models of breast cancer. *Toxicologic Pathology* 2010; 38(1): 88-95.

- Berg JW, Hutter RV. Breast cancer. *Cancer* 1995; 75: 257-269.
- Carrillo N, Ortuño D, Gudiño G. Expresión de las isoformas α y β del mRNA del GFAP durante la diferenciación del PNM de BO de rata adulta hacia el fenotipo de aldainoglia y en glía envolvente purificada. *Avances en la Investigación Científica en el CUCBA*, 2006; 267-273.
- Coulombe PA, Omary MB. 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Current Opinion in Cell Biology* 2002; 14(1): 110-122.
- Cunningham JG, Klein BG. *Fisiología Veterinaria*. Madrid: Editorial Elsevier, 2009.
- Dairkee S, Heid HW. Cytokeratin profile of immunomagnetically separated epithelial subsets of the human mammary gland. *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 1993; 29(5): 427-432.
- Eastwood J, Offutt C, Menon K, Keel M, Hrnicrova P, Novotny MV et al. Identification of markers for nipple epidermis: changes in expression during pregnancy and lactation. *Differentiation* 2007; 75(1): 75-83.
- Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochemical Research* 2000; 25(9-10): 1439-1451.
- Ersahin C, Chivukula M, Bhargava R, Dabbs DJ. Basal-like subtype breast cancers in women older than 40 years of age. *International Journal of Surgical Pathology* 2010; 18(1): 42-47.
- Fernández Y, Cueva J, García A, Ramos M, de Juan A, Calvo L et al. Novel therapeutic approaches to the treatment of metastatic breast cancer. *Cancer Treatment Reviews* 2010; 36(1): 33-42.
- Fernández SV, Russo J. Estrogen and xenoestrogens in breast cancer. *Toxicologic Pathology* 2010; 38(1): 110-122.

- Frank S. Dysregulation of mitochondrial fussion and fission: an emerging concept in neurodegeneration. *Acta Neuropathologica* 2006; 111(2): 93-100.
- Fuchs E, Cleveland DW. A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science* 1998; 279(5350): 514-519.
- Galán JA, Castro J, Tabanera A, Martí L. Reactividad inmunohistoquímica frente a los antígenos humanos p53, c-erbB-2, Ki-67 y ER de los tumores mamarios de la perra. *Sanidad Militar* 2007; 63(3): 182-191.
- García MJ, Pérez C, Bravo A, Ferreras MC, García RA, Espinosa J *et al.* Spontaneous mouse mammary tumours: incidence and cytokeratin expression. *Research in Veterinary Science* 1997; 63: 85-89.
- Grimm SL, Bu W, Longley MA, Roop DR, Li Y, Rosen JM. Keratin 6 is not essential for mammary gland development. *Breast Cancer Research* 2006; 8(3): R29.
- Hippéli R. *Atlas de Histología Plástica*. Barcelona: Editorial Fher, 1967.
- Ivanyi D, Minke JM, Hageman C, Groeneveld E, Van Doornewaard G. Patterns of expression of feline cytokeratins in healthy epithelia and mammary carcinoma cells. *American Journal of Veterinary Research* 1992; 53(3): 304-314.
- Jirsova K, Merjava S, Martincova R, Gwilliam R, Ebenezer ND, Liskova P *et al.* Immunohistochemical characterization of cytokeratins in the abnormal corneal endothelium of posterior polymorphous corneal dystrophy patients. *Experimental Eye Research* 2007; 84(4): 680-686.
- Jorgensen KJ, Zahl PH, Gotzsche PC. Breast cancer mortality in organised mammography screening in Denmark: comparative study. *The British Medical Journal* 2010; 340: c1241.
- Kim S, Wong P, Coulombe PA. A keratin cytoskeletal protein regulates protein synthesis and epithelial cell growth. *Nature* 2006; 441: 362-365.

- Lee MK, Cleveland DW. Neurofilament function and dysfunction: involvement in axonal growth and neuronal disease. *Current Opinion in Cell Biology* 1994; 6(1): 34-40.
- Lee CH, Coulombe PA. Self-organization of keratin intermediate filaments into cross-linked networks. *The Journal of Cell Biology* 2009; 186(3): 409-421.
- Li Y, Welm B, Podsypanina K, Huang S, Chamorro M, Zhang X *et al.* Evidence that transgenes encoding components of the Wnt signaling pathway preferentially induce mammary cancers from progenitor cells. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences USA* 2003; 100(26): 15853-15858.
- Lichtner RB, Julian JA, North SM, Glasser SR, Nicolson GL. Coexpression of cytokeratins characteristic for myoepithelial and luminal cell lineages in rat 13762NF mammary adenocarcinoma tumors and their spontaneous metastases. *Cancer Research* 1991; 51: 5943-5950.
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. *Biología Celular y Molecular*. Madrid: Editorial Médica-Panamericana, 2002.
- Lu H, Hesse M, Peters B, Magin TM. Type II keratins precede type I during early embryonic development. *European Journal of Cell Biology* 2005; 84(8): 709-718.
- Marceau N, Schutte B, Gilbert S, Loranger A, Henfling M, Broers J *et al.* Dual roles of intermediate filaments in apoptosis. *Experimental Cell Research* 2007; 313: 2265-2281.
- Martínez-Pérez JM, Martínez-Rodríguez JM. El citoesqueleto celular en la glándula mamaria y su aplicación diagnóstica. *Sanidad Militar* 2011; 67(2): 92-97.
- Martínez-Pérez JM, Martínez-Rodríguez JM. Revisión sobre filamentos intermedios, con especial referencia a las citoqueratinas. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* 2010; 4(2): 1-11.

