



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

Rol del LXR en el epitelio mamario murino durante la lactancia

Tesis para optar al título de doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área
Química Biológica

LIC. DIEGO YAIR GRINMAN

Directora de Tesis: Dra. Adali Pecci

Consejera de Estudios: Dra. Edith Kordon

Lugar de trabajo: Departamento de Química Biológica; Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias-CONICET (IFIByNE), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, 2017

Fecha de defensa: 05/04/2017

AGRADECIMIENTOS

De ninguna manera pretendo en este apartado poder expresar la inmensa gratitud que tengo hacia las personas que directa o indirectamente tuvieron un impacto en mí para que pudiera realizar esta tesis, y saliera vivo de esta empresa. Sólo esbozaré unas palabras que espero, al menos, alcancen “para cubrir los viáticos”.

Gracias **Adali**. Sobre todo, por confiar en mí. Por bancarte mis caprichos y sobresaltos. Por entenderme, enseñarme y apoyarme. Siempre respetaste mis tiempos y mis puntos de vista. Sos una de las científicas más ajetreadas que conozco y aun así siempre (pero siempre) estuviste disponible para escucharme, aconsejarme, discutir de ciencia y resolver mis problemas (y los de casi todxs). Te debo mucho de lo que soy como científico y como persona. Gracias.

Gracias **Edith** por ayudarme e interiorizarte en mi trabajo y en mi vida académica. Por tus innumerables aportes a este trabajo, por contribuir a mi interés por la fisiología y por abrirme un lugar en tus proyectos futuros.

Gracias **Martincito**, es un gran honor el que tengo de tenerte como amigo y compañero de trabajo. La vida de laboratorio hubiera sido tanto más difícil sin vos. Gracias por tu ayuda en los momentos más duros.

Leo y Andres, gracias por su paciencia y “sabiduría”, su ayuda y sus consejos. Los primeros tiempos de un estudiante/becario en un laboratorio son muy difíciles pero, afortunadamente, estuvieron uds. de una manera u otra dándome una mano.

Gracias a todos mis compañerxs **Pecci's y Kordon's y Marquitos's** actuales y pasados. Sé que soy difícil, gracias por soportarme, aguantarme,

enseñarme y ayudarme. A Luciana y a Flopy en particular que me aguantaron en los momentos de histeria.

Gracias a mis compañerxs del IFIByNE, **Coso's, ARK's, ODU's**...son un grupo de gente excepcional.

Gracias a **Omar, Anabella y Alberto**, de ustedes sigo aprendiendo todos los días.

Gracias a mis compañerxs técnicxs y administrativos, a **Pau**, a **Dani**, a **Pepe, Mariela, Hernan** y en particular a **Lira y Amaranta**. Mi trabajo dependía del suyo y lo dieron todo para que salga bien, se quedaron fuera de hora, trabajaron en asuetos, consiguieron reactivos e implementos para ayudarme en esta tesis. Se pasaron.

Gracias a **Valeria y a Marta** por su aporte invaluable a este trabajo.

Gracias al Departamento de Química Biológica, a mi querida Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, a la Universidad de Buenos Aires. Gracias al CONICET por solventar mi doctorado, espero que cada vez más gente pueda decir lo mismo.

Gracias a todxs mis amigos por entenderme y bancarse mis ausencias.

A mis **suegros**, mi familia no biológica, gracias por toda la ayuda que nos dieron y nos siguen dando. En estos últimos meses se pasaron.

A mis **hermanos**, que de una forma u otra siempre estuvieron acompañándome.

A mis **Viejos**. Nunca fue tan literal el decir "gracias por todo", "sin uds. jamás hubiera llegado hasta acá". Esta vez yo estoy orgulloso de uds. por haberme alentado a "hacer lo que me gusta" y entender que mis aspiraciones no iban de la mano de un traje y una corbata. Gracias por ayudarme, por

preocuparse y por entenderme. Si la paciencia que uds tienen por mí se transformara en materia, tendría dimensiones terráneas.

Gracias a vos mi **loquita**. En este tiempo descubrí todo lo que necesito de vos para funcionar bien en la vida. Descubrí que necesito tu pragmatismo. Tu capacidad para tomar decisiones y llevarlas a cabo segundos después. Tu orden y prolijidad; tu despreocupación y desconexión. La picada con cerveza en los días duros, que me obligues a trabajar cuando estoy distraído, que me ayudes a tomar decisiones. Descubrí que necesito tu energía, tu apoyo, tu confianza, tu sonrisa, tus abrazos, tus besos...Al igual que la tuya, esta tesis la hicimos los dos. No lo hubiese podido lograr sin vos. Somos un equipo, y con vos sale lo mejor de mí. Gracias por dárme todo.

A mis viejos...

A Yani...

ÍNDICE

1	ABREVIATURAS	1
2	RESUMEN	3
3	ABSTRACT	7
4	INTRODUCCIÓN	11
4.1	LA GLÁNDULA MAMARIA	11
4.1.1	Desarrollo de la glándula mamaria	11
4.1.2	Anatomía funcional de la glándula mamaria	14
4.1.3	Células epiteliales alveolares lactantes (MECs)	15
4.2	LA LECHE	16
4.2.1	Biosíntesis y transporte de lípidos en la glándula mamaria	19
4.3	REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DURANTE LA LACTANCIA ..	26
4.3.1	LXR	29
4.3.2	LXR Y GLÁNDULA MAMARIA	34
5	HIPÓTESIS	37
6	OBJETIVO GENERAL	37
7	OBJETIVOS PARTICULARES	37
8	MATERIALES Y MÉTODOS	39
8.1	REACTIVOS UTILIZADOS	39
8.2	PLÁSMIDOS UTILIZADOS	40
8.3	PREPARACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES	40
8.4	AMPLIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS - TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES	41
8.5	MAXI-PREPARACIÓN DE PLÁSMIDOS	41
8.6	CULTIVO CELULAR	42
8.7	TRANSFECCIONES TRANSITORIAS	43
8.8	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LUCIFERASA Y DE β - GALACTOSIDASA	43
8.9	DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS HC11	44
8.10	ANÁLISIS DE FORMACIÓN DE GOTAS LIPIDICAS CITOPASMÁTICAS (CLDs)	45

8.11	ANÁLISIS DE PROTEÍNAS – PREPARACIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS Y <i>WESTERN BLOT</i>	46
8.12	OBTENCIÓN DE LISADOS TOTALES DE GLÁNDULAS MAMARIAS	50
8.13	OBTENCIÓN DE FRACCIONES ENRIQUECIDAS EN CÉLULAS EPITELIALES MAMARIAS (MECs)	50
8.14	ESTUDIO DE ACTIVIDAD DE RECEPTORES NUCLEARES EN MECS	52
8.15	EXTRACCIÓN DE LECHE	53
8.16	EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS	54
8.17	OBTENCIÓN DE LOS ESTERES METÍLICOS (FAME).....	55
8.18	SAPONIFICACIÓN PARA OBTENER LOS LIPIDOS NEUTROS (ESTEROLES)	55
8.19	PREPARACIÓN DE LOS DERIVADOS DE COLESTEROL	56
8.20	CONDICIONES CG-EM.....	56
8.20.1	Condiciones para los FAME	56
8.20.2	Condiciones para el colesterol.....	57
8.21	INMUNOFUORESCENCIA.....	57
8.22	PREPARACIÓN DE ARN TOTAL.....	58
8.23	TRANSCRIPCIÓN REVERSA Y PCR EN TIEMPO REAL.....	59
8.24	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	62
9	RESULTADOS	65
9.1	ACTIVIDAD DE LOS LXRs EN CULTIVOS CELULARES	65
9.1.1	Determinación de la acción de GW3965.....	65
9.1.2	Estudio de la actividad de los LXRs en células epiteliales mamarias murinas (HC11)	66
9.1.3	Actividad biológica de CMP1 y CMP2.....	72
9.1.4	Influencia de la activación de los LXRs en la formación de CLDs	78
9.2	ACTIVIDAD DE LXR IN VIVO.....	80
9.2.1	Perfil de expresión de LXR α y LXR β en los diferentes estadios de desarrollo de la Glándula mamaria	80
9.3	ACCIÓN DEL LXR SOBRE LA COMPOSICIÓN DE LÍPIDOS DE LA LECHE 87	
9.4	ACTIVIDAD DEL LXR EN MECS.....	91
10	DISCUSIÓN	95
10.1	EXPRESIÓN DE LOS LXRS EN EL EPITELIO MAMARIO MURINO	96
10.2	EXPRESIÓN DE PPAR γ EN EL EPITELIO MAMARIO MURINO	98

10.3	REGULACIÓN DEL COLESTEROL DE LA LECHE	100
10.4	REGULACIÓN DE LOS NIVELES DE ÁCIDOS GRASOS EN LA LECHE .	103
10.5	LOS COMPUESTOS 1 Y 2	105
10.6	ACERCA DE LOS MODELOS UTILIZADOS PARA EVALUAR EL ROL DE LXR EN LACTANCIA.....	106
11	RESUMEN DE RESULTADOS	109
12	CONCLUSIONES FINALES	111
13	BIBLIOGRAFÍA	113

1 ABREVIATURAS

TEB: Botón terminal

Prl: Prolactina

P: Progesterona

MEC: Célula epitelial alveolar mamaria

MFG: Glóbulo de grasa de la leche

WAP: Proteína ácida del suero

CLD: Gotas lipídicas citoplasmáticas

PLIN: Perilipina

ADPH: Adipofilina

TG: Triglicéridos

EC: Ésteres de colesterol

CL: Colesterol libre

RE: Retículo endoplasmático

DGAT: Acil-coenzima A (acil-CoA):diacilglicerol aciltransferasa

ACAT: Acil-CoA:colesterol aciltransferasas

NEFA: Ácidos grasos no esterificados

VLDL: Lipoproteína de muy baja densidad

LDL: Lipoproteína de baja densidad

HDL: Lipoproteína de alta densidad

LPL: Lipoproteína lipasa

ACC: Acetil-CoA carboxilasa

FAS: Sintasa de ácidos grasos

HMG-CoA: 3-hidroxi-3metilglutaril-CoA (reductasa)

LDLr: Receptor de LDL

LRP: Proteína relacionada al receptor de LDL

SR-BI: Receptor *scavenger* clase B tipo I

ABC: *ATP Binding Cassette*

ApoA1: Apolipoproteína A-1

LXR: Receptores X de hígado

RXR: Receptor X de ácido retinoico

PPAR: Receptor activado por proliferadores de peroxisomas

SREBP: Proteínas de unión a elementos de respuesta a esteroides

LRE: Elementos de respuesta a LXRs

CYP7a1: Colesterol 7- α -hidroxilasa

IDOL: Degradador inducible del receptor de lipoproteína de baja densidad

SCD: Stearoil-CoA desaturasa

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

DMSO: Dimetil sulfóxido

CMP1/2: Compuesto 1/2

Rol del LXR en el epitelio mamario murino durante la lactancia

2 RESUMEN

En los mamíferos, la leche materna es el único alimento que contiene el balance preciso de nutrientes que asegura el correcto desarrollo de su progenie durante sus primeras etapas de vida. La leche tiene una composición variada y sus componentes cumplen distintas funciones en el neonato. En particular, los diversos lípidos presentes en la leche representan un sustrato metabólico de alta energía para las crías y son elementos esenciales de las membranas celulares y de la mielina, de vital importancia para la maduración del cerebro. Durante la lactancia la glándula mamaria murina está dotada de una enorme capacidad para sintetizar y secretar lípidos en forma de triglicéridos y ésteres de colesterol. Estudios recientes en ratones mostraron que el mayor cambio en la expresión génica durante la lactancia ocurre en genes involucrados en la biosíntesis y secreción de lípidos de la leche. Estos genes son blanco moleculares de varios receptores nucleares, los cuales cumplen funciones relacionadas con el metabolismo de glucosa y de lípidos. Específicamente, en los últimos años fue aumentando el interés por los receptores X de hígado (LXRs). El LXR es un factor de transcripción activado por metabolitos de colesterol. Pertenece a la familia de factores de transcripción activados por ligando que heterodimerizan con el receptor X retinoico (RXR). Los genes blanco de LXR codifican principalmente para proteínas involucradas en la síntesis *de novo* de triglicéridos y en el transporte de colesterol. Existen dos isoformas de los LXR, α y β , cuya

RESUMEN

función ha sido caracterizada en múltiples tejidos como hígado, macrófagos, adipocitos y epitelio intestinal, entre otros. En la glándula mamaria el patrón de expresión de estos receptores durante la lactancia aún no es claro, pero existe consenso en que podrían estar involucrados en la regulación de la proporción y composición lipídica de la leche.

En este trabajo de Tesis nos propusimos dilucidar la contribución del LXR en el epitelio mamario durante el proceso de lactancia, utilizando distintos modelos murinos *in vitro* e *in vivo* y una diversidad de abordajes experimentales haciendo foco en su acción sobre la producción de lípidos de la leche murina.

Los resultados mostraron que los LXRs se expresan en una línea celular de epitelio mamario murino y que dicha expresión aumenta conforme las células se diferencian, siendo mayores los niveles de la isoforma α que los de la β . Coincidentemente, demostramos que en fracciones de glándula mamaria enriquecidas en células epiteliales (MECs) la abundancia proteica del LXR α aumenta durante la lactancia respecto de la preñez y su localización subcelular principalmente nuclear en el día 10 de lactancia. Este aumento se acompaña de una disminución de la expresión de otro receptor nuclear involucrado en el control del metabolismo lipídico, el PPAR γ .

La activación farmacológica del LXR induce la expresión de genes relacionados con el transporte y síntesis de lípidos y provoca la acumulación de gotas lipídicas en el citoplasma de células HC11 diferenciadas. En la misma línea celular se caracterizó también la capacidad de nuevos ligandos sintéticos - análogos del ligando endógeno, ácido colestenoico- de modular la actividad de los LXRs.

Por último, el tratamiento *in vivo* con un agonista comercial del LXR provoca un aumento en el porcentaje de colesterol en la leche de ratones que se acompaña con la inducción de la expresión de un gen relevante en el control del metabolismo lipídico, el SREBP1c, sugiriendo un papel clave del LXR α en el

epitelio mamario como modulador del transporte de colesterol hacia la leche durante la lactancia.

Profundizar en los mecanismos de acción de este receptor permitirá diseñar terapias para madres lactantes con desbalances nutricionales. También, la capacidad de modular la composición lipídica de la leche podría resultar de gran interés en la industria láctea.

Palabras Clave: Glándula mamaria, células epiteliales mamarias, lactancia, leche, lípidos, LXR.

RESUMEN

Role of LXR in mouse mammary epithelium during lactation

3 ABSTRACT

In mammals, maternal milk is the unique food that contains the right balance of nutrients to ensure the correct growth and development of the offspring during the initial stage of their lives. Milk contains numerous components that play different roles in the neonate. Particularly, lipids represent a high energy metabolic substrate utilized for the efficient synthesis of ATP for many cellular processes. Lipids also comprise the essential components of cellular membranes as well as the source of lipid for myelin synthesis essential for the neonate brain maturation. During lactation, the mammary gland is endowed with an enormous capacity to synthesize and secrete lipid in the form of triglycerides and cholesterol esters. Recent studies have shown that the major expression changes occurring during lactation are related to genes encoding proteins involved in milk lipids biosynthesis and secretion. Most of the members of the nuclear receptor family controls glucose and lipid homeostasis. In the past few years, Liver X Receptors (LXRs) studies have raised special interest. LXRs are transcription factors activated by cholesterol metabolites whose target genes participate in the *de novo* triglycerides synthesis and cholesterol transport. They belong to the nuclear receptor family that regulates gene expression upon forming heterodimers with the retinoic acid X receptor (RXR). Two different LXR isoforms has been described: LXR α and LXR β and their roles were characterized in liver, adipocytes, macrophages and intestinal epithelium among others.

ABSTRACT

Although there is inconsistent information about LXR expression pattern in the mammary gland, there is consensus that LXR would be involved in milk lipid composition regulation.

By using different *in vitro* and *in vivo* murine models and a variety of experimental approaches, this work aims to elucidate the LXR contribution in mouse mammary lipid production.

Here, we report that LXRs are expressed in a mouse mammary epithelial cell line, its mRNA abundance increases throughout differentiation and LXR α 's expression levels are higher than those of LXR β . Correspondingly, we have found that LXR α protein levels increase through lactation compare to pregnancy in mammary epithelial enriched fractions (MECs) and this raise is associated with a drop in PPAR γ protein levels, another receptor from the same family involved in lipid metabolism. In addition, LXR α was detected mainly located in the nucleus of epithelial cells in mammary gland slices from lactation day 10 mice.

Upon pharmacological activation, LXRs upregulate the expression of several target genes involved in lipid synthesis and transport and also enhance cytoplasmic lipid droplets accumulation. We have also characterized the ability of two novel synthetic ligands –the endogenous ligand cholestenoic acid analogues- to modulate LXRs activity.

Finally, mice treated with a commercial LXR agonist exhibited increased milk cholesterol percentage during lactation accompanied with an increase in mRNA levels of SREBP1c, another master regulator of lipid metabolism, in MECs.

Overall, these results suggest that LXR α would be a relevant player in the mammary epithelium by regulating cholesterol transport into the milk. Deepen into the mechanisms of action of this receptor during lactation may provide relevant data on milk fat production that would allow future approaches and therapies for nursing mothers with nutritional imbalances. Also the potential

capability to modify milk lipid composition would be of great interest for dairy industry.

Key words: Mammary gland, Mammary epithelial Cells, lactation, milk, lipids, LXR.

ABSTRACT

4 INTRODUCCIÓN

4.1 LA GLÁNDULA MAMARIA

La aparición de la glándula mamaria es una de las novedades evolutivas de los mamíferos que le otorga el nombre a este grupo monofilético. Es una glándula exocrina de origen ectodérmico que continuamente sufre las modificaciones en su estructura y función que le permiten producir la leche, alimento que debe cumplir con los requerimientos nutricionales del neonato.

En el ratón hay 5 pares de mamas ubicadas ventro-lateralmente de forma subcutánea, que se extienden desde regiones torácicas hasta inguinales. La glándula mamaria murina comprende un parénquima que a lo largo del desarrollo invade unas estructuras grasas denominadas “almohadillas” compuestas de tejido adiposo (*fatpad* en inglés). Cada una de ellas cuenta con un pezón exterior -al que se conecta el conducto epitelial primario que permite la liberación de la leche durante la lactancia- y un nódulo linfático.

4.1.1 Desarrollo de la glándula mamaria

La mayor parte del desarrollo mamario es postnatal y comienza con el advenimiento de la pubertad. Antes del nacimiento del ratón se forma una estructura mamaria ductal rudimentaria que invade en la almohadilla grasa (Figura 1A). Esta estructura epitelial permanece quiescente hasta aproximadamente la 3er semana de vida, cuando aumentan los niveles circulantes de hormonas ováricas. En este momento ya se distinguen los denominados botones terminales de los conductos mamaros o TEBs (del inglés *terminal end buds*), que son estructuras con forma redondeada que penetran en la almohadilla dirigidas por una única capa de células apicales proliferando en el extremo del ducto (Figura 1B). Comienza entonces un

INTRODUCCIÓN

proceso de elongación ductal, que continúa hasta aproximadamente las 10-12 semanas de vida cuando los TEBs alcanzan el límite de la almohadilla (Figura 1C). Con el comienzo de los ciclos estrales, en la pubertad, se forman ramificaciones secundarias en los conductos y los brotes terminales se diferencian a estructuras llamadas brotes alveolares que se terminarán de diferenciar durante la preñez.

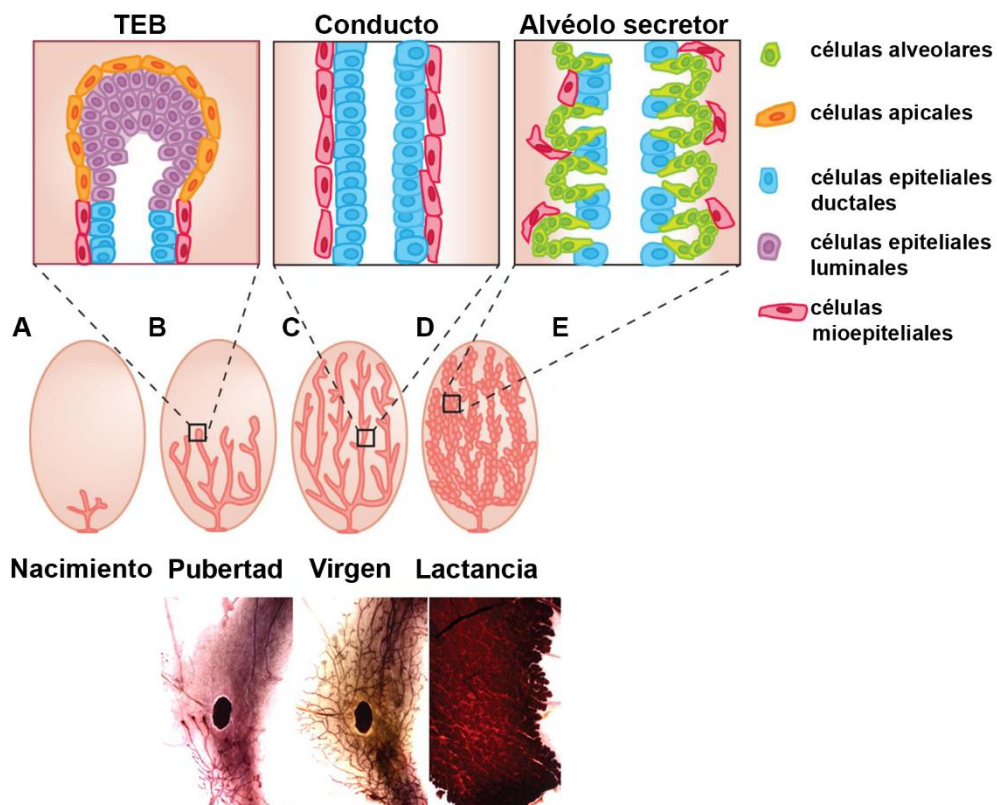


Figura 1. Desarrollo de la glándula mamaria murina. Arriba, ilustración esquemática de la glándula mamaria de ratón. Cada estadio del esquema se acompaña con su correspondiente preparado montado de glándulas enteras. En negro, el nódulo linfático. Ampliaciones: botón terminal (TEB), ducto y alvéolo secretor. A la derecha, la clave de las representaciones de las células. *Modificado de Andrechek et. al.¹ y de Inman et. al.².*

Para completar su diferenciación y prepararse para la lactancia la glándula mamaria debe sufrir numerosos cambios durante la preñez orquestada por las hormonas Prolactina (Prl) y Progesterona (P). A nivel

funcional la diferenciación de la glándula mamaria se divide en cuatro fases: una fase proliferativa al comienzo de la preñez, la diferenciación secretoria que comienza en la mitad de la preñez, la activación secretoria que ocurre alrededor o durante el parto y la lactancia ³. En la etapa inicial de la preñez, hay un notable incremento de ramificaciones ductales secundarias y terciarias y en la formación de más brotes alveolares. Esta fase se caracteriza por un gran aumento en la síntesis de ADN y proliferación celular ⁴. En la segunda fase, los brotes alveolares se expanden y forman unidades lóbulo-alveolares y luego se diferencian a estructuras pre-secretorias. A medida que las células epiteliales proliferan ocupando los espacios interductales, disminuye el espacio ocupado por el tejido adiposo intersticial, aumenta la vascularización y hacia la mitad de la preñez cada alvéolo está rodeado por una red de capilares ⁵. Para el final de la preñez, entre los días 17-18, los alvéolos ocupan la mayor parte de la almohadilla grasa y se encuentran completamente diferenciados con las células epiteliales alveolares conteniendo grandes gotas lipídicas ^{6,7}. La diferenciación secretoria, entendida como el comienzo de la producción continua de leche por el epitelio secretor, ocurre cuando caen los niveles circulantes de P entre los días 19-21. La producción de la leche parece estar inhibida por la acción de la P plasmática ⁸⁻¹¹. Se especula que si bien los niveles de Prl son máximos al final de la preñez, la P disminuiría los niveles del receptor de Prl en la glándula mamaria ^{12,13}. Luego del parto, morfológicamente se observa que las gotas lipídicas se reducen en tamaño y se encuentran en la superficie apical que da al lumen alveolar. El pico de máxima producción de leche ocurre al día 9 o 10 de la lactancia. En ese momento, histológicamente, la glándula se caracteriza por prominentes estructuras lumbinales y ductos; si bien aún se observan adipocitos, éstos son de tamaño considerablemente más pequeño reflejando una delipidación más que una disminución del número de células ¹⁴ (Figura 1D).

Las estructuras alveolares permanecen completamente desarrolladas y diferenciadas hasta que la hembra deja de amamantar a sus crías, y esto último ocurre aproximadamente a las 3 semanas post-parto ^{15,16}. Entonces, comienza el período de involución de la glándula, que

INTRODUCCIÓN

comprende un proceso de apoptosis masiva de las células epiteliales productoras de leche y un remodelado del tejido secretorio, estadio finamente regulado^{17,18}. En este proceso, que puede durar aproximadamente 2 semanas en completarse¹⁸, la glándula vuelve a un estadio similar al de una hembra virgen y está lista para comenzar otro ciclo de preñez, lactancia e involución (Figura 1E).

4.1.2 Anatomía funcional de la glándula mamaria

Como fue mencionado anteriormente, la glándula mamaria lactante está compuesta por una red de ductos formados por células epiteliales que desembocan en *clusters* lóbulo-alveolares (Figura 2). En estos sitios, que se expanden durante la lactancia, se forma y se secreta la leche. Una única capa de células epiteliales secretoras polarizadas rodea cada alvéolo en estos *clusters*. En esta Tesis me referiré a ellas como MECs por sus siglas en inglés *Mammary Epithelial Cells* (células epiteliales mamarias). A su vez, el alvéolo está rodeado por células mioepiteliales que al contraerse provocan la salida de la leche y un estroma de tejido conectivo vascularizado que contiene fibroblastos y adipocitos vacíos de lípidos. Inmediatamente luego del estímulo de succión de la cría, la oxitocina es liberada por la neurohipófisis como parte del reflejo neuroendócrino e induce la contracción de las células mioepiteliales mamarias provocando la eyección de la leche de los alvéolos y ductos.

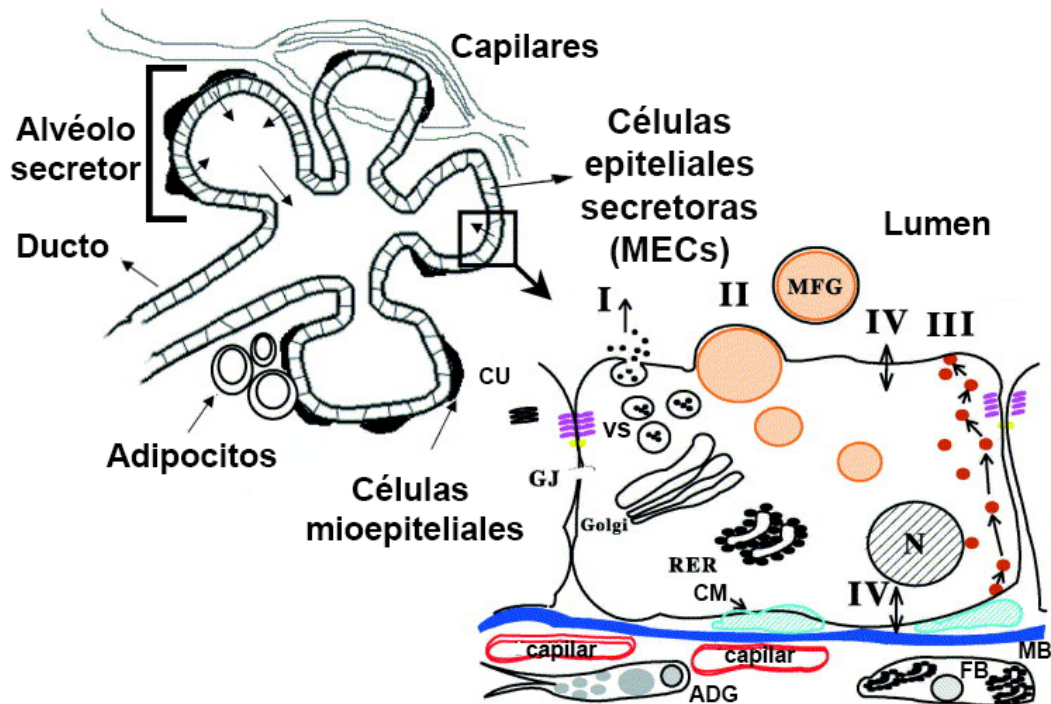


Figura 2. Diagrama del alvéolo mamario y célula epitelial alveolar (MEC) durante la lactancia. La leche es secretada por las MECs al lumen (flechas). El alvéolo está rodeado de una red de capilares muy desarrollada y un estroma compuesto de matriz extracelular, fibroblastos y adipocitos. El cuadro amplía una célula alveolar. En ella se señalan: I) la vía de exocitosis de proteínas (como β -Caseína), lactosa, calcio y otros componentes de la fase acuosa de la leche. II) secreción de grasa como glóbulos de grasa de la leche (MFGs) (ver sección 4.2). III) transcitosis de proteínas como inmunoglobulinas desde el espacio intersticial. IV) transporte de iones monovalentes, agua y glucosa a través de la membrana apical y basal de la célula. Abreviaturas: VS, vesícula secretoria; RER, retículo endoplasmático rugoso; MB, membrana basal; N, núcleo; FB, fibrocyto; ADG, adipocito delipidado; CU, complejo de unión (uniones estrechas y adherentes); GJ, *gap junction*; CM, célula mioepitelial. Modificado de J. Mcmanaman & M. Neville ¹⁹

4.1.3 Células epiteliales alveolares lactantes (MECs)

Durante la lactancia las células alveolares tienen un gran número de mitocondrias y un extenso retículo endoplasmático rugoso, características consistentes con su alta actividad secretoria. Además, el Golgi está bien desarrollado y, en la región apical de las células, se evidencian vesículas secretoras que contienen micelas de Caseína. Las células alveolares lactantes cuentan también con una gran capacidad para sintetizar lípidos y

INTRODUCCIÓN

un mecanismo único de secreción que resulta en la formación de grandes gotas lipídicas rodeadas de una membrana especializada (Figura 2; ver sección 4.2) ²⁰.

La región apical de las células epiteliales está físicamente unida por complejos de unión del tipo adherentes y estrechas cuya finalidad es evitar el pasaje paracelular de sustancias entre los compartimentos vascular y luminal durante la lactancia ^{21,22}. La cara basal de las células alveolares, por otro lado, está en contacto con las células mioepiteliales y con la membrana basal, separando el compartimento epitelial del estroma y el sistema vascular mamario. En conjunto, todos ellos forman barreras a la transferencia de sustancias desde la sangre o el estroma hacia la leche: (1) membranas endoteliales y/o estromales; (2) la membrana basal; (3) la lámina basal epitelial; (4) los complejos de unión paracelulares, (5) las membranas de Golgi y (6) las membranas apicales de las células epiteliales ¹⁹. En consecuencia, el epitelio secretor funciona como barrera altamente selectiva de las sustancias que serán secretadas a la leche.

4.2 LA LECHE

En los mamíferos, la leche materna constituye el único alimento que contiene un balance adecuado de nutrientes que garantiza el desarrollo y el crecimiento de las crías durante la etapa inicial de sus vidas. Si bien los componentes de la leche son similares entre las especies de mamíferos el contenido individual de cada uno de ellos, como por ejemplo los lípidos, es altamente variable a nivel inter- e intra- específico ²³. En todas las especies de mamíferos existen dos fases durante la lactancia: una fase calostrál en donde la leche contiene principalmente inmunoglobulinas y otras proteínas del sistema inmune ²⁴ y otra fase de secreción de leche madura caracterizada por su gran producción, que aporta los nutrientes necesarios para el crecimiento del neonato.

La leche madura contiene una gran variedad de proteínas (las diferentes Caseínas, α -Lactoalbúmina, la proteína WAP [*“whey acidic protein”*], Lactoferrina, Inmunoglobulina A, Seroalbúmina, entre otras), vitaminas, minerales, lactosa y lípidos ²⁵.

La mayor parte de los lípidos que serán secretados a la leche se acumulan en gotas lipídicas citoplasmáticas (CLDs por *cytoplasmic lipid droplets*) de las células epiteliales alveolares. Las CLDs se forman probablemente en todas las células eucariotas cumpliendo distintas funciones relacionadas con el metabolismo lipídico, tráfico, homeostasis de las membranas y síntesis de hormonas esteroideas ²⁶. Están formadas por un *core* de lípidos neutros que representan el 90-95% de su masa, rodeados por una monocapa de fosfolípidos y proteínas específicas de cada tipo celular que participan en su formación y estabilización. Por ejemplo, la proteína Perilipina (PLIN) se expresa únicamente en adipocitos y células esteroideogénicas mientras que la Adipofilina (ADPH) se expresa en múltiples tipos celulares incluyendo adipocitos y células epiteliales mamarias; ambas contribuyen a la formación de los CLDs ²⁷⁻²⁹.

El núcleo de CLDs está compuesto por triglicéridos (TGs) y ésteres de colesterol (EC). Su síntesis está catalizada por enzimas que residen en el retículo endoplasmático (RE) desde donde emergen las gotas lipídicas ³⁰. Las enzimas acil-coenzima A (acil-CoA):diacilglicerol aciltransferasas (DGAT) DGAT1 y DGAT2, catalizan el último paso en la síntesis de TGs, y las acil-CoA:colesterol aciltransferasas (ACAT), ACAT1 and ACAT2, generan ECs. Ambas isoformas de DGAT se expresan en el epitelio mamario, sin embargo DGAT1 parece ser la responsable de la síntesis de TGs en MECs ^{31,32}. Por otro lado se ha comprobado la actividad de la ACAT en microsomas de glándulas de ratones hembras preñadas y lactantes ^{33,34}.

Los TGs y EC recién formados se acumulan entre las membranas del RE, encerrados en CLDs ³⁵. Estas estructuras emergen del RE ³⁶ y luego se fusionan con otras CLDs y forman gotas de mayor tamaño que migran hacia la membrana apical, probablemente en un mecanismo dependiente de microtúbulos ³⁷ (Figura 3A). Allí, la membrana plasmática envuelve los

INTRODUCCIÓN

CLDs y salen hacia el lumen alveolar en forma de glóbulos de grasa (*milk fat globules*, MFGs).

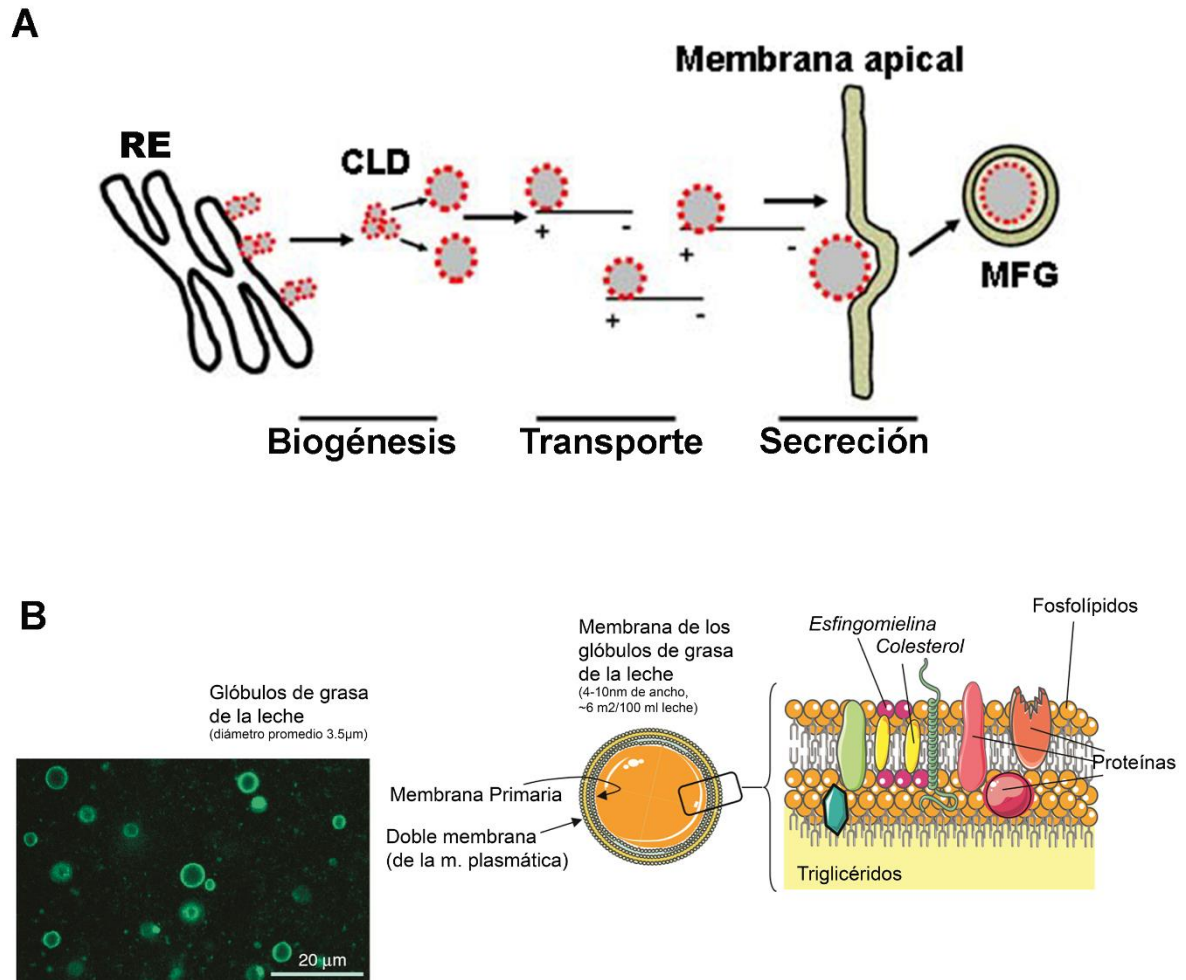


Figura 3. Mecanismo de secreción de glóbulos de grasa de la leche y su composición. La secreción de lípidos hacia la leche depende de distintos procesos que involucran la biogénesis, el transporte y secreción de los CLDs que se originan en el retículo endoplasmático. (A) TGs y EC se acumulan rodeados por proteínas y luego de formarse los CLDs son transportados por microtúbulos hacia la membrana apical, envueltos por ella y secretados como glóbulos de grasa de la leche (MFGs). (B) Visualización y estructura de los MFGs. *Modificado de Delplanque et. al.*³⁸.

Las MECs son el único tipo celular del organismo que utiliza este mecanismo de secreción activa de lípidos durante la lactancia y se diferencia de la clásica vía usada por hepatocitos y enterocitos²⁰. Los MFGs son estructuras de triple membrana que contienen en su interior esencialmente TGs que comprenden el 95-98% de los lípidos totales tanto en humanos, bovinos y roedores (Figura 3B). El resto lo completan los diacilgliceroles, ácidos grasos libres, fosfolípidos y EC cuya abundancia es variable³⁸⁻⁴⁰.

Si bien el contenido graso total de la leche varía según la especie y el momento de la lactancia, en promedio hay desde un 0% en la leche de rinocerontes, 4% en humanos y rumiantes, hasta un 30% en roedores. A modo ilustrativo, en los 800 ml promedio de leche diarios que secreta una mujer adulta hay 32 gr de grasa o alrededor de 6 kg de grasa en una lactancia exclusivamente materna típica de 6 meses, lo que representa el 10% del peso total de la madre⁴¹. La glándula mamaria de un ratón hembra lactante tiene un desafío aún mayor: los 5 ml de leche diarios contienen 30% de lípidos, 1 o 1,5 gr por día. Durante los 20 días de lactancia la hembra secreta 30 gr de grasa en la leche, lo que equivale a su peso completo. El desafío energético que conlleva la lactancia en ratones es significativo. Ese es uno de los motivos de elección del ratón como modelo para estudiar la regulación de síntesis y transporte de lípidos de la leche.

4.2.1 Biosíntesis y transporte de lípidos en la glándula mamaria

Los diversos componentes de la grasa de la leche pueden provenir de varias fuentes: de la ingesta inmediata, de la movilización desde depósitos de tejido adiposo e hígado o de la síntesis *de novo* de la propia glándula mamaria. La glándula mamaria es uno de los tres órganos en el cuerpo que más lípidos producen; los otros dos son el tejido adiposo y el hígado⁴². Más aún, gran parte de los primeros pasos de las vías de síntesis de ácidos grasos en mamíferos fueron esclarecidos utilizando tejido

INTRODUCCIÓN

mamario de roedores y rumiantes lactantes ⁴³. A continuación se detallan los principales pasos en la formación y transporte de los triglicéridos y el colesterol de la leche durante la lactancia.