- Martínez-Pérez JM, Mauriz-Turrado I, Mínguez-González O, Valérdiz-Casasola S, Martínez-Rodríguez JM. Cytokeratin expression in mouse mammary gland during first five weeks post-partum. *Slovenian Veterinary Research* 2014; 51(4): 161-170.
- Matsumoto T. Targeted expression of c-Src in epidermal basal cells leads to enhanced skin tumor promotion, malignant progression, and metastasis. *Cancer Research* 2003; 63: 4819-4828.
- Michalczyk A, Brown RW, Collins JP, Ackland ML. Lactation affects expression of intermediate filaments in human breast epithelium. *Differentiation* 2001; 67(1-2): 41-49.
- Mikaelian I, Hovick M, Silva KA, Burzenski LM, Shultz LD, Ackert-Bicknell CL *et al.* Expression of terminal differentiation proteins defines stages of mouse mammary gland development. *Veterinary Pathology* 2006; 43(1): 36-49.
- Mínguez O, Bravo AM, Aller Ó, Martínez JM. Citoqueratinas en tumores de mama provocados por DMBA. *Revista de Experimentación Animal* 1995; 6(1): 70.
- Mínguez O, Martínez JM. Análisis histopatológico y molecular de los tumores mamarios de ratón provocados por DMBA. Efecto sobre el H-Ras y el BRCA1. *Actas de la VIII Reunión de la Sociedad Española de Anatomía Patológica Veterinaria, Córdoba, 1996.*
- Ministerio de Defensa. *Anuario Estadístico Militar*. Publicaciones de la Secretaría General Técnica, 2000-2016.
- Nithya J, Tilak P, Vidya P, Anil P, Sreenivasan K, Kumary T. A cytocompatible poly (N-isopropylacrylamide-coglycidylmethacrylate) coated surface as new substrate for corneal tissue engineering. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* 2010; 52: 58-74.

- Omary MB, Ku NO, Strnad P, Hanada S. Toward unraveling the complexity of simple epithelial keratins in human disease. *The Journal of Clinical Investigation* 2009; 119(7): 1794-1805.
- Painter JT, Clayton NP, Herbert RA. Useful immunohistochemical markers of tumor differentiation. *Toxicologic Pathology* 2010; 38(1): 131-141.
- Paramio JM, Jorcano JL. Beyond structure: do intermediate filaments modulate cell signaling?. *BioEssays* 2002; 24(9): 836-844.
- Rabanal RM, Else RW. Immunohistochemical localization of cytokeratin and vimentin intermediate filament proteins in canine mammary tumours. *Research in Veterinary Science* 1994; 56: 225-233.
- Renou JP, Bierie B, Miyoshi K, Cui Y, Djiane J, Reichenstein M *et al.* Identification of genes differentially expressed in mouse mammary epithelium transformed by an activated beta-catenin. *Oncogene* 2003; 22: 4594-4610.
- Russo J, Russo IH. Experimentally induced mammary tumors in rats. *Breast Cancer Research and Treatment* 1996; 39(1): 7-20.
- Sapino A, Macri L, Gugliotta P, Pacchioni D, Liu YJ, Medina D *et al.* Immunophenotypic properties and estrogen dependency of budding cells structures in the developing mouse mammary gland. *Differentiation* 1993; 55: 13-18.
- Squartini F, Pingitore R. Tumors of the mammary gland. En: Turusov VS, Mohr U (eds). *Pathology of tumors in laboratory animals*. Lyon: IARC, 1994.
- Strelkov SV, Herrmann H, Geisler N, Wedig T, Zimbelmann N, Aebi U *et al.* Conserved segments 1A and 2B of the intermediate filament dimer: atomic structures and role in filament assembly. *The EMBO Journal* 2002; 21: 1255-1266.

- Su L, Morgan PR, Lane EB. Expression of cytokeratin messenger RNA versus protein in the normal mammary gland and in breast cancer. *Human Pathology* 1996; 27(8): 800-806.
- Tsuda H, Sakamaki C, Fukutomi T, Hirohashi S. Squamoid features and expression of involucrin in primary breast carcinoma associated with high histological grade, tumour cell necrosis and recurrence sites. *British Journal of Cancer* 1997; 75(10): 1519-1524.
- Wagner OI, Rammensee S, Korde N, Wen Q, Leterrier JF, Janmey PA. Softness, strength and self-repair in intermediate filament networks. *Experimental Cell Research* 2007; 313(10): 2228-2235.
- Welm B, Behbod F, Goodell MA, Rosen JM. Isolation and characterization of functional mammary gland stem cells. *Cell Proliferation* 2003; 36(1): 17-32.
- Zhang RR, Man YG, Vang R, Saenger JS, Barner R, Wheeler DT *et al.* A subset of morphologically distinct mammary myo-epithelial cells lack corresponding immunophenotypic markers. *Breast Cancer Research* 2003; 5: R151-R156.

**More
Books!** 



yes
I want morebooks!

Buy your books fast and straightforward online - at one of the world's fastest growing online book stores! Environmentally sound due to Print-on-Demand technologies.

Buy your books online at
www.get-morebooks.com

¡Compre sus libros rápido y directo en internet, en una de las librerías en línea con mayor crecimiento en el mundo! Producción que protege el medio ambiente a través de las tecnologías de impresión bajo demanda.

Compre sus libros online en
www.morebooks.es

OmniScriptum Marketing DEU GmbH
Bahnhofstr. 28
D - 66111 Saarbrücken
Telefax: +49 681 93 81 567-9

info@omniscrptum.com
www.omniscrptum.com

OMNIScriptum 