4.2.1.1 Triglicéridos.

Los TGs son sintetizados en las células epiteliales mamarias a partir de la condensación de ácidos grasos y glicerol. Estos a su vez pueden ser sintetizados *de novo* en dichas células a partir de glucosa o provenir desde el plasma sanguíneo ^{23,44}. La esterificación de los ácidos grasos activados con el glicerol-3-fostato la catalizan una serie de enzimas en el retículo endoplasmático al igual que en la mayoría de tipos celulares, siendo el último paso catalizado por DGAT1 ⁴⁵.

Las propiedades de los TGs dependen de los ácidos grasos que los componen y de su estructura (i.e. la disposición de los ácidos grasos en la cadena de glicerol). Los TGs de la leche están compuestos por una variedad de ácidos grasos de cadena corta (<8 carbonos), media (C8-C14) y larga (>16 carbonos), saturados e insaturados. Se han detectado 170 especies distintas de TGs en la leche materna humana, de los cuales sólo 22 están presentes en concentraciones mayores al 1% del total ⁴⁶. Ellos están enriquecidos por combinaciones de ácido oleico (C18:1, ~30%), ácido palmítico (C16:0, ~20%), ácido linoleico (C18:2, ~15%), ácido mirístico (C14:0, ~7%), ácido esteárico (C18:0, ~6%) y un componente menor de ácidos grasos de cadena media (i.e. ácidos caprílico y caprílico), ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (i.e. ácido docosahexaenoico, eicosapentaenoico y araquidónico), ácido linoleico conjugado (principalmente cis-9, trans-11 C18:2) y ácidos grasos trans.

Los ácidos grasos de cadena larga (>16 carbonos) presentes en la leche provienen exclusivamente de ácidos grasos no esterificados (NEFA, por su sigla en inglés), que circulan en el plasma unidos a albúmina, o de triglicéridos presentes en partículas de quilomicrones y en lipoproteínas de muy baja densidad (*very low density lipoprotein*, VLDL); es por eso que se

los llama comúnmente ácidos grasos “preformados”⁴⁷. Los triglicéridos son hidrolizados en estas partículas a ácidos grasos y glicerol por la acción catalítica de la lipoproteína lipasa (LPL), cuyos niveles y actividad aumentan dramáticamente luego del parto⁴⁸. Luego son incorporados a las células alveolares. El mecanismo por el cual los ácidos grasos traspasan el endotelio y el espacio intersticial para llegar al epitelio no está del todo claro, pero probablemente involucre proteínas *carriers* y translocasas como CD36 y FATP/SLC27a⁴⁹.

Una de las características distintivas de la glándula mamaria de rumiantes, roedores y de humanos es su capacidad de sintetizar ácidos grasos saturados de cadena media, es decir de 6 a 14 carbonos^{50,51}. Los ácidos grasos de cadena media son sintetizados *de novo* exclusivamente por las células epiteliales mamarias. Las MECs contienen una enzima especial, la tioesterasa II, que termina la síntesis de los ácidos grasos luego de agregar 8 a 16 carbonos⁵¹. El primer paso y limitante en la síntesis de ácidos grasos en la glándula mamaria es la conversión de acetil-CoA a malonil-CoA catalizada por la enzima Acetil-CoA carboxilasa (ACC)⁵². La actividad de ACC es regulada tanto a nivel transcripcional como por fosforilación^{53,54}. Luego de la formación de malonil-CoA, la sintasa de ácidos grasos (FAS) cataliza una secuencia de siete reacciones, agregando en cada reacción dos unidades de carbono provenientes del malonil-CoA a la cadena de ácido graso en crecimiento⁵⁵ (Figura 4). A diferencia del hígado y el tejido adiposo, donde la terminación de la síntesis de ácidos grasos (de 16 átomos de carbono) es catalizada por la enzima tioesterasa I, parte integral de la FAS; en el citosol de las células epiteliales mamarias la terminación de la síntesis de ácidos grasos es detenida por la tioesterasa II después de que la cadena de ácido graso alcanza la longitud media de 8-14 carbonos

INTRODUCCIÓN

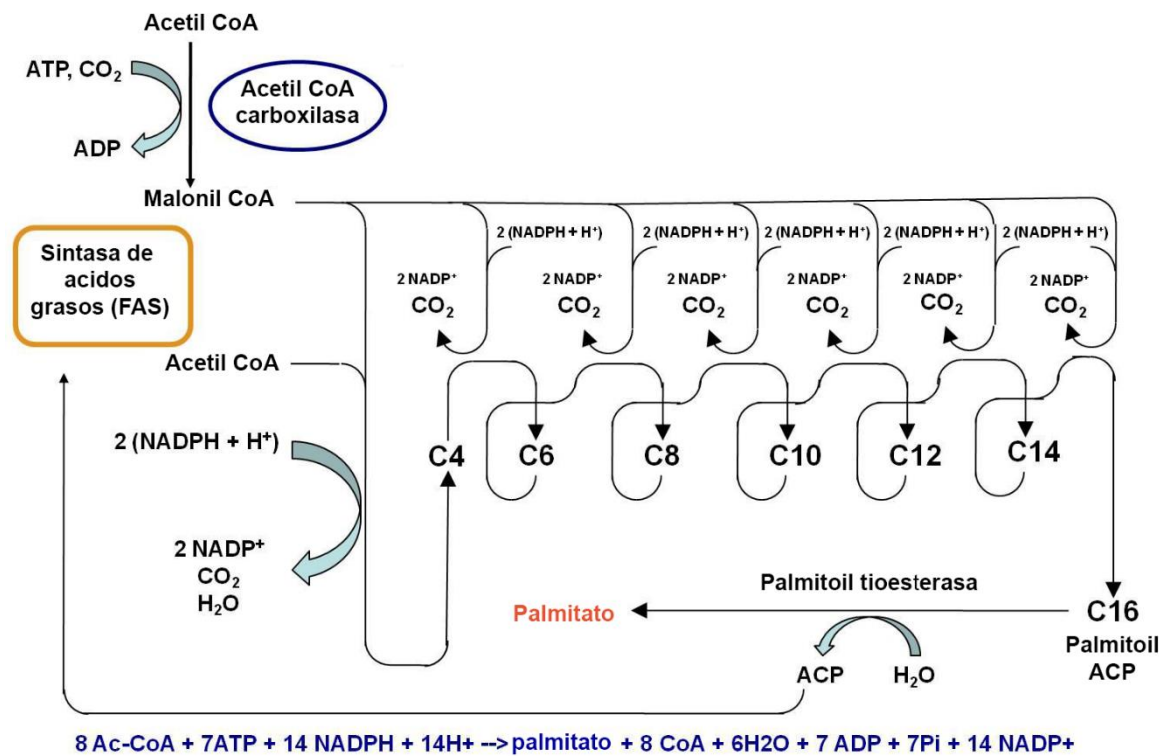


Figura 4. Síntesis de ácido palmítico por la sintasa de ácidos grasos (FAS). La Acetil-CoA carboxilasa (ACC) cataliza la formación de malonil CoA a partir de Acetil-CoA. Luego, la FAS, que es un complejo multienzimático, cataliza la condensación de Acetil-CoA y Malonil-CoA y la adición de una molécula de Malonil-CoA por vez hasta formar el Palmitoil-ACP, la cadena de 16 carbonos unida covalentemente a la ACP (proteína portadora de acilos). Por acción de la tioesterasa I se libera el ácido Palmítico (C16:0); sin embargo en las MECs la tioesterasa II además libera a los ácidos grasos de cadena media (C<16).

Mientras que la leche de rumiantes es rica en ácidos grasos de cadena corta (particularmente los ácidos butírico y hexanoico, 13-15%)⁵⁶, en la leche humana y de roedores éstos están subrepresentados. La leche de ratón contiene 15-40% de ácidos grasos de cadena media, 20-30% de C:16 (mezcla de preformados o sintetizados *de novo*) y 30-70% de ácidos grasos preformados con más de 16 carbonos⁵⁷. Dependiendo de la cepa y la dieta las $\Delta 9$ -desaturasas presentes en la glándula, que incorporan un doble enlace en el carbono 9, probablemente aumenta la proporción de 16:1 y 18:1, pero no afectan a los ácidos grasos de cadena media debido a su especificidad⁵⁸.

4.2.1.2 Colesterol

El colesterol constituye un componente estructural de las membranas biológicas y precursor de la síntesis de esteroides y derivados (i.e. hormonas esteroideas, vitamina D). Se acumula en dominios de membrana resistentes a detergentes llamados “balsas lipídicas” que juegan un rol crucial funcionando como plataforma de proteínas que participan en distintas vías de señalización, como vías involucradas en el crecimiento, supervivencia celular, entre otras ^{59,60}. Durante la embriogénesis y el desarrollo postnatal temprano, etapas de rápido crecimiento, desarrollo y maduración, la demanda de colesterol es muy elevada ⁶¹. Por lo tanto, la ingesta del colesterol contenido en la leche materna es importante ya que contribuye considerablemente a la colesterolemia en neonatos e infantes ⁶²⁻⁶⁴.

En el interior de las células epiteliales mamarias se constituye un *pool* intracelular de colesterol libre. A este *pool* lo determinan, por un lado, el colesterol sintetizado *de novo* en la propia glándula mamaria y por otro, el colesterol que proviene del suero.

Hay evidencias de que el colesterol se sintetiza *de novo* en la glándula durante la lactancia. Experimentos en rumiantes y en ratas utilizando colesterol radioactivo estimaron que un 20% del colesterol presente en la leche se sintetiza *de novo* en la glándula ^{65,66}. Consistentemente, varios trabajos mostraron que en el tejido mamario se expresa la enzima 3-hidroxi-3metilglutaril-CoA (HMG-CoA) reductasa, que cataliza el paso limitante en la síntesis *de novo* de colesterol a partir de acetato en la vía del mevalonato⁶⁷⁻⁶⁹.

Por otro lado, el colesterol que proviene del torrente sanguíneo viaja unido a lipoproteínas de muy baja, baja y alta densidad (VLDL, LDL, HDL por sus siglas en inglés *very low*, *low* y *high density lipoproteins*) y quilomicrones intestinales ⁷⁰. Una de las enzimas que se postula cumple un rol clave en la captación de lípidos unidos a lipoproteínas durante la lactancia es la LPL (lipoproteína lipasa). En respuesta a la alta demanda de

INTRODUCCIÓN

lípidos para la síntesis de leche, la cantidad y actividad de LPL durante la lactancia aumenta considerablemente respecto de la preñez ^{48,71}. La LPL es sintetizada probablemente por los adipocitos en el intersticio mamario y luego es transportada hacia lumen capilar en donde cataliza la hidrólisis de partículas de quilomicrones y VLDL liberando ácidos grasos libres, glicerol, colesterol libre y esteres de colesterol que serán luego utilizados por las MECs. Inclusive, Ontsouka & Albrecht postularon que, además de la captación de lípidos dependiente de la acción de LPL, las propias MECs expresarían receptores de lipoproteínas y serían capaces de captar y procesar VLDL, LDL, HDL y quilomicrones circulantes ⁷². Este modelo se ilustra en la Figura 5. Los autores postulan que las MECs expresarían el receptor de LDL (LDLr), la proteína relacionada al receptor de LDL (LRP) y el receptor *scavenger* clase B tipo I (SR-BI) que funciona como receptor de HDL. Sin embargo, al momento no encontramos antecedentes que indiquen que tanto el LDLr y el LRP se expresen en dichas células. Si bien sí se hallaron altos niveles ARNm y proteína de SR-BI en glándula mamaria de rata preñada, aunque no se ha determinado en qué tipo celular en particular ⁷³. Por otro lado, si bien los autores no discuten cómo las lipoproteínas cargadas con lípidos atravesarían las barreras que hay entre el lumen capilar y la membrana basolateral para alcanzar las MECs ⁷², se encontraron moléculas de LDL en la membrana basal de las MECs e inclusive en la leche durante la lactancia ⁷⁴.

El colesterol libre intracelular es movilizado por diferentes mecanismos: i) pasaje a través de la membrana basolateral, ii) transporte intracelular y compartimentalización en el RE (y posterior secreción en MFGs, ver sección 4.2) y iii) pasaje a través de la membrana apical hacia el lumen alveolar (Figura 5). A continuación detallaremos los mecanismos de transporte de colesterol hacia el lumen alveolar y comentaremos sobre el transporte reverso por la membrana basolateral.

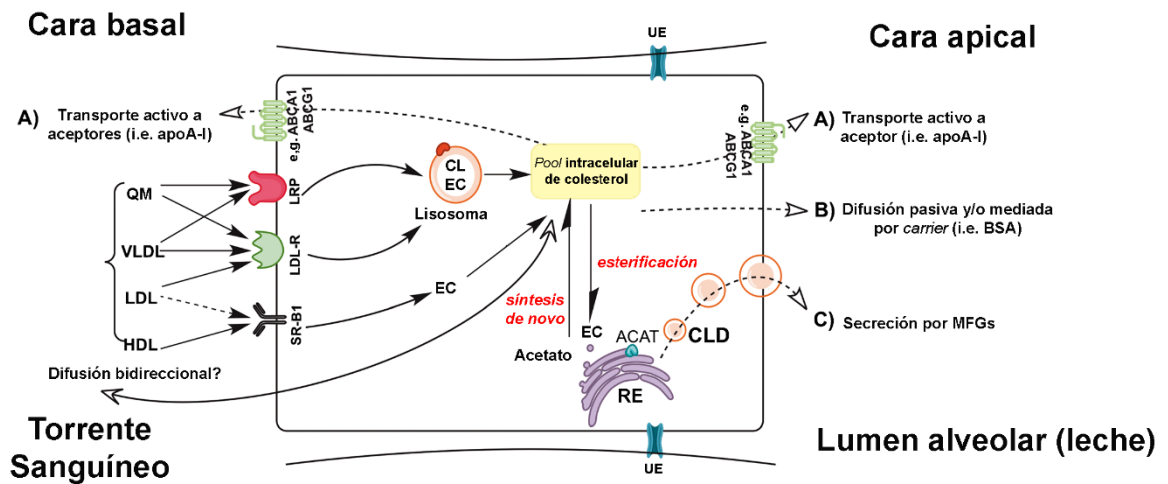


Figura 5. Esquema de mecanismos potenciales de transporte de colesterol en MECs. Las MECs toman el colesterol libre (CL) y ésteres de colesterol (EC) desde quilomicrones (QM), VLDL, LDL y HDL que circulan por el torrente sanguíneo. Por un lado, la LPL liberaría el colesterol desde el lumen capilar que ingresaría a las MECs por difusión pasiva o mediado por proteínas transportadoras. Por el otro lado, hipotéticamente, las MECs captarían el colesterol vía 1) Proteína relacionada a LDL (LRP), 2) endocitosis mediada por receptor del LDLr (LDL-R), y 3) captación mediada por SR-B1. El colesterol captado de circulación junto con el sintetizado *de novo* en el retículo endoplasmático (RE) determinan el *pool* intracelular. Dependiendo de la actividad celular, el CL puede ser esterificado por la Acil-coenzima A:colesterol aciltransferasa (ACAT) en el RE y almacenados como EC en (CLDs). Los EC que provienen de lipoproteínas son hidrolizados. Los transportadores de la familia *ATP-binding cassette* (ABC) como ABCA1 y ABCG1, localizados en la membrana apical y basolateral transfieren el colesterol a aceptores extracelulares (e.g. apolipoproteína (apo)-A1). El colesterol puede cruzar la membrana apical hacia el lumen por difusión y unirse a aceptores como BSA. El mecanismo de secreción en MFG involucra la migración de CLD formados en el RE (ver Figura 3). UE, uniones estrechas. *Modificado de Ontsouka & Albrecht*⁷²

4.2.1.3 Transporte de colesterol al lumen alveolar

La membrana que rodea los MFGs contiene colesterol, fosfolípidos y otros componentes^{75,76}. A su vez en el núcleo lipídico el colesterol se encuentra esterificado. Si bien aproximadamente el 80% del colesterol de

INTRODUCCIÓN

la leche proviene de los glóbulos de grasa ⁷⁷; al 20% restante se lo encuentra libre.

Además del transportar el colesterol como ésteres de colesterol encerrados en CLDs, existe un pasaje pasivo y activo de colesterol hacia el lumen alveolar. Se ha descrito que puede ocurrir difusión pasiva a través de la membrana plasmática o facilitada por proteínas *carrier* como seroalbúmina bovina en el epitelio mamario ⁷⁸⁻⁸⁰. Justamente, con respecto al transporte activo, la glándula mamaria humana, bovina y murina también expresan transportadores de colesterol que pertenecen a la familia de los *ATP Binding Cassette* (ABC), que son proteínas integrales de membrana que catalizan, con gasto de ATP, el transporte de colesterol libre a un aceptor lipoproteico como la apolipoproteína A-1 ⁸¹. O. Mani y *col.* analizaron el perfil de expresión y localización de distintos transportadores en glándulas mamarias bovinas, murinas y humanas. Encontraron que en cortes de glándula de ratones hembras no lactantes ABCA1 se acumula principalmente en adipocitos. Sin embargo, la señal es predominantemente epitelial durante la lactancia junto con ABCG1 y ABCA7. La presencia de ABCA1 es tanto en la cara basal como la luminal de las MECs, aunque también se encuentran adipocitos del intersticio ⁸². Estos resultados apoyan la hipótesis que, durante el final de la preñez y comienzo de lactancia, los adipocitos se delipidarían transfiriendo su contenido al intersticio que luego sería captado por el epitelio secretor. Por otro lado, los mismos autores sugieren que durante la lactancia hay mecanismos activos de transporte de colesterol en epitelio alveolar tanto hacia la leche como hacia el torrente sanguíneo, que mantendrían la homeostasis de colesterol intracelular en las MECs ⁸².

4.3 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DURANTE LA LACTANCIA

A partir del análisis de microarreglos de expresión de mensajeros de glándula mamaria de ratón se determinaron los perfiles temporales de

expresión de grupos de genes involucrados en la síntesis proteica y la homeostasis lipídica durante la diferenciación y la activación secretoria. Los resultados se resumen en la Figura 6. Desde la preñez temprana, la abundante expresión de diversas proteínas de la leche (como las distintas Caseínas, la proteína WAP, ADPH, entre otras) aumenta progresivamente. Inmediatamente luego del parto, con la caída de los niveles de progesterona, ocurre un aumento coordinado de la expresión de un gran número de genes que codifican para otro grupo de proteínas de la leche (como por ejemplo Butirofilina, α -Lactalbúmina, Xantina oxidorreductasa, entre otras) y para proteínas que regulan la síntesis y transporte de grasa. Los cambios más grandes se evidencian en los transportadores que unen ATP y enzimas involucradas en la síntesis de triglicéridos, de ácidos grasos y de colesterol. Este aumento se mantiene a lo largo de la lactancia para sostener la producción de lípidos de la leche^{83,84}. Consecuentemente, este incremento está asociado a una disminución en la expresión de genes cuyos productos participan en la β -oxidación^{83,85}. También, los mismos autores hallaron que algunos de los receptores involucrados en la homeostasis lipídica se expresan de manera diferencial. LXR α y PPAR γ disminuyen durante la preñez y se mantienen bajos durante la lactancia mientras que los niveles de LXR β y RXR α no se modifican a lo largo del desarrollo. Asociado a estos cambios describen un incremento pronunciado en la expresión de SREBP1c, un factor de transcripción que regula la síntesis *de novo* de ácidos grasos y TGs.

Los Receptores X de Hígado (LXRs, por sus siglas en inglés *Liver X Receptors*) y los Receptores Activados por Proliferadores de Peroxisomas (PPARs, *Peroxisome proliferator activated receptor*) pertenecen a la familia de receptores activados por ligando que heterodimerizan con el receptor X de ácido retinoico (RXR). El análisis de microarreglos fue el primer registro de que los LXRs se expresan en el tejido mamario murino aunque, como enfatizan los autores, los resultados debían ser validados⁸⁴.

INTRODUCCIÓN

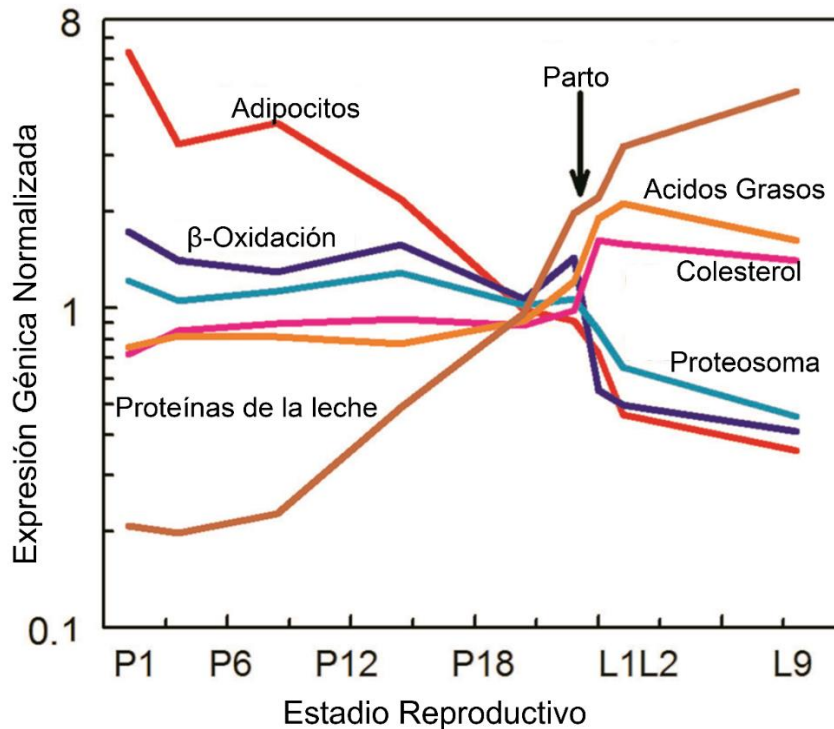


Figura 6. Expresión génica normalizada durante la preñez y lactancia por clases funcionales. Los genes específicos de adipocitos decaen durante la preñez y lactancia temprana mientras que los genes que codifican para proteínas de la leche aumentan en el mismo período. Los grupos de genes involucrados en la síntesis y transporte de colesterol y los relacionados con la β -Oxidación y Proteosomas se mantienen estables durante la preñez (probablemente porque se expresan tanto en el compartimento adiposo como en el epitelial) y luego aumentan dos a tres veces (síntesis y transporte de ácidos grasos y colesterol) o disminuyen 2 veces aproximadamente (degradación proteica y de ácidos grasos) al momento del parto. *Modificado de Anderson et. al.* ³.

Teniendo en cuenta el hecho de que avanzando en la preñez haya una disminución de $LXR\alpha$ y $PPAR\gamma$ similar a la que ocurre con genes específicos de adipocitos los autores hipotetizaron que existe una asociación entre estos cambios de expresión génica con la transición desde la síntesis y acumulación de lípidos en adipocitos hacia una regulación en la producción lipídica y transporte en el epitelio. Esto sería posible gracias a que se mantienen estables los niveles de $LXR\beta$ y $RXR\alpha$, probablemente en el epitelio mamario ^{3,86}. Sin embargo, puntualizaron que, al analizar expresión génica en lisados de glándulas mamarias totales, sus resultados

podrían estar sesgados por la presencia de múltiples tejidos y que debían ser validados y estudiados con mayor profundidad.

De estos análisis a gran escala se evidencia que hay un programa de expresión génica abocado a la síntesis y transporte de proteínas y de lípidos que se activa en el parto y se mantiene durante la lactancia para abastecer las demandas del neonato.

Si bien los mecanismos de regulación de la síntesis de proteínas al final de la preñez y principios de la lactancia han sido esclarecidos en profundidad ^{8,87-89}, aún se conoce muy poco al respecto de la regulación de la síntesis y transporte de lípidos. Además, debido a un creciente aumento en el desarrollo de obesidad y enfermedades metabólicas en los últimos años, ha crecido el interés por entender los mecanismos que regulan la composición lipídica de la leche. Se sabe que, por un lado, la obesidad materna aumenta el riesgo de obesidad infantil ^{90,91} y por el otro que la lactancia exclusivamente materna protege a su descendencia de un aumento excesivo de peso. También, en los Estado Unidos, la cantidad relativa de los ácidos grasos n-6 a n-3 presente en la leche humana ha aumentado sustancialmente en las últimas décadas ^{92,93} y esto tendría consecuencias en la deposición de tejido adiposo en infantes ⁹⁴. En ese sentido, es de gran importancia indagar en los procesos relacionados con el control del metabolismo y transporte lipídico en la glándula mamaria durante la lactancia. En particular en esta Tesis doctoral estudiaremos el papel de los receptores nucleares y específicamente el de los LXRs.

4.3.1 LXR

Los LXRs pertenecen a la superfamilia de factores de transcripción activados por ligando ⁹⁵. Las dos isoformas, LXR α (Nr1h3) y LXR β (Nr1h2), fueron identificadas por primera vez en 1994 en un *screening* una biblioteca de ADNc de hígado de rata ^{96,97}. Inicialmente fueron clasificados como receptores nucleares huérfanos, porque se desconocían cuáles eran sus ligandos naturales. Luego, se identificaron a los oxiesteroles, derivados

INTRODUCCIÓN

oxidados del colesterol, como sus ligandos endógenos ^{95,98}. Los LXRs se expresan de manera diferencial en el organismo, hay una gran expresión de LXR α principalmente en aquellos órganos metabólicamente activos como hígado, riñón, macrófagos y tejido adiposo mientras que LXR β es ubicuo, aunque sus niveles de expresión son mucho menores a los del LXR α ⁹⁹.

La actividad transcripcional de los LXRs depende de la formación de un heterodímero con los RXRs ¹⁰⁰. En ausencia de ligando, el heterodímero LXR-RXR se encuentra posicionado sobre los elementos de respuesta específicos (LRE) presentes en los genes blanco, formando complejos con co-represores de transcripción, que estabilizan una conformación inactiva del receptor y por lo tanto inhiben la expresión génica ¹⁰¹ (Figura 7). La presencia del agonista cambia la conformación del complejo, que estimula la liberación de los co-represores y el reclutamiento de co-activadores ¹⁰²⁻¹⁰⁶. Los LREs son secuencias consenso que consisten en repeticiones de AGGTCA separadas de cuatro nucleótidos ¹⁰⁷.

La identificación de los oxiesteroles como ligandos endógenos de los LXRs hizo pensar que podrían estar involucrados en mantener la homeostasis del colesterol. Efectivamente, el primer gen descrito como blanco directo de los LXRs es el *Cyp7a1* que codifica para la enzima colesterol 7- α -hidroxilasa (CYP7a1) que cataliza el paso limitante en la síntesis de ácidos biliares ¹⁰⁸. Sin embargo, investigaciones posteriores demostraron que los LXRs no solo regulan un amplia variedad de genes relacionados con el metabolismo y transporte de colesterol si no también genes que participan en la síntesis *de novo* de TGs.

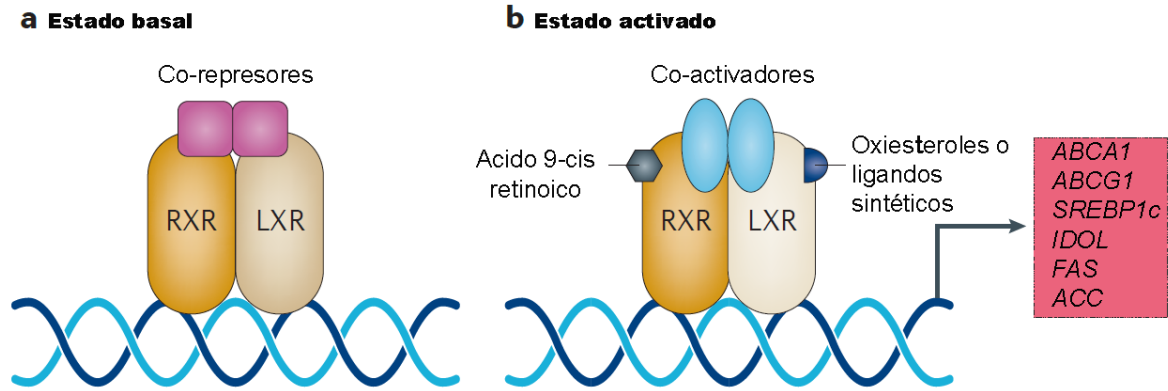


Figura 7. Mecanismo de acción de los receptores LXR. Los receptores nucleares forman heterodímeros obligados con el RXR y en ausencia de ligando se encuentran unidos al ADN junto con co-represores. La presencia de ligandos como los oxisteroles induce un cambio conformacional en los receptores, que conlleva al reclutamiento de co-activadores y a la inducción de la transcripción de genes relacionados con el metabolismo y transporte de lípidos. *Modificado de Hong & Tontonoz* ¹⁰⁹.

El exceso de colesterol en el organismo es tóxico y los LXRs actúan como sensores de esteroides: cuando se acumulan los oxisteroles producto del aumento de colesterol intracelular ¹¹⁰, los LXRs se activan y promueven la expresión de genes que ayudan a revertir ese exceso. En tejidos periféricos, los LXRs inhiben la captación y estimulan el eflujo de colesterol. Los LXRs activos aumentan los niveles de IDOL (*Inducible Degradation Of the Low-density lipoprotein receptor*), una E3 ubiquitin ligasa que cataliza la degradación lisosomal del LDLr y por lo tanto disminuyen la entrada de más colesterol a la célula ¹¹¹. También estimulan la expresión de transportadores de colesterol miembros de la familia de los *ATP binding cassettes* (ABCs), como ABCA1^{112,113} y ABCG1^{114,115}. Estos, estimulan la incorporación del colesterol en partículas de HDL ^{116,117} o apolipoproteínas (como ApoA1) ^{78,118}, que luego transportan el colesterol hacia el hígado, proceso denominado “transporte reverso” (Figura 8). En el hígado, las lipoproteínas cargadas de colesterol son internalizadas luego de la interacción con receptores específicos. Como consecuencia, el aumento de colesterol intracelular hepático activa a los LXRs presentes en dicho órgano. El LXR α es la isoforma que más se expresa en hígado y regula tanto la homeostasis

INTRODUCCIÓN

del colesterol (promoviendo su secreción a canalículos biliares ¹¹⁹, su excreción a ácidos biliares ¹⁰⁰ e inhibiendo su síntesis *de novo* ¹²⁰) como la síntesis de ácidos grasos y TGs. Este efecto se debe en gran medida a su acción inductora de la expresión del factor SREBP1c y de sus blancos stearoil-CoA desaturasa-1 (SCD-1), acil-CoA carboxilasa (ACC) y la FAS ^{121,122}. Es decir que el rol fisiológico de los LXRs integra el mantenimiento de niveles normales de colesterol en el organismo con la síntesis y acumulación de TGs.

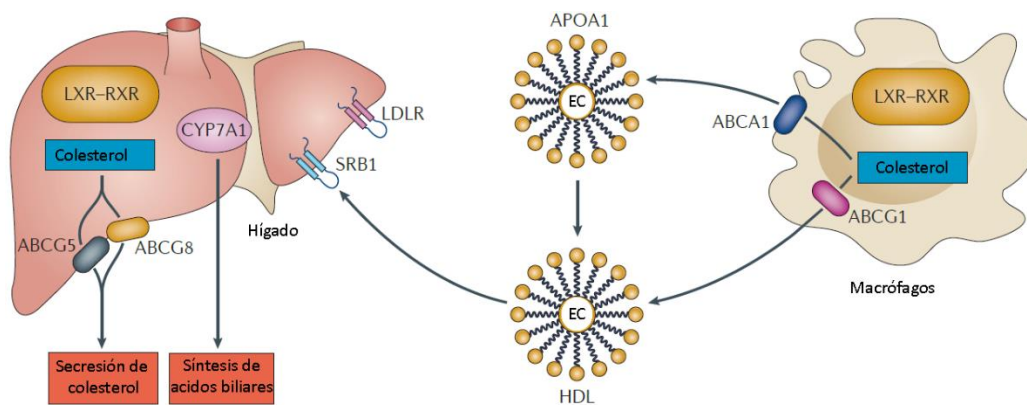


Figura 8. Transporte reverso desde macrófagos hacia el hígado. Los LXRs regulan el transporte reverso de colesterol. La activación de los LXRs en tejidos periféricos como los macrófagos inhibe la captación y promueve el eflujo de colesterol. A nivel celular, los transportadores de la familia de las *ATP-binding cassette* ABCA1 y ABCG1 catalizan el pasaje de colesterol a la apolipoproteína A1 (APOA1) y *high-density lipoprotein* (HDL), respectivamente. Las lipoproteínas cargadas con lípidos viajan al hígado donde los receptores de membrana LDLr y el receptor de HDL *scavenger* clase B miembro 1 (SR-B1) internalizan las lipoproteínas. Posteriormente, el colesterol es secretado a la bilis o convertido a ácidos biliares, proceso catalizado por el citocromo CYP7A1. EC, éster de colesterol; RXR, receptor X retinoide. *Modificado de Cynthia Hong & Peter Tontonoz*¹⁰⁹.

La descripción de la acción de los LXRs sobre el control del transporte reverso de colesterol ha llevado a búsqueda de nuevos compuestos agonistas con posible efecto terapéutico. Sin embargo, su utilidad es hasta el momento limitada debido precisamente a la capacidad

de esos ligandos de inducir esteatosis e hipertrigliceridemia a través de la acción directa del LXR hepático sobre la inducción de la expresión SREBP1 y de las enzimas lipogénicas ¹²¹. En ese sentido, el diseño y caracterización de ligandos selectivos, de acción tejido específica y/o capaces de discriminar esta regulación dual del LXR, es aún un desafío, que ha cautivado el interés para el tratamiento de patologías como el síndrome metabólico o diabetes, entre otras ¹⁰⁹.

Un estudio reciente ha mostrado que un haplotipo frecuente del gen de LXR α está asociado con un incremento en el tiempo de vida humano, predominantemente debido a una disminución de la mortalidad por causas cardiovasculares o infecciosas y cáncer ^{123,124}. Los LXR también participan de una compleja regulación cruzada entre el metabolismo de lípidos y las reacciones antiinflamatorias en macrófagos y células relacionadas. La activación de LXR en macrófagos, reprime la expresión de mediadores inflamatorios como la ciclooxigenasa-2 (COX-2), las interleuquinas-1 β y 6 (IL-1 β y IL-6), metaloproteinasa de matriz-9 (MMP-9) y la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1) en respuesta a infecciones bacterianas o estimulación con lipopolisacáridos (LPS), al mismo tiempo que regula la expresión de genes involucrados en la homeostasis de lípidos ¹²¹. Es por ello que el papel de LXR ha sido también estudiado extensamente en la iniciación y progreso de la aterosclerosis ¹²⁵⁻¹²⁸ donde agonistas de este receptor han mostrado tener efectos antiaterogénicos ¹²⁹. El mecanismo de acción por el cual los LXRs regulan procesos antiinflamatorios involucraría la unión e inhibición de la acción de otros factores de transcripción, como NF- κ B y AP-1, involucrados en la síntesis y secreción de citoquinas proinflamatorias. Algunos autores también afirman de otros mecanismos involucrados ¹³⁰⁻¹³⁵ en la acción antiinflamatoria de los LXRs. En cuanto a la supervivencia celular, la activación farmacológica de los LXRs inhibe la proliferación en múltiples líneas celulares tumorales de mama, próstata, ovario, pulmón, piel y colorrectal y reduce el tamaño de tumores *in vivo* ¹³⁶⁻¹⁴². Los mecanismos son múltiples y van desde la alteración de la vía de señalización mediada por PI3K/Akt hasta la acumulación tóxica de TGs intracelulares en las células tumorales.

4.3.2 LXR Y GLÁNDULA MAMARIA

Al momento de comenzar esta Tesis doctoral, existía poca información sobre la expresión de LXRs durante el desarrollo de la glándula mamaria. Por ejemplo, como mencionamos antes, Rudolph *y col.* realizaron microarreglos de expresión de glándula mamaria murina total a lo largo del desarrollo y mostraron que si bien los niveles de expresión de LXR β permanecen inalterados durante la transición preñez-lactancia los transcritos de LXR α disminuyen ⁸⁶. Agregan además que el nivel de expresión de LXR β era tres veces más alto respecto del hígado, sugiriendo un rol de esta isoforma en el metabolismo de las mamas lactantes ⁸⁴. Estos resultados fueron validados posteriormente por O. Mani *y col* ^{82,143}. En contraposición, trabajos realizados en glándula mamaria bovina mostraron que la expresión de LXR α aumenta durante la lactancia comparado con tejido mamario no lactante ¹⁴³. Además, la activación de LXR en células epiteliales mamarias bovinas (BME-UV) por el agonista de LXR T0901317, aumenta la síntesis del ARNm de los transportadores ABCA1 y ABCG1, de la enzima FAS y del factor de transcripción SREBP1, sugiriendo un papel relevante del LXR como potencial regulador de la homeostasis de colesterol y de la síntesis *de novo* de ácidos grasos en estas células ¹⁴⁴.

Inmediatamente luego del parto, habría un aumento en la disponibilidad de ácidos grasos preformados y el colesterol en el interior de las células epiteliales mamarias (ya sea por captación directa o como consecuencia del incremento en la actividad y expresión de la LPL en la glándula). Como mencionamos anteriormente, un incremento en los niveles intracelulares de colesterol produce un aumento los oxiesteroles, ligandos del LXR ^{98,145,146}. Por otro lado, los ácidos grasos libres, sobre todo los polinsaturados, son agonistas de PPAR γ ^{147,148}. Más aún, al comienzo de la lactancia ocurre un incremento notable en la expresión de genes blanco del LXR como SREBP1c, FAS, ACC, SCD, ABCA1, ABCG1, algunos de los cuales son detectables en el epitelio durante toda la lactancia^{3,86,149,150}

Hasta la fecha no hay trabajos que evalúen detalladamente como se expresan estos receptores en el epitelio mamario ni su influencia en el contenido lipídico de la leche *in vivo*. En ese sentido, este trabajo de Tesis propuso estudiar el perfil de expresión y activación de LXR durante el desarrollo de la glándula mamaria e investigar el rol de este receptor en la regulación de la producción y secreción de lípidos en la leche en ratones normales. Asimismo, no perderemos de vista al receptor PPAR γ , dada su capacidad moduladora de la acumulación y biosíntesis de lípidos ¹⁵¹.

Una mejor caracterización de la actividad del LXR en glándula mamaria podrá brindar datos relevantes sobre los efectos de este receptor y permitir, en un futuro, diseñar terapias para mejorar la calidad de la leche de madres con desbalances nutricionales y modificar la composición lipídica de la leche, lo cual podría ser de gran interés en la industria láctea ¹⁴⁴.

5 HIPÓTESIS

Los receptores nucleares LXR α y/o LXR β se expresan en el epitelio mamario durante la lactancia y regulan la expresión de genes involucrados en la síntesis *de novo* y el transporte de lípidos de la leche.

6 OBJETIVO GENERAL

Estudiar el control de la expresión del receptor de oxisteroles LXR durante el desarrollo de la glándula mamaria y su función en la regulación de la producción y secreción de lípidos en la leche.

7 OBJETIVOS PARTICULARES

- Estudiar la expresión y la actividad de los LXRs en una línea celular de epitelio mamario murino normal.
- Analizar su dependencia de las hormonas lactogénicas.
- Estudiar la acción de nuevos ligandos del LXR sobre la expresión de genes blanco y los niveles de lípidos intracelulares.
- Analizar el perfil de expresión y de actividad de ambas isoformas del receptor LXR durante la diferenciación de la glándula mamaria murina.
- Estudiar la acción y el mecanismo de acción de LXR sobre la síntesis y secreción de lípidos durante la lactancia.

8 MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 REACTIVOS UTILIZADOS

Los medios RPMI 1640 (Cat. 23400021) y DMEM (Cat. 12800017), la tripsina (Cat. 25200072), el antibiótico-antimicótico (penicilina-estreptomicina, Cat. 25200-072) y el factor de crecimiento epidérmico de origen humano (EGF) recombinante son producidos por la empresa Thermo Fisher Scientific (Cat. PHG0311). El suero fetal bovino (SFB) fue adquirido a la empresa Internegocios (Mercedes, Pcia. de Buenos Aires, Argentina) mientras que la Hialurodinasa (Cat. H3506), la Oxitocina (Cat. O3251), la Prolactina de origen ovino (Cat. L6520) y la Dexametasona (Cat. D4902) en Sigma-Aldrich. La Insulina aspártica es de Novo Nordisk (NovoRapid), la Colagenasa A es de Roche (Cat. 11088793001) y las soluciones anestésicas Ketamina 50mg/ml y Xilacina 20mg/ml son de Alfasan y Hollydat-Scott S.A., respectivamente. El GW3965 (GW) fue adquirido en Medchem Express (Cat. HY10627A) y los Compuestos 1 y 2 (CMP1 y CMP2) fueron diseñados y sintetizados en el laboratorio del Dr. Gerardo Burton del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, UMYMFOR-CONICET (Figura 9). El mecanismo de síntesis y la actividad del CMP1 fueron publicados en el trabajo Álvarez *et. al*¹⁵² del cual soy coautor.

Para las incubaciones de las fracciones enriquecidas en células epiteliales mamarias (MECs) o de hepatocitos y para los ensayos *in vitro* se prepararon soluciones stock 10 mM de los ligandos esteroides en dimetilsulfóxido (DMSO).

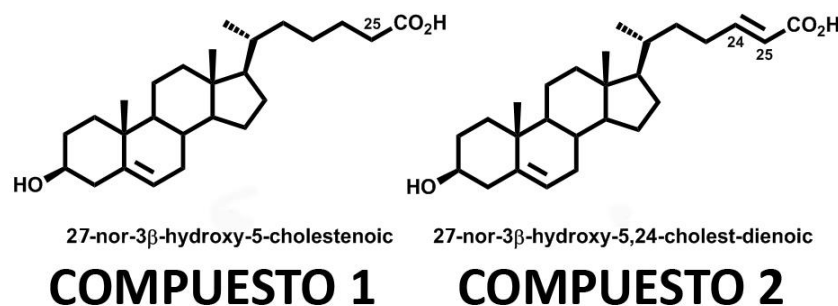


Figura 9. Estructura de los Compuestos 1 y 2 (CMP1 y CMP2).

8.2 PLÁSMIDOS UTILIZADOS

pCMX-hLXR α o pCMX-hLXR β ¹⁵³ (cedidos gentilmente por el Dr. Shutsung Liao, University of Chicago) expresan la isoforma α y β del LXR humano, respectivamente. El vector pHXR ¹⁵⁴ expresa al receptor del ácido retinoico humano (Clontech Inc., Palo Alto, CA) que forma un heterodímero funcional con ambas isoformas del LXR. LXRE-LUC (cedidos gentilmente por el Dr. Shutsung Liao, University of Chicago) codifica para el elemento de respuesta al LXR río arriba del gen de la Luciferasa. pLacZ codifica para el gen de β -Galactosidasa.

8.3 PREPARACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES

Bacterias de la especie *Escherichia coli*, cepa DH5 α , fueron cultivadas en medio LB (10 g/l peptona; 5 g/l extracto de levadura; 5 g/l NaCl) a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica (OD) = 0.3. A 5 ml de ese cultivo se le agregaron 100 ml de LB y se creció hasta una OD= 0.5. Posteriormente se incubó el cultivo durante 10 minutos a 0°C y se centrifugó por 10 minutos a 3000 g a 4°C. El sobrenadante fue descartado y el *pellet* se resuspendió en 40 ml de la solución TFB I (30 mM Acetato de potasio; 100 mM KCl; 10 mM CaCl₂; 50 mM MnCl₂;

15% Glicerol; pH = 5.2). Se dejó en hielo por 5 minutos y se centrifugó nuevamente por 10 minutos a 3000g a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en 4 ml de la solución TFB II (10 mM MOPS; 75 mM CaCl₂; 10 mM KCl; 15% Glicerol; pH = 6,5). Luego, se dejó reposar las células en hielo durante 15 minutos para luego guardarlas a -70°C en alícuotas de 200 µl.

8.4 AMPLIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS - TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES

Con 1 µl de cada plásmido a amplificar, se transformaron bacterias competentes *Escherichia coli* de la cepa DH5α mediante shock térmico a 42°C durante 90 segundos. A continuación se incubó en medio LB líquido, sin antibiótico, a 37°C durante 30 minutos en agitación permanente. Las bacterias se plaquearon en placas de Petri p100, de agar-LB (LB + 15 g/L de agar) con ampicilina 100 µg/ml, y se dejaron en estufa a 37°C durante 16 horas. Posteriormente, se picaron colonias y se realizaron minicultivos en LB-Ampicilina a 37°C durante 16 horas, en agitación permanente.

8.5 MAXI-PREPARACIÓN DE PLÁSMIDOS

Los minicultivos obtenidos fueron crecidos durante 24 hs en 400 ml de medio TB (5,33 g de Peptona; 10,7 g de extracto de lavadura; 4 ml de Glicerol; 1,03 g KH₂PO₄; 5,57 g K₂HPO₄) con 100 µg/ml de Ampicilina (Bagó). Las bacterias se centrifugaron durante 15 minutos a 4000 rpm y se descartó el sobrenadante. Éstas fueron luego resuspendidas en 10 ml de Solución I (25 mM Tris-HCl pH = 8; 10 mM EDTA pH = 8), se agitaron fuertemente durante 5 minutos y se les agregó 20 ml de Solución II (0,2 N NaOH; 1% SDS). Se mezcló por inversión y se dejó a 0°C por 20 minutos. Posteriormente se colocaron 15 ml de solución III (3 M Acetato de potasio; 11,5 % Acético glacial), se mezcló por inversión por 5 minutos a 0°C, y se centrifugó por 30 minutos a 10000 rpm a 4°C.

MATERIALES Y MÉTODOS

Al sobrenadante se le agregaron 0,6 volúmenes de isopropanol, se mezcló, y dejó 20 min. a -20°C . Se centrifugó 1 hora a 5000 rpm a 4°C y se descartó el sobrenadante. El pellet fue resuspendido en 3 ml de TE, se agregó igual volumen de LiCl_5 M (a 4°C), se mezcló y centrifugó a 10000 rpm por 5 minutos en agua/hielo. Se colectó el sobrenadante, se le agregó igual volumen de isopropanol, se mezcló y centrifugó 5 min. a 10000 rpm a 4°C . El sobrenadante se descartó, el *pellet* fue resuspendido en 0,5 ml de TE y se agregaron 20 mg/ml de ARNasa A durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se agregó igual volumen de 13% polietilenglicol (PEG) en 1,6 M NaCl, se mezcló y se centrifugó 5 minutos a 13000 rpm. El *pellet* obtenido se resuspendió en 400 ml de TE. Se realizaron extracciones con 1 volumen de fenol saturado en TE (una vez), 1 volumen fenol (saturado en TE): cloroformo (1:1) (2 veces), y 1 volumen cloroformo (una vez). Se agregó 0,1 volumen de Acetato de sodio 3 M pH = 5,2 y 2,5 volúmenes de ETOH 100 %. Se dejó 20 min a -20°C . Por último, se centrifugó 15 minutos a 13000 rpm, se lavó con 70 % ETOH y se resuspendió el *pellet* en 250 μl de TE. La concentración de ADN se determinó utilizando el Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).

8.6 CULTIVO CELULAR

En esta tesis se utilizaron dos líneas celulares: HEK293 y HC11 ¹⁵⁵. Las HEK293 son células derivadas de riñón embrionario humano y se utilizaron por su alta capacidad de transfección en los ensayos de transactivación. Se crecieron en medio DMEM suplementado con 10% de SFB y Penicilina (100 IU/ml) y Estreptomicina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Por otro lado, la línea derivada de epitelio mamario normal de ratón (HC11) fue crecida en medio RPMI 1640 completo (MC), es decir, suplementado con 10 % SFB más el agregado o no de EGF (10 ng/ml), Insulina (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), Penicilina (100 IU/ml) y Estreptomicina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). El medio libre de suero (SFM) fue preparado con medio RPMI 1640 suplementado solamente con Penicilina (100 IU/ml) y Estreptomicina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Las células

fueron mantenidas en estufa a 37°C en una atmósfera húmeda y condiciones reductoras con 5% CO₂.

8.7 TRANSFECCIONES TRANSITORIAS

5 x 10⁵ células HEK293 o HC11 fueron transfectadas en forma transitoria con lípidos catiónicos en placas de 6 pocillos. Se utilizó Lipofectamina 2000 (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, el medio de las células proliferando se reemplazó por 0,8 ml de medio sin suero ni antibióticos y por otro lado, se preparó la mezcla de Lipofectamina 2000 y del ADN a transfectar de la siguiente manera: en un tubo (Tubo 1) se colocaron 0,1 ml de medio junto con las cantidades de ADN a transfectar señaladas en cada caso. En otro tubo (Tubo 2) se agregó 0,1 ml de medio de cultivo junto con la Lipofectamina 2000 (2 ml/50 ml de medio). Luego de 5 minutos se mezclaron en igual proporción los tubos 1 y 2, se esperó 20 minutos y se agregó gota a gota dicha mezcla a las células. La mezcla de lípidos se dejó incubando toda la noche a 37°C en atmósfera húmeda que contenía 5 % CO₂ y luego se reemplazó el medio por el indicado en cada experimento.

Las cantidades de cada plásmido transfectadas por placa fueron las siguientes: 1 µg de pCMV-LacZ, pCMX-hLXRα, pCMX-hLXRβ, pRXRα y LXRE-LUC. El vector pCMV “vacío” fue transfectado para balancear la cantidad de ADN.

8.8 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LUCIFERASA Y DE β-GALACTOSIDASA

Las células se incubaron en 150 µl de Buffer de Lisis 1X (*Cell Culture Lysis Reagent* E153A, Promega). A continuación se trasvasaron los lisados a tubos

MATERIALES Y MÉTODOS

ependorf y se centrifugaron 5 minutos a 10000 x g. Sobre los sobrenadantes (extractos) se ensayaron las distintas actividades enzimáticas.

La determinación de los niveles de actividad de luciferasa se realizó utilizando el kit *Luciferase Assay System* (Promega, E1501); 30 μ l del sobrenadante se incubaron con 30 μ l de la solución de Ensayo (*Luciferase assay Buffer*, Promega) en oscuridad y se cuantificó la luminiscencia al cabo de 60 segundos, en un luminómetro Glomax (Glomax multidetection system, Pomega).

La determinación de la actividad de la enzima β -galactosidasa se realizó mediante un método colorimétrico. A 25 μ l de muestra se le agregaron 350 μ l de Buffer Z (60 mM Na₂HPO₄; 40 mM NaH₂PO₄; 10 mM KCl; 1 mM MgSO₄; 0.27% β -Mercaptoetanol). Luego de 5 minutos a 30 °C se le agregaron 75 μ l de orto-nitro-fenil-galactopiranosido (ONPG 4 mg/ml, Sigma-Aldrich) y se mantuvo a 30°C hasta observar la aparición de color amarillo. La reacción se detuvo con 187,5 μ l de 1 M Na₂CO₃, y se midió absorbancia a 415 nm con un espectrofotómetro de lectura de placa (Benchmark, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Cada muestra se determinó por duplicado. Como blanco de reacción se utilizó la solución de ensayo.

8.9 DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS HC11

Las HC11 se crecieron en medio con insulina 5 μ g/ml, 10% de SFB y EGF 10ng/ml (medio completo, MC). Una vez confluentes se lavaron con PBS 1X y se cambió el medio por medio sin EGF (medio básico, MB) y con menor concentración de SFB (de 10% a 2%) por 3 días. En ese momento las células se consideraron “competentes” para recibir el estímulo de las hormonas lactogénicas. Finalmente se las incubó 3 días con Dexametasona 100nM, Insulina 5 μ g/ml y Prolactina 1 μ g/ml (Figura 10). Finalizado el protocolo de diferenciación, las células se incubaron con distintos ligandos según se indica en cada caso y se preparó ARN y proteínas totales de los cultivos distintos estadios

a fin de cuantificar la expresión de distintos genes blanco. Los niveles de los transcritos de la proteína de la leche β -Caseína fueron determinados por RT-qPCR utilizando oligonucleótidos específicos como control de diferenciación.

Para evaluar el efecto en la regulación de la expresión de LXR por EGF se crecieron HC11 en MC hasta confluencia y luego una parte del cultivo se sometió al mismo protocolo de diferenciación mencionado arriba (sin EGF) y a la otra parte se le conservó el EGF a lo largo de todo el protocolo. Por lo tanto, los cultivos en aquellos pocillos a los que se les removió el EGF se diferenciaron mientras que los otros no.

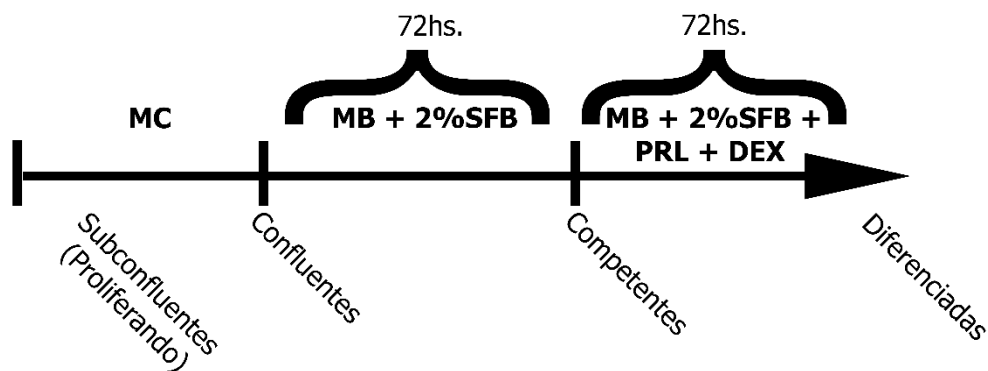


Figura 10. Protocolo de diferenciación de células epiteliales mamarias murinas HC11. Se crecieron las células en medio completo (MC) conteniendo Insulina (5 μ g/ml), EGF (10ng/ml) y 10% de SFB hasta llegar a confluencia. Luego, cultivadas en medio básico (MB) con Insulina, 2% de suero y sin EGF por 3 días (Competentes) y luego 3 días más en presencia de las hormonas lactogénicas: Insulina (Ins), Prolactina (Prl) y Dexametasona (Dex) en medio con 2% de SFB (Diferenciadas) ¹⁵⁶.

8.10 ANÁLISIS DE FORMACIÓN DE GOTAS LIPIDICAS

CITOPLASMÁTICAS (CLDs)

HC11 diferenciadas se incubaron durante 48hs con GW (1 μ M), CMP1 y CMP2 (10 μ M). Se lavaron 2 veces con PBS 1X y se les agregó

MATERIALES Y MÉTODOS

paraformaldehído al 4% durante 20 min a temperatura ambiente. Luego, se lavaron nuevamente con PBS 1X y se incubaron con BODIPY 493/503 (1 µg/ml final) durante 1 hora a 37°C para teñir lípidos neutros. Se lavó nuevamente con PBS 1X y se montó en un portaobjetos con glicerol 80%, protegido de la luz.

Las imágenes se tomaron con un microscopio confocal FV1000 (Olympus), usando un objetivo de aceite de inmersión UPlanSApo 60X (apertura numérica = 1.35). Las muestras fueron excitadas con un láser de Ar a 488 nm y la fluorescencia se detectó con un fotomultiplicador. El tamaño de las capturas fue de 2048x2048 píxeles. Se capturaron 10 campos por réplica biológica al azar de 210x210 µm². Las imágenes fueron binarizadas y analizadas con el software ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Se cuantificó la superficie total que ocupaban los CLDs por campo de manera automática y se contó el número de células totales por campo utilizando el *Plug In* “contador de células”. Los resultados se expresan como el valor promedio de Superficie de CLD (u.a.) / N° células por campo.

8.11 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS – PREPARACIÓN DE EXTRACTOS

PROTEICOS Y WESTERN BLOT

Se obtuvieron extractos de proteínas totales fueron obtenidos de células en cultivo, fracciones enriquecidas con células epiteliales mamarias y hepatocitos o glándulas mamarias e hígado totales provenientes de ratones hembra en distinto estadios reproductivos. Se utilizó la solución de extracción de proteínas RIPA suplementado con inhibidores de proteasas (*Protease inhibitor cocktail set 1*, Calbiochem) y de fosfatasas (1mM NaF, 2 mM Na₂VO₄) (Tabla 1). Las muestras de ratones se lisaron utilizando el homogeneizador Ultraturrax T25 (Ika Labortechnik Staufen, Alemania). Los extractos se incubaron 10 minutos en hielo y luego se centrifugaron 10 minutos a 4°C a 12000 x g. Las proteínas presentes en el sobrenadante se cuantificaron por el método de Bradford¹⁵⁷.

BUFFER RIPA	
Reactivo	Concentración final
Tris-HCl pH 7.4	20 mM
EDTA	2 mM
NaCl	137 mM
Glicerol	10%
SDS	0.1%
Deoxicolato de Sodio	0.5%
Tritón X100	1%
Ajustar el pH a 7.4.	

Tabla 1. Preparación del Buffer de lisis de proteínas RIPA.

A 30 µg de proteínas se les agregó solución de siembra y se las trató 5 minutos a 100°C para completar el proceso de desnaturalización. Posteriormente las proteínas se separaron electroforéticamente por *SDS-PAGE* en un gel de 10 o 15% según las proteínas a cuantificar, durante aproximadamente 2 hs a 100 Volts. En la Tabla 2 se detallan los reactivos y sus concentraciones finales utilizados para la preparación de los geles. Luego, las muestras se electrotransfirieron a una membrana de PVDF o nitrocelulosa (GE HealthCare) a 4°C durante 1,5 h a 300 mA. Finalizada la electrotransferencia, se realizó la tinción de proteínas durante 5 minutos con una solución de rojo Ponceau-S al 0,1% en ácido acético 5% para verificar la eficiencia de la transferencia (solo en aquellos ensayos donde se utilizó membranas de PVDF). Posteriormente, se bloqueó la membrana durante 1 h a temperatura ambiente en solución TBS (20 mM Tris-Cl, pH 7,5, 500 mM NaCl) más el agregado de 5% de leche descremada ("Purísima", La Sibila S. A.) o 5% de Seroalbúmina bovina (BSA) (Wiener Lab, Cat. 1443151) y 0,1% de Tween 20. La membrana se incubó durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios específicos según la dilución correspondientemente indicada, preparados en TTBS (TBS + 0,1% de Tween 20) conteniendo 3% de leche descremada o 3% de BSA. Luego se realizaron 2

MATERIALES Y MÉTODOS

lavados de 5 minutos y 1 lavado de 20 minutos en TTBS. Seguidamente se incubó la membrana con el anticuerpo secundario en la dilución correspondientemente indicada, preparado en TTBS conteniendo 3% de leche descremada durante 1 h, y se realizaron 2 lavados de 5 minutos y 1 lavado de 20 minutos con TTBS 0,1%. Finalmente, el *western blot* se reveló por quimioluminiscencia utilizando reactivo ECL+PlusSystem (GE HealthCare) en un detector de quimioluminiscencia (Fuji Film *Image Reader* LAS-1000) o por fluorescencia en un equipo de fluorescencia infrarrojo cercano (Odyssey CLx, LICOR Biosciences). La intensidad de las bandas presentes en las imágenes fue cuantificada por densitometría utilizando el programa ImageJ.

Reactivo	Stock	Volumen para 15%/10%
Gel de resolución		
Acrilamida Bisacrilamida	30%-0,8%	3.75 ml/2.5 ml
Tris-HCl	1,5 M- pH = 8,8	1,875 ml
SDS	10%	150 µl
H₂O		1,725 ml/3 ml
(NH₄)₂S₂O₈	10%	150 µl
TEMED	100%	10 µl
Gel concentrador		
Acrilamida Bisacrilamida	30%-0,8%	0,45 ml
Tris-HCl	0,5 M pH = 6,8	0,875 ml
SDS	10%	35 µl
H₂O		2,1
(NH₄)₂S₂O₈	10%	40 µl
TEMED	100%	3,5 µl

Tabla 2. Preparación de SDS-PAGE.

A continuación se listan los anticuerpos utilizados en esta tesis doctoral (Tabla 3):

Anticuerpo	Dilución	Cat-	Empresa
α-LXRα	1/1000	α - sc-1202	Santa Cruz Biotechnology
α-LXRα	1/500 (IF)	ab106464	Abcam
α-LXRβ	1/1000	sc-34341	Santa Cruz Biotechnology
α-LXRβ	1/750	ab28479	Abcam
α-PPARγ	1/1000	#2435	Cell Signaling Technology
α-HSP90	1/1000	#4874	Cell Signaling Technology
α-CypA	1/1000	#2175	Cell Signaling Technology
α-PLIN1	1/1000	# 9349S	Cell Signaling Technology
α-ADIPOFILINA	1/1000	20R-AP002	Fitzgerald
α-FAS	1/1000	C20G5	Cell Signaling Technology
α-Conejo-IgG	1/5000	sc-2004	Santa Cruz Biotechnology
α-Cabra-IgG	1/3500	sc-2020	Santa Cruz Biotechnology
α- Conejo-IgG	1/15000	925-32211	LI-COR Inc.
α-Cabra-IgG	1/10000	925-68024	LI-COR Inc.
α-Conejo-IgG-Cy3	1/100 (IF)	AP182C	Millipore

Tabla 3. Listado de anticuerpos primarios y secundarios utilizados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las soluciones utilizadas para la electroforesis fueron:

- *Solución de siembra*: Tris 40 mM pH = 6,8, glicerol 6%, azul de bromofenol 0,006%, SDS 1% y β -Mercaptoetanol 0,1%;
- *Solución de Corrida*: Tris 25 mM pH = 8,3, glicina 192 mM, SDS 0,1%
- *Solución de Transferencia*: Tris 25 mM pH = 8,3, glicina 192 mM, SDS 0,1%, Metanol 20%.

8.12 OBTENCIÓN DE LISADOS TOTALES DE GLÁNDULAS MAMARIAS

Ratones hembra de la cepa Balb/c y C57bl/6jFCEN en distintos estadios reproductivos fueron sacrificados, luego se les removió quirúrgicamente el par de glándula mamaria #4 y colocada en tubos conteniendo Tri-reagent (*Molecular Research Center Inc.*, Cat. TR118) para la extracción de ARNm totales o 1 ml del *buffer* RIPA con inhibidores de proteasas para extraer proteínas. Luego, se lisaron las glándulas utilizando el homogeneizador de tejidos Ultraturax T25, se centrifugó 10 min a 12.000 xg y se conservó el sobrenadante a -80 °C.

8.13 OBTENCIÓN DE FRACCIONES ENRIQUECIDAS EN CÉLULAS

EPITELIALES MAMARIAS (MECs)

Ratones hembra de la cepa C57bl/6jFCEN en distintos estadios reproductivos (P17, Lac2, Lac5, Lac7 y Lac10) fueron sacrificados, luego se les removió quirúrgicamente el par de glándula mamaria #4 y disgregado mecánicamente con bisturíes. Los nódulos linfáticos de las glándulas mamarias fueron removidos (para algunas determinaciones se prepararon proteínas totales y ARNm totales de lisados de glándulas enteras). Luego, se incubó en agitación a 37°C en 10 ml del buffer isotónico Krebs-Ringers-HEPES (KRH) (Tabla 4) con Colagenasa A 2 mg/ml y Hialurodinasa 0.5 mg/ml, en tubos de 50 ml durante una hora. Seguidamente, las muestras de mama se centrifugaron durante 3 min

a 300 xg a fin de separar tres fases: el *pellet* enriquecido en epitelio mamario, una fase acuosa y una fase de menor densidad blanquecina que contiene en su mayoría adipocitos y células epiteliales cargadas con CLDs. Se descartó la fase acuosa, se resuspendió en 9 ml de *buffer* KRH y se centrifugó dos veces más. Al finalizar el último paso de centrifugación se descartó el sobrenadante. Utilizamos 1 ml del *buffer* RIPA con inhibidores de proteasas o Tri-reagent. Se lisaron las células utilizando el homogeneizador de tejidos Ultraturax T25, se centrifugó 10 min a 12.000 xg y se conservó el sobrenadante (adaptado de Rudolph *et. al* ¹⁵⁸).

BUFFER KREB RINGER HEPES (KRH)	
Reactivo	Concentración final
NaCl	120 mM
KCl	4.7 mM
MgSO ₄	1.2 mM
K ₂ HPO ₄	1.2 mM
CaCl ₂	2.2 mM
HEPES	10 mM
Ajustar el pH a 7.4.	

Tabla 4. Preparación del buffer KREB-RINGER-HEPES (KRH).

Como control de la técnica de enriquecimiento se comparó la abundancia proteica de dos marcadores de las MECs con muestras de lisados totales de mamas en los mismos estadios (Figura 11). Las proteínas Perilipina 1 (PLIN1) y Adipofilina (ADPH o Perilipina 2) son proteínas involucradas en la formación y estructura de las CLDs ¹⁵⁹. La ADPH es de expresión ubicua y por lo tanto se encuentra tanto en tejido epitelial como adiposo mamario, es por eso que la observamos tanto en los preparados de células epiteliales como en los lisados totales. Por otro lado, PLIN1 es exclusiva del tejido adiposo, por eso observamos

MATERIALES Y MÉTODOS

escasa o nula señal de esta proteína en las células epiteliales mamarias (MECs) pero sí en lisados totales de mamas. Si bien disminuye hacia estadios avanzados de la lactancia, en Lac10 todavía hay señal de PLIN1, lo que indica la presencia de adipocitos en el tejido mamario aún en estos estadios.

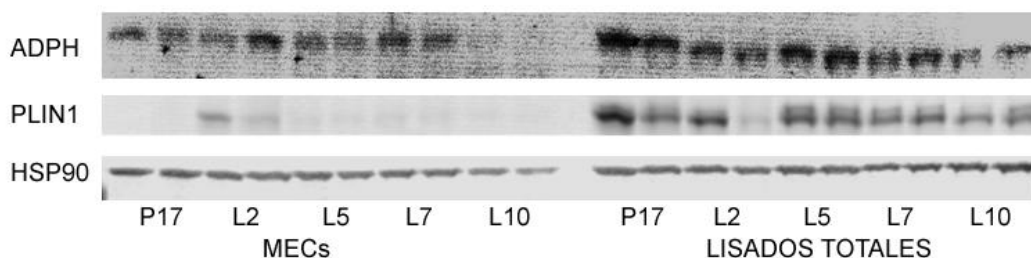


Figura 11. Control de técnica de enriquecimiento de células epiteliales mamarias murinas. Determinación de niveles de ADPH y PLIN1 por *western blot* en fracciones enriquecidas con MECs y en lisados totales de mama durante la preñez tardía (P17) y en distintos estadios de lactancia (L2; L5; L7 y L10). Muestras de dos individuos por grupo fueron evaluadas y HSP90 fue utilizada como control de carga.

8.14 ESTUDIO DE ACTIVIDAD DE RECEPTORES NUCLEARES EN MECS

Para el estudio de actividad de los receptores nucleares, se resuspendieron las fracciones enriquecidas con MECs en medio DMEM baja glucosa (1 g/l) suplementado con Insulina 5 $\mu\text{g/ml}$ y 1% de SFB y se lo dividió en tubos de 15 ml, se les agregó el estímulo correspondiente y se los incubó durante 3 hs en agitación a 37°C. Una vez finalizado el tratamiento, las células se centrifugaron 5 min a 3000 rpm, se descartó el sobrenadante, se lavó con PBS 1X y luego se agregaron 500 μl de Tri-reagent para la posterior preparación de ARN (Figura 12).

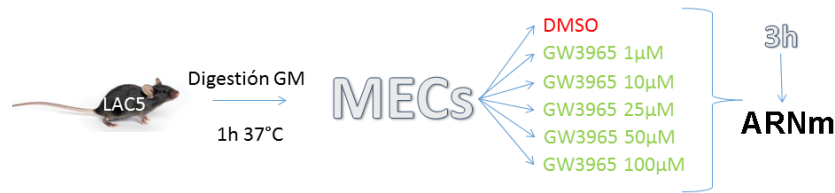


Figura 12. Esquema del diseño experimental para evaluar la actividad del receptor LXR α en células epiteliales y hepáticas murinas de hembras Lac5.

8.15 EXTRACCIÓN DE LECHE

10 ratones hembra Lac9 fueron divididos al azar en dos grupos, tratados con una inyección i.p. del agonista sintético GW3965 (30 mg/kg) o vehículo (10% DMSO en PBS 1X). Luego de 21 hs las madres fueron separadas de sus crías (previamente balanceadas entre 6 y 8) para que acumulen leche durante 3 hs. Posteriormente, se anestesiaron con una dosis de Xilacina (8 mg/kg) y Ketamina (90 mg/kg) y, una vez que hizo efecto, se les aplicó 2 UI de Oxitocina a fin de facilitar la extracción de leche. Después de 3 min los animales se colocaron sobre una manta eléctrica para conservar la temperatura corporal y se extrajo la leche por succión utilizando un dispositivo construido en el laboratorio según descripciones previas^{160,161} (Figura 13). Brevemente, un tubo kitasato que contiene un tubo eppendorff donde se colecta la leche, se conecta por un lado a una trampa de vacío o a una bomba y por su parte superior a un tubo de etilvinil acetato (Cole Parmer, 0649202) con un tip de 0.5-10 μ l terminal (mediante el cual se succionaron los distintos pezones). El procedimiento dura aproximadamente 20 minutos y se colectan entre 100 y 300 μ l de leche. Luego, las hembras fueron sacrificadas y se prepararon fracciones enriquecidas de células epiteliales mamarias (MECs) y hepatocitos como se describió anteriormente.

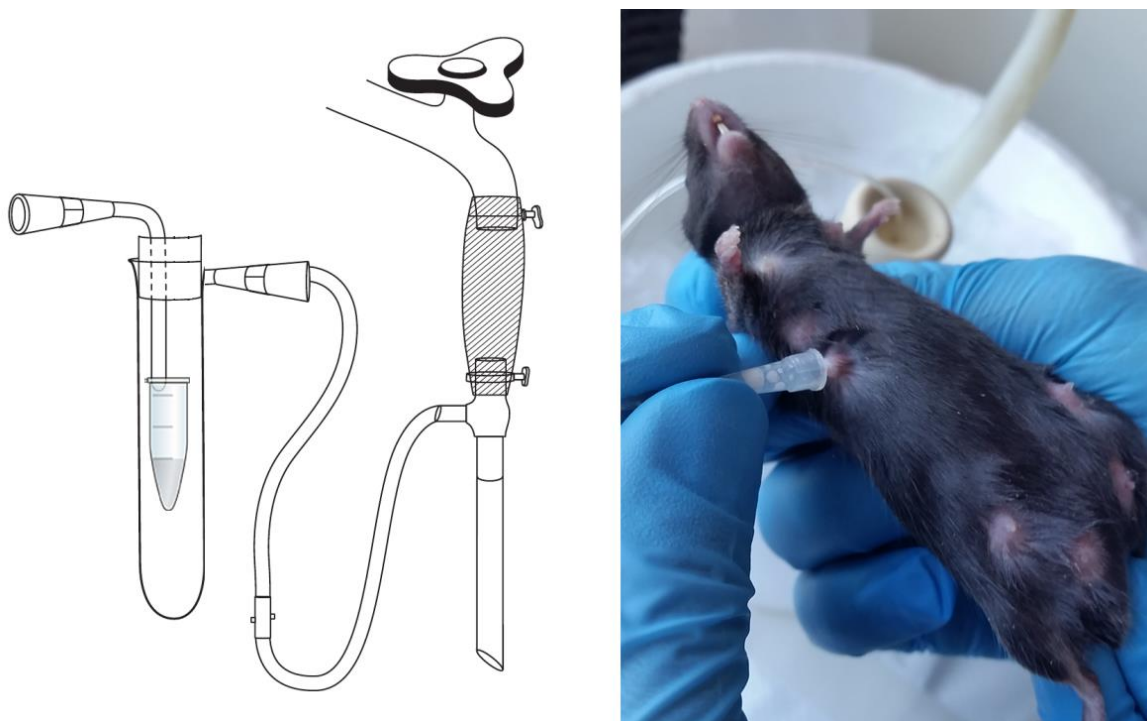


Figura 13. **Dispositivo para la extracción de leche de ratón.** Un tip pequeño se une a un tubo colector inmerso en un tubo kitasato. Este a su vez conectado a un sistema de vacío (adaptado de *The Laboratory Mouse*, 2da edición ¹⁶²). Al finalizar el procedimiento, se lavan los tubos con pasajes sucesivos de etanol 70%. A la derecha, una imagen ilustrativa del procedimiento.

8.16 EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS

La extracción y cuantificación de lípidos se llevó a cabo en colaboración con el grupo de la Dra. Marta Mayer del Depto. de Química Orgánica, FCEN-UBA-UMYMFOR-CONICET, basándose en el método de Bligh & Dyer ¹⁶³. Brevemente, 10 mg de leche de ratón fueron colocados en tubos de hemólisis, se les agregó 200 μ l de cloroformo y 400 μ l de metanol y se agitó vigorosamente la muestra con vortex. Luego, se incorporaron 200 μ l de cloroformo más, se volvió a mezclar y finalmente se agregaron 200 μ l de agua destilada y se agitó una vez más la muestra. Se centrifugó por 5 minutos para separar ambas fases (orgánica y acuosa). Se tomó la fase orgánica y se secó bajo atmósfera de N_2 .

La fracción orgánica se pesó para calcular el porcentaje de lípidos totales presentes en las muestras.

8.17 OBTENCIÓN DE LOS ESTERES METÍLICOS (FAME)

La fracción etérea obtenida fue tratada con cloruro de acetilo (10%) en metanol a 70 °C durante 2 hs, se dejó enfriar a temperatura ambiente, se agregó una gota de agua destilada y se extrajo con 500 µl de cloroformo tres veces. La fase de cloroformo conteniendo los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) fue transferida a un vial de vidrio de 2 ml y evaporada bajo N₂. Se conservó a -18°C hasta su análisis.

8.18 SAPONIFICACIÓN PARA OBTENER LOS LIPIDOS NEUTROS (ESTEROLES)

Se tomaron 2-7 mg de la muestra de lípidos y se trató con 1 ml de una solución de hidróxido de potasio 4% en etanol:agua (2:1), a 60 °C durante 120 min. Luego de enfriar a temperatura ambiente, se realizó una extracción con 0,5 ml de n-hexano (3 veces) y se separó la fase orgánica conteniendo los compuestos neutros (alcoholes de cadena larga y/o esteroides). La fracción neutra se transfirió a un vial de 2 ml, se pesó y se reservó a -18 °C para futuros análisis. A continuación se agregó 0,5 ml de agua destilada al residuo de extracción acuoso, se acidificó a pH 3 con ácido clorhídrico 2 M y se extrajo con 0,75 ml de dietil éter tres veces. Se separó la fase etérea conteniendo los ácidos grasos libres y se evaporó bajo atmósfera de N₂.

8.19 PREPARACIÓN DE LOS DERIVADOS DE COLESTEROL

A la fase neutra obtenida de la saponificación, se le agregó como estándar interno, estigmasterol (5-10 μg). Los trimetilsilil-derivados (TMS) fueron preparados agregando 20 μl de N,O-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida (BTSFA) con 1% de trimetilclorosilano (TMCS) (Supelco) y calentando por 20 min a 60°C. Luego de enfriarse, los derivados TMS se secaron bajo N_2 , se redisolviaron en CH_2Cl_2 , los mismos fueron analizados dentro de las 24 hs luego de su derivatización.

La cuantificación se realizó utilizando el método de estándar interno, utilizando para ello estigmasterol 95% (Sigma-Aldrich).

8.20 CONDICIONES CG-EM

Los FAME y el colesterol se analizaron en un cromatógrafo gaseoso Shimadzu GCMS-QP5050 A (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón) acoplado a un detector selectivo de masas. El sistema fue equipado con una columna capilar ZB-5 (30 m x 0.25 x 0.50). El gas *carrier* fue helio. La inyección fue manual y en modo *splitless* a una temperatura de 200 °C. El espectrómetro de masa fue operado en el modo de impacto electrónico a 70 eV, y detección de múltiples iones con un rango de masa desde 50 a 600 uma.

8.20.1 Condiciones para los FAME

Condiciones de la corrida: Inyector 250, Detector 280. Flujo 0.9 ml/min. Rampa de temperatura: Temperatura inicial 100 °C, luego rampa de 6 °C/min hasta 200 °C, se mantuvo la temperatura durante 1 min, luego rampa de 2 °C min hasta 280 °C, esta temperatura se mantuvo durante 30 min.

La identificación de los compuestos se basó en la comparación con los estándares (Sigma-Aldrich) y la interpretación de los patrones de fragmentación. La cuantificación se realizó utilizando un estándar interno, ácido nonadecanoico (Sigma-Aldrich) y se expresó como porcentaje respecto al total de ácidos grasos.

8.20.2 Condiciones para el colesterol

Condiciones de la corrida: Inyector 250 °C, Detector 280 °C. Flujo 1 ml/min. Rampa de temperatura: Temperatura inicial 240 °C, luego rampa de 10 °C/min hasta 270 °C, se mantuvo la temperatura durante 25 min, luego rampa de 8 °C min hasta 290 °C, esta temperatura se mantuvo durante 30 minutos.

8.21 INMUNOFLUORESCENCIA

Para las inmunofluorescencias, se utilizaron cortes de secciones de parafina de glándulas mamarias de ratones hembra C57bl/6j P9, P14, P17 y Lac10.

En primer lugar se hidrataron las secciones sumergiéndolas en Xileno (2X) por 5 min, luego en concentraciones decrecientes de etanol (100% (2X), 90%, 70%, 30% por 3 min cada una) y finalmente en PBS 1X 5min. Luego se procedió a la recuperación antigénica sumergiendo los portaobjetos en un frasco de vidrio conteniendo la solución de recuperación antigénica (7.5 ml de *Vector antigen retrieval solution* [Vector Labs H-3300] en 150 ml de H₂O), se calentó hasta romper hervor en microondas, se mantuvo por 10 segundos, se dejó reposar por 45 segundos y se repitió este procedimiento 10 veces. Una vez concluido el último ciclo, se dejó enfriar por 10 minutos y se lavó en PBS por 5 min.

Las secciones se incubaron por 30 min con 0.2% de glicina en PBS en cámara húmeda, se lavaron con PBS 1X y se bloquearon y permeabilizaron con

MATERIALES Y MÉTODOS

suero normal de burro al 10% y 0.01% de saponina en PBS por 1 h a temperatura ambiente.

Se incubó con una dilución del anticuerpo primario α -LXR α (ab106464) 1/750 O.N. a 4 °C, se lavó con PBS 1X y se agregó el segundo anticuerpo α -conejo-Cy3 por 45 min a temperatura ambiente junto con DAPI (300 nM en PBS, Thermo Fisher Scientific) para colorear núcleos. Luego se lavó nuevamente y las secciones se montaron con o-fenilenediamina dihidrocloruro (P1526, Sigma-Aldrich) y se guardaron a -20 °C cuidadas de la luz hasta su visualización.

8.22 PREPARACIÓN DE ARN TOTAL

La extracción de ARN se llevó a cabo utilizando el reactivo Tri-reagent de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Brevemente, las células en cultivo se colectaron agregando Tri-reagent a las placas de plástico y en el caso de tejidos de ratón o de fracciones enriquecidas en MECs y/o hepatocitos, las muestras se homogeneizaron embebidas en Tri-reagent en tubos Polytron. En este último caso se centrifugaron a máxima velocidad a 4°C durante 10 min descartando el *debris* celular. Luego de extraer con 1 vol de cloroformo, se precipitó el ARN con isopropanol (1 vol), se lavó con etanol 75% dos veces y se resuspendió en agua libre de ribonucleasas. La concentración de ARN total se determinó utilizando el Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). Se verificó también que la relación OD₂₆₀/OD₂₈₀ fuese de entre 1,7 y 2 lo que indica una buena pureza del ARN total obtenido. Cuando era posible, se realizó una dilución de 200 ng/ μ l final de ARN total en agua libre de ribonucleasas y re-cuantificó la muestra.

8.23 TRANSCRIPCIÓN REVERSA Y PCR EN TIEMPO REAL

Para realizar la transcripción reversa se utilizó 1 µg de ARN total, 0.5 µg/ml de una mezcla de oligonucleótidos al azar (Thermo Fisher Scientific, cat. 48190011) y oligo dT en relación 3:1, 1mM de dNTPs (Thermo Fisher Scientific), 200 U de la enzima transcriptasa reversa MMLV (Promega), y se siguió el protocolo indicado por el fabricante. Brevemente, se llevó el ARN a 10.9 µl final con agua destilada libre de ARNasas y se desnaturalizó junto con la mezcla de oligonucleótidos al azar y oligo dT (3:1) por calentamiento a 70°C durante 5 minutos en termocicladora. Luego, para evitar la renaturalización, la muestra se colocó inmediatamente en hielo. Finalmente se agregó la mezcla que contenía el resto de los reactivos mencionados anteriormente resultando en 20 µl finales y se llevó a cabo la reacción utilizando el siguiente programa en termocicladora: 60 minutos a 37°C.

Todas las PCRs en tiempo real en este trabajo se realizaron en 25 µl de volumen final con 2 o 4 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0.625 U de la enzima Taq polimerasa (Thermo Fisher Scientific) y 1 µM de cada par de oligonucleótidos específicos para la secuencia a amplificar. Se utilizó el método Sybr Green (Roche) incorporando 1:30000 a la mezcla de reacción y las reacciones se realizaron en la termocicladora QPCR Strategene Mx3000p (Agilent Technologies). Para cada reacción se utilizaron 50 o 100ng de ADNc (según se indica). Cada muestra a analizar fue determinada por duplicado. Los oligonucleótidos utilizados fueron los siguientes:

MATERIALES Y MÉTODOS

ARNm	Oligo FW (5'-3')	Oligo RV (5'-3')	Amp. (bp)
LXRα	TCAATGCCTGATGTTTCTCCT	TCCAACCCTATCCCTAAAGCAA	149
LXRβ	CGTGGTCATCTTAGAGCCAGA	AGCTGAGCACGTTGTAGTGG	134
ABCA1	GGAGCTGGGAAGTCAACAAC	ACATGCTCTCTTCCCGTCAG	176
SREBP1c	AAGCTGTCTGGGGTAGCGT	CAGCATAGGGGGCGTCAAA	140
β-CASEINA	GATGCCCTCCTTAACTCTGAA	TTAGCAAGACTGGCAAGGCTG	75
FAS	AGTGGAGGCAGGAGCCAA	AATGGAGAAACGACCGT	140
rRNA 18S	GTAACCCGTTGAACCCATT	CCATCCAATCGGTAGTAGCG	156
ACTINA	CCACACCCGCCACAGTTC	GACCCATTCCCACCATCACACC	167
HSPCB	CCAAAAAGCACCTGGAGATCA	TGTCGGCCTCAGCCTTCT	72
PPARγ	CATAAAGTCCTTCCCGCTGA	GAAACTGGCACCTTGAAAA	197
GAPDH	GAGTCAACGGATTTGGTC	TTGATTTTGGAGGGATCTCG	238
SCD-2	GATCTCTGGCGCTTACTCAGC	CTCCCCAGTGGTGAGAACTC	104

Tabla 5. Pares de oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

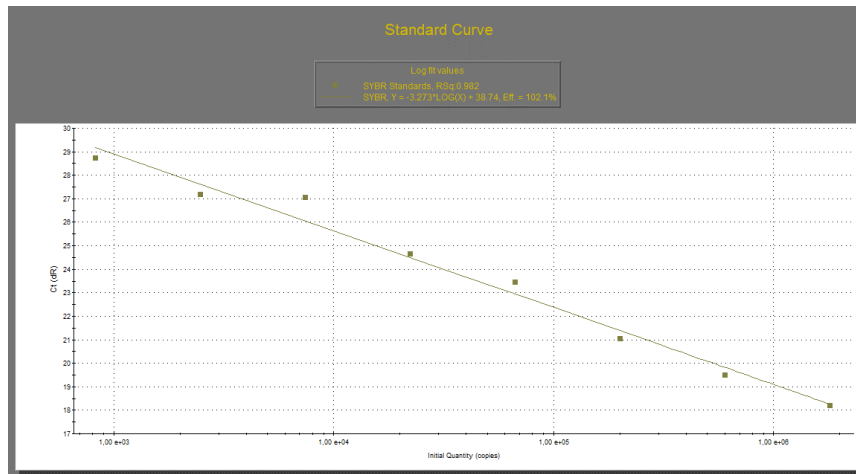
El programa general que se utilizó en todos los casos fue el siguiente: 2 minutos a 95°C, 40 ciclos de 20 segundos a 95°C, 20 segundos a la temperatura apareamiento específica para cada par de oligonucleótidos y 20 segundos a 72°C, efectuándose la lectura de la fluorescencia producida al finalizar cada segmento de 72°C. Para cada uno de los ADNc analizados, se realizaron curvas de temperatura de apareamiento y de concentraciones de Mg⁺⁺ para seleccionar las condiciones óptimas de reacción. Se verificó que se generara un sólo producto de amplificación mediante la observación de la curva de desnaturalización (95°C 1min, 55°C 30seg y 95°C mientras se toman las mediciones) y la amplificación producida por cada par de oligonucleótidos debió cumplir el requisito de tener una eficiencia cercana a 2.

Para calcular el número absoluto de copias inicial de cada mensajero, en primer lugar, se purificaron los productos resultantes de una reacción de PCR donde se utilizó cada uno de los pares de oligonucleótidos. Para ello se utilizó el kit QIAquick (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante y se controló que solamente haya una única banda producto de la PCR (amplicón) corriendo un gel de agarosa 1.5%. Luego, se cuantificó la concentración de los productos doble cadena purificados con el Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). La molaridad de cada amplicón fue calculada utilizando la siguiente ecuación:

$$\frac{\left(\text{amplicon } \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}}\right)}{2 \left(308.95 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \times N\right)} = \frac{\text{moles}}{\text{litro}}$$

donde 308.95 g/mol es el peso molecular promedio de una base nucleotídica y N representa el largo de nucleótidos del amplicón (multiplicado por 2 por ser doble cadena). La molaridad resultante fue convertida a moléculas/ μl multiplicando por el número de Avogadro* 10^{-6} . Finalmente, se realizaron diluciones seriadas sucesivas para generar una curva estándar de 8 puntos en el rango de 1.8×10^6 copias a 8.2×10^2 (en diluciones seriadas de 1/3). El número absoluto de copias de mensajero se calculó entonces usando el método de curva estándar y se verificó que la pendiente de todas las curvas estándar sea cercana al valor óptimo de -3.3, el valor de R^2 cercano a 1, la eficiencia de PCR cercana a 100% y que los valores de las muestras amplifiquen dentro de la curva. En la Figura 14 se puede observar los gráficos correspondientes a la curva estándar y sus respectivas curvas de amplificación de una RT-qPCR utilizando oligonucleótidos específicos para el rRNA18s.

(A)



(B)

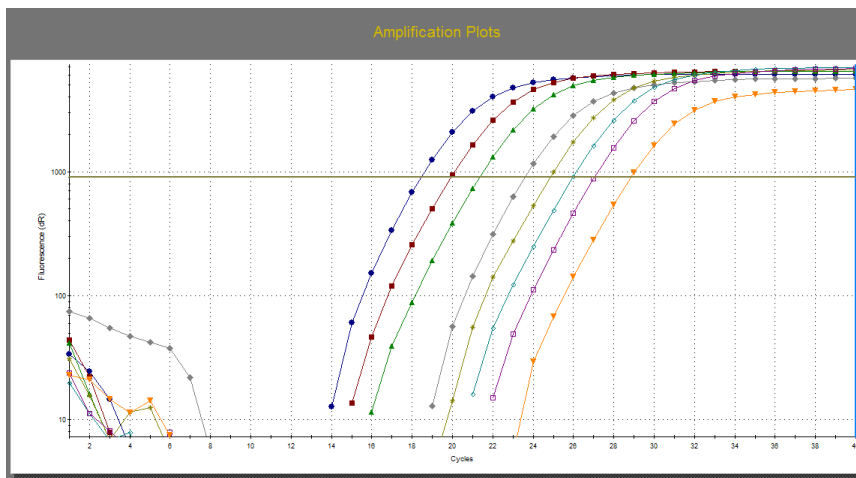


Figura 14. (A) Curva estándar y (B) curva de amplificación RT-qPCR utilizando oligonucleótidos específicos para el rRNA18s. Se utilizaron 8 puntos con número de copias decreciente en el rango de 1.8×10^6 copias a 8.2×10^2 del amplicón de rRNA18s.

8.24 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los resultados están expresados como media \pm error estándar. Para determinar diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) se hicieron test de t o ANOVA de uno o dos factores seguidas de pruebas de comparación múltiple de Tukey o Dunnet. Los análisis estadísticos se hicieron con el software InfoStat (Grupo InfoStat, <http://www.infostat.com.ar>). Las diferencias fueron

consideradas estadísticamente significativas si se cumplía que $p < 0,05$ y los resultados se expresaron con letras (en el caso de contrastes múltiples por Tukey) o un asterisco (en el caso de comparaciones vs. el control por Dunnet). Antes de realizar el análisis estadístico se corroboró que los datos cumplieran con los supuestos de normalidad y homocedacia utilizando las pruebas de Shapiro Wilks modificado y Levene, respectivamente.

MATERIALES Y MÉTODOS

9 RESULTADOS

9.1 ACTIVIDAD DE LOS LXR_s EN CULTIVOS CELULARES

9.1.1 *Determinación de la acción de GW3965*

GW3965 es un agonista sintético comercial de ambas isoformas del LXR¹⁶⁴. Junto con el T0901317¹⁶⁵ son los principales agonistas comerciales de uso en laboratorio que permiten el estudio de los mecanismos de acción de este receptor. Para determinar la acción de GW3965 sobre la actividad *in vitro* del LXR, decidimos evaluar la capacidad de transactivación del LXR en presencia de concentraciones crecientes del agonista y realizamos ensayos de transfecciones transitorias con genes reporteros. Elegimos co-transfectar la línea celular HEK-293T, derivada de epitelio renal, por su alta eficiencia de transfección y utilizamos los siguientes plásmidos de expresión: pLXR β , pLRE-LUC y pRXR. pLacZ fue utilizado como control de transfección. Luego, las células fueron incubadas en presencia de GW3965 en concentraciones crecientes por 18hs y se midió la actividad luciferasa y β -galactosidasa (Figura 15).

En las concentraciones ensayadas el máximo de actividad se logró con GW3965 1 μ M que incrementó significativamente la actividad luciferasa 3.2 \pm 0.2 veces respecto al control con DMSO. Con esta concentración trabajamos en los ensayos *realizados con la línea celular HC11*.

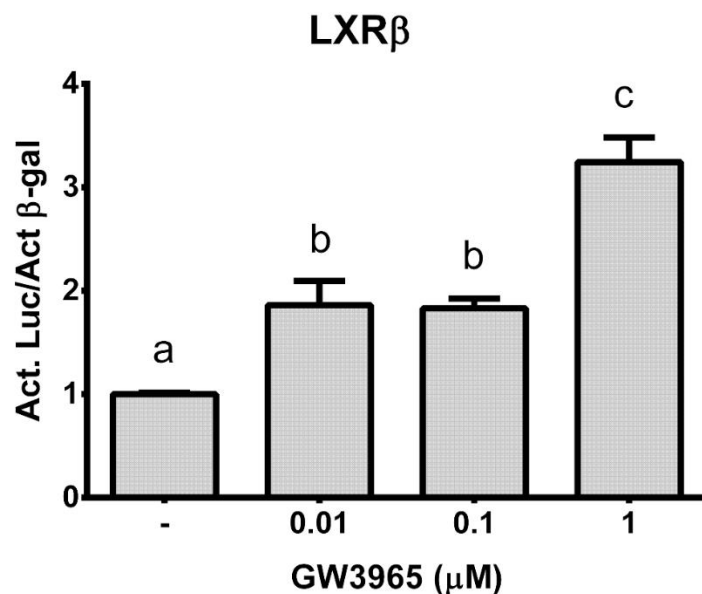


Figura 15. Ensayo de transactivación. Células HEK-293T fueron co-transfectadas con los vectores pLRE-LUC, pRXR y pLXR β . Luego fueron incubadas por 18hs con DMSO (-) o con concentraciones crecientes del agonista sintético. La actividad β -galactosidasa fue determinada como control de transfección. Los valores están expresados como veces de inducción respecto del control con DMSO. Las barras indican la Media \pm E.E. de dos réplicas de tres experimentos independientes (n=3). Letras distintas indican medias significativamente diferentes ($p < 0.05$).

9.1.2 Estudio de la actividad de los LXR α y/o LXR β en células epiteliales mamarias murinas (HC11)

En primer lugar se evaluó si los receptores LXR α y/o LXR β se expresan en una línea celular derivada de epitelio mamario normal murino. Para eso utilizamos la línea HC11 (gentilmente cedida por la Dra. Nancy Hynes, Friedrich Meischer Institute, Basilea, Suiza) que es un modelo celular ampliamente utilizado para estudiar procesos relacionados con la diferenciación y la apoptosis de células mamarias en cultivo. Esta línea celular se obtuvo por selección clonal a partir de células COMMA-1D, que se generaron partiendo de un cultivo primario

de mamas normales (no tumorigénicas) de una ratón hembra Balb/c preñada^{155,166}.

Las células HC11 poseen características morfológicas y funcionales similares a las células epiteliales de la glándula mamaria de ratón y tienen la capacidad de generar estructuras anatómicas similares a mamas normales si se las inyecta en su entorno normal en un ratón singenético. Además, pueden diferenciarse *in vitro*, en presencia de las hormonas lactogénicas Dexametasona (Dex), Prolactina (Prl) e Insulina (Ins) y, en su estadio diferenciado, son capaces de sintetizar proteínas y lípidos de la leche^{155,167}. El protocolo de diferenciación se describió en detalle en *Materiales y Métodos* (ver sección 8.9) y se ilustra también en la Figura 16A.

Las HC11 transitan tres estadios bien definidos a lo largo del protocolo de diferenciación: las células en estado de proliferación (“proliferando”) comparten características con células madre mamarias¹⁶⁸; al remover el factor de crecimiento epidérmico (EGF) del medio las células se vuelven “competentes”, es decir, receptivas al estímulo lactogénico y, finalmente, las células ya “diferenciadas” son capaces de sintetizar β -Caseína⁸⁹ y lípidos de la leche¹⁶⁷. Encontramos que ambas isoformas del receptor LXR se expresan en los tres estadios (Figura 16B). Más aún, su expresión aumenta significativamente cuando las células se vuelven competentes, es decir, cuando las HC11 se vuelven susceptibles al estímulo de las hormonas lactogénicas. En las células diferenciadas los niveles relativos de LXR α se mantienen altos mientras que los de LXR β disminuyen a valores intermedios. Por otro lado, el LXR α en todos los estadios alcanzó niveles de expresión entre 300 y 500 veces más elevados respecto de la isoforma β .

RESULTADOS

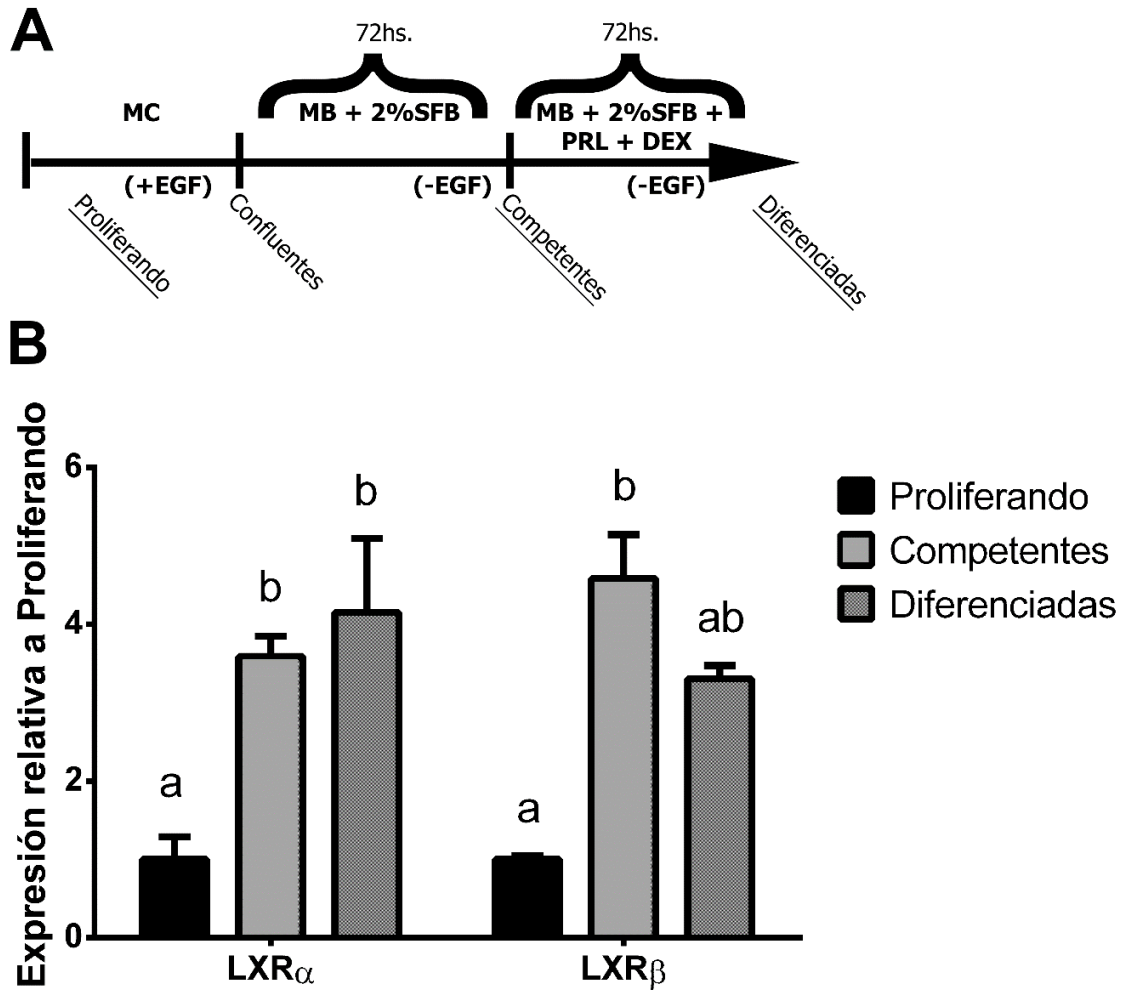


Figura 16. La expresión de LXR α y LXR β aumenta en las HC11 competentes y diferenciadas *in vitro*. (A) Protocolo de diferenciación de células HC11. Las células “proliferando” son crecidas hasta confluencia en medio completo (MC) y luego son incubadas por 72 hs en medio básico (MB) con 2% SFB y sin EGF. En ese momento son “competentes” para responder a las hormonas lactogénicas Prolactina (PrI) y Dexametasona (Dex) y a las 72hs estar completamente diferenciadas. (B) Células HC11 fueron diferenciadas *in vitro*. Luego, se determinaron los niveles de los transcritos de LXR α y LXR β por RT-qPCR. Los valores se normalizaron con β -actina y representados como veces de inducción relativos al estadio Proliferando. Las barras indican la Media \pm E.E. de tres experimentos independientes (n=3). Letras distintas indican medias significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Para que las HC11 respondan al estímulo de las hormonas lactogénicas y se diferencien tienen que haber sido crecidas en un medio con Insulina e EGF; sin embargo, mantener activa la vía del EGFR afecta negativamente la señal de

la Prl y Dex durante la diferenciación y por lo tanto debe ser removido una vez que alcanzan la confluencia ¹⁶⁹. Considerando que el aumento en la expresión de ARNm de ambos receptores LXRs tuvo lugar luego de la remoción del EGF del medio de cultivo, hipotetizamos que la presencia del EGF regula negativamente la expresión de los mismos. En consecuencia, analizamos los niveles de expresión del LXR α , que es la isoforma que más se expresa y sus niveles se permanecen elevados cuando las células alcanzan la diferenciación, manteniendo el EGF a lo largo del protocolo de diferenciación (Figura 17).

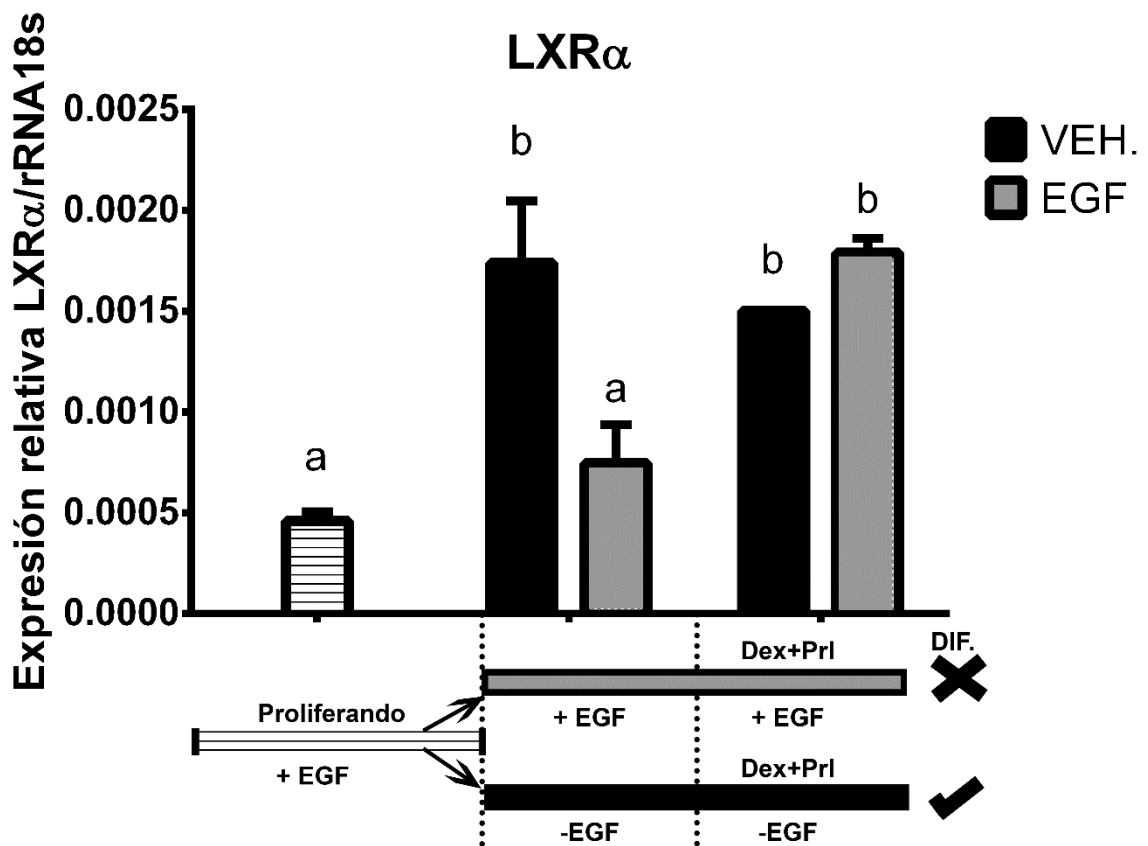


Figura 17. La presencia de EGF bloquea el aumento en expresión de LXR α en el estadio de competencia. Células HC11 fueron crecidas durante la proliferación con EGF y luego mantenidas en medio con (barra gris) o sin EGF (barra negra) a lo largo del protocolo de diferenciación. Luego, se determinaron los niveles de los transcritos de LXR α y los valores se normalizaron con rRNA18s. Las barras indican la Media \pm E.E. de tres experimentos independientes (n=3). Letras distintas indican medias significativamente diferentes ($p < 0.05$). A la derecha se indica si las células se diferenciaron (DIF.).

RESULTADOS

De acuerdo con los resultados, la presencia de EGF en el medio durante la etapa de competencia celular inhibe el incremento en la expresión del LXR α . Sabemos que esta intervención impide la diferenciación celular ¹⁶⁹, por lo tanto una hipótesis a testear en el futuro es si el LXR α contribuye en la capacidad de las HC11 de responder al estímulo lactogénico. Es llamativo también que el bloqueo del aumento de LXR α se pierde con el agregado de hormonas lactogénicas durante la diferenciación celular. Más estudios son necesarios para analizar si la Prl o Dex modulan la expresión del LXR α

Seguidamente, evaluamos la actividad de los LXRs en las células mamarias no diferenciadas y diferenciadas frente al estímulo con GW3965 (Figura 18). Encontramos que sólo en las células HC11 diferenciadas la activación de los LXRs aumenta significativamente los niveles de ARNm de ABCA1 y SREBP1c. Por otro lado, la expresión basal de ABCA1, SREBP1c, FAS y SCD-2 no cambia en células diferenciadas ni en células competentes.

De acuerdo con estos resultados, los LXRs no sólo se expresan en células epiteliales mamarias murinas en cultivo, sino que su activación con el ligando agonista GW3965 en células diferenciadas induce la expresión de genes relacionados con el transporte de colesterol (ABCA1) y con la síntesis *de novo* de ácidos grasos y TGs (SREBP1c)

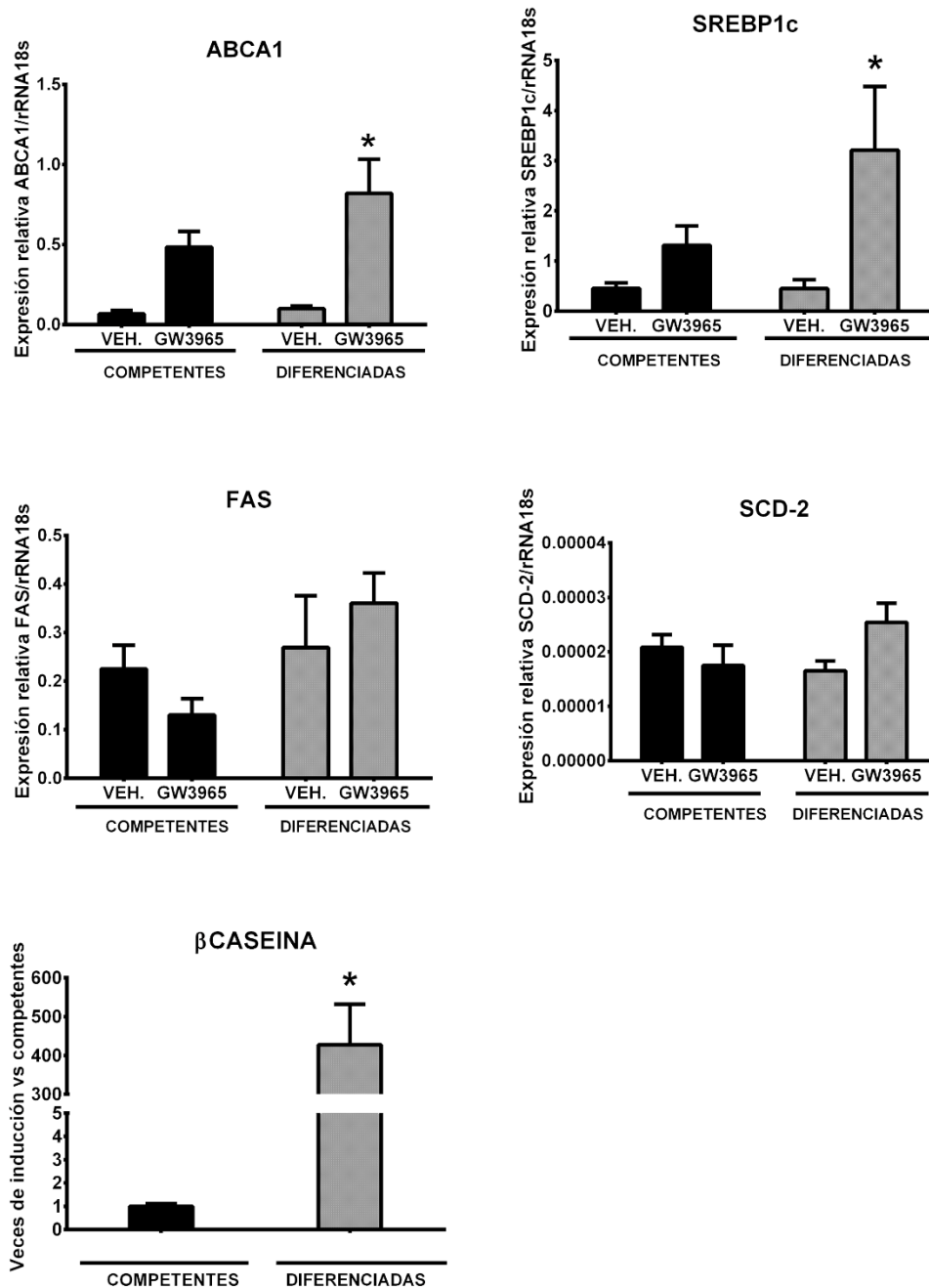


Figura 18. **GW3965 induce la expresión de ABCA1 y SREBP1c en células mamarias murinas diferenciadas.** Células HC11 competentes y diferenciadas fueron incubadas por 5 hs con el agonista de LXR GW3965 1 μ M. Luego se determinó el número de copias de los ARNm de ABCA1, SREBP1c, FAS, SCD-2 y se normalizaron con los valores de rRNA18s. La expresión de β -Caseína fue utilizada como control de diferenciación. Las barras indican la Media \pm E.E. de tres experimentos independientes (n=3). * indica diferencias significativas (p<0.05).

RESULTADOS

9.1.3 Actividad biológica de CMP1 y CMP2

9.1.3.1 Ensayos de transfecciones transitorias

A continuación, se evaluó la capacidad de dos ligandos esteroideos derivados de ácido colestenoico (metabolito de colesterol que regula la actividad de los LXRs) de modular la actividad de los LXRs. Estos compuestos fueron sintetizados por el grupo del Dr. Gerardo Burton (Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, UMYMFOR-CONICET). Para ello, células HEK-293T fueron co-transfectadas con plásmidos que sobreexpresan el LXR α o LXR β , pLRE-LUC y pRXR. pLacZ fue utilizado como control de transfección. Luego, las células fueron incubadas en presencia de concentraciones crecientes del compuesto 1 (CMP1) o compuesto 2 (CMP2) durante 18hs (Figura 19). Tanto el CMP1 como el CMP2 *per se* disminuyeron aproximadamente un 50% los niveles basales de actividad luciferasa a concentraciones de [10 μ M], evidenciando su función de agonistas inversos de ambas isoformas del receptor. Aún más, los compuestos antagonizaron, en promedio, un 65% la inducción de la actividad luciferasa mediada por GW3965 en ambos receptores, también a concentraciones de CMP1 y CMP2 de [10 μ M] (Figura 20).

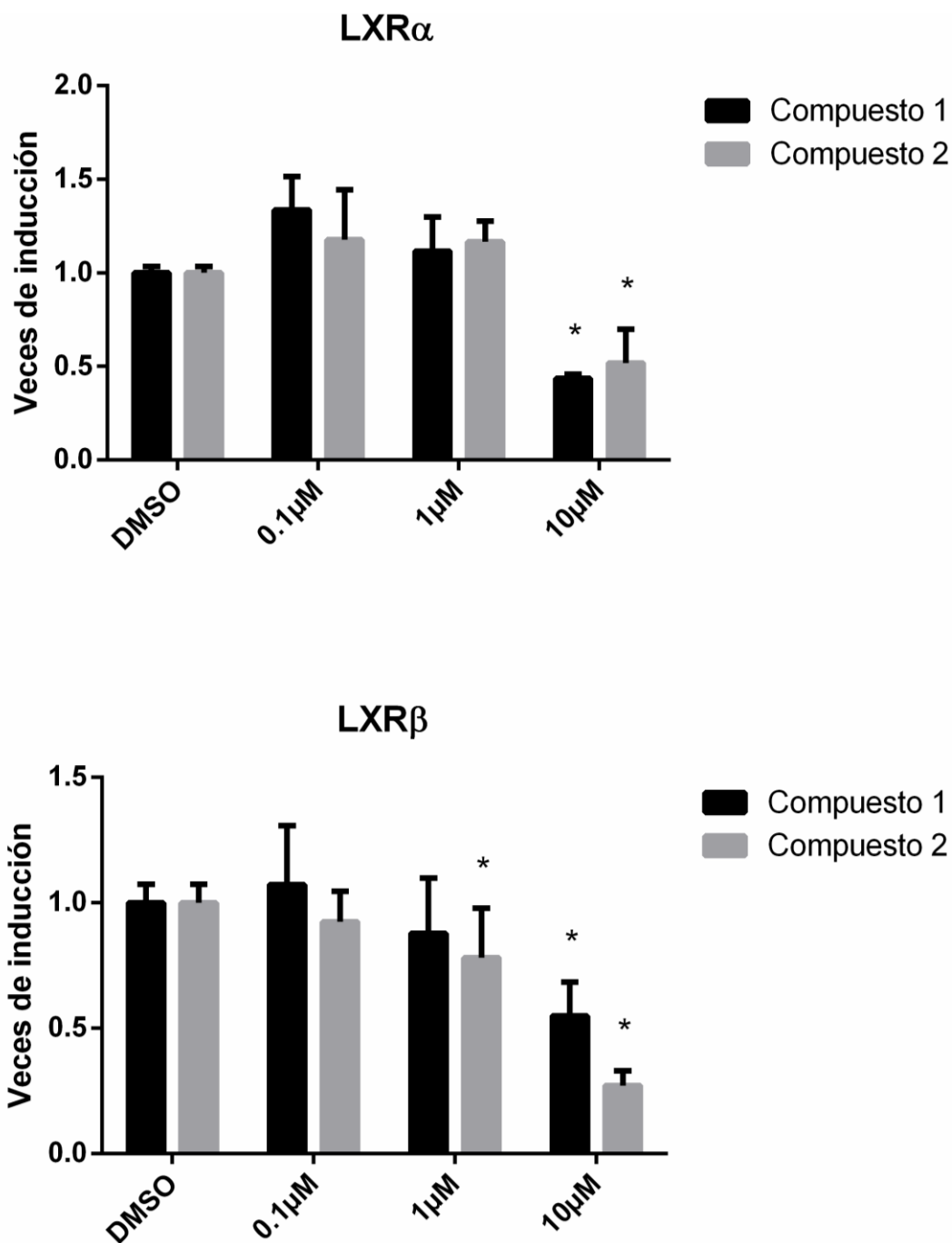


Figura 19. Ensayo de transactivación: los compuestos 1 y 2 son agonistas inversos duales de LXR α/β . Células HEK-293T fueron co-transfectadas con los vectores pLRE-LUC, pRXR y pLXR α (arriba) o pLXR β (abajo). Luego fueron incubadas por 18hs con DMSO o con concentraciones crecientes de CMP1 y CMP2. La actividad β -galactosidasa fue determinada como control de transfección. Los valores están expresados como veces de inducción respecto del control con DMSO. Las barras indican la Media \pm E.E. de tres experimentos independientes (n=3). * indica diferencias significativas (p<0.05).

RESULTADOS

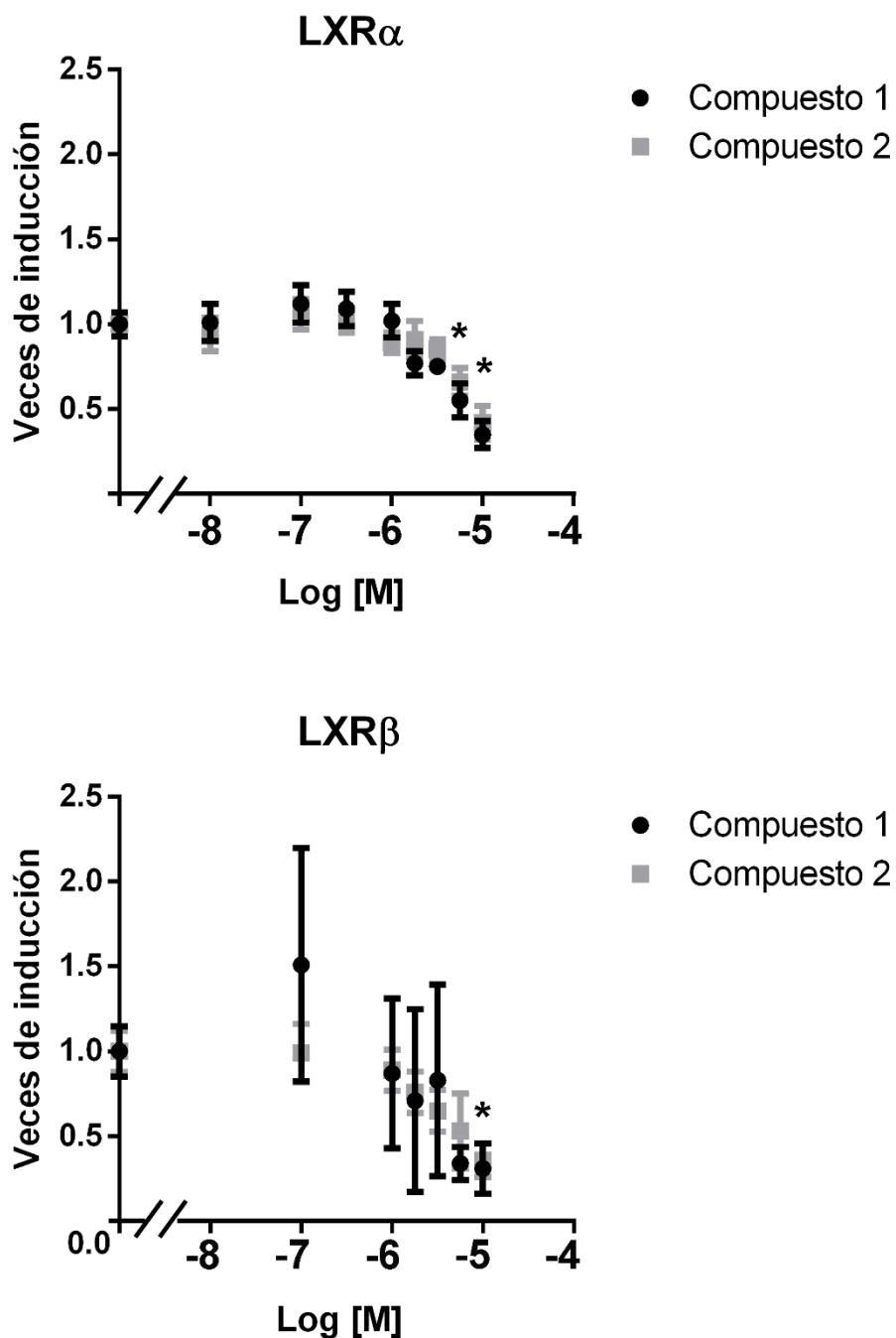


Figura 20. Ensayo de transactivación: los compuestos 1 y 2 (CMP1 y CMP2) antagonizan el efecto del GW3965. Células HEK-293T fueron co-transfectadas con los vectores pLRE-LUC, pRXR y pLXR α (arriba) o pLXR β (abajo). Luego fueron incubadas por 18hs con concentraciones crecientes de CMP1 o CMP2 en presencia del agonista sintético GW3965 1 μ M. La actividad β -galactosidasa fue determinada como control de transfección. Los valores están expresados como veces de inducción respecto del GW3965 1 μ M. Las barras indican la Media \pm E.E. de tres réplicas de tres experimentos independientes (n=3). * indica diferencias significativas (p<0.05).

9.1.3.2 Expresión de genes blanco

A continuación, evaluamos la capacidad de los compuestos CMP1 y CMP2 de modular la expresión endógena de genes blanco de la acción de LXR en el epitelio mamario murino con el objeto de determinar cuál/es es/son la/s consecuencia/s de disminuir la actividad de estos receptores. Para ello, incubamos células HC11 diferenciadas con el agonista GW3965 y/o los ligandos CMP1 Y CMP2 y analizamos la expresión de distintos genes (Figura 21).

Con respecto a la expresión de los propios receptores, el CMP1 disminuyó la expresión basal del LXR α *per se*, mientras que no alteró los niveles de LXR β . Este resultado es llamativo porque si bien en humanos el LXR α regula su propia transcripción por la presencia de un elemento LRE presente en su promotor, este sitio no está conservado en ratones ¹⁷⁰. Además, el LXR α no aumentó al incubar las células con GW3965, por lo que especulamos que el mecanismo por el cual el CMP1 disminuye la expresión basal del LXR sería indirecto. Por otro lado, CMP2 no tuvo ningún efecto en la expresión de ambos receptores.

En cuanto a la expresión de los genes blanco de los LXRs, sorpresivamente, el CMP1 disminuyó significativamente los niveles basales del mensajero de SCD-2 (cuyos niveles no se alteran con el estímulo de GW3965) mientras que el CMP2 actuó como agonista inverso de la expresión de SREBP1c. Por último, ninguno de los compuestos antagonizó el incremento en la expresión tanto del transportador ABCA1 como del factor de transcripción SREBP1c mediado por GW3965.

En resumen, en lo que respecta a la regulación de la expresión génica, los compuestos CMP1 y CMP2 que habían mostrado actividad como agonistas inversos y antagonistas en ensayos de transfecciones transitorias, generaron una respuesta diferente sobre la expresión de algunos de los genes blanco de LXR. Mientras LXR α y SCD-2 disminuyeron su expresión basal en respuesta a CMP1 (65% y 60%, respectivamente), la expresión de SREBP1c fue reprimida por CMP2 (35%). Estos resultados abren la posibilidad de llevar a cabo futuros

RESULTADOS

estudios a fin de caracterizar la posible actividad selectiva de ambos compuestos.

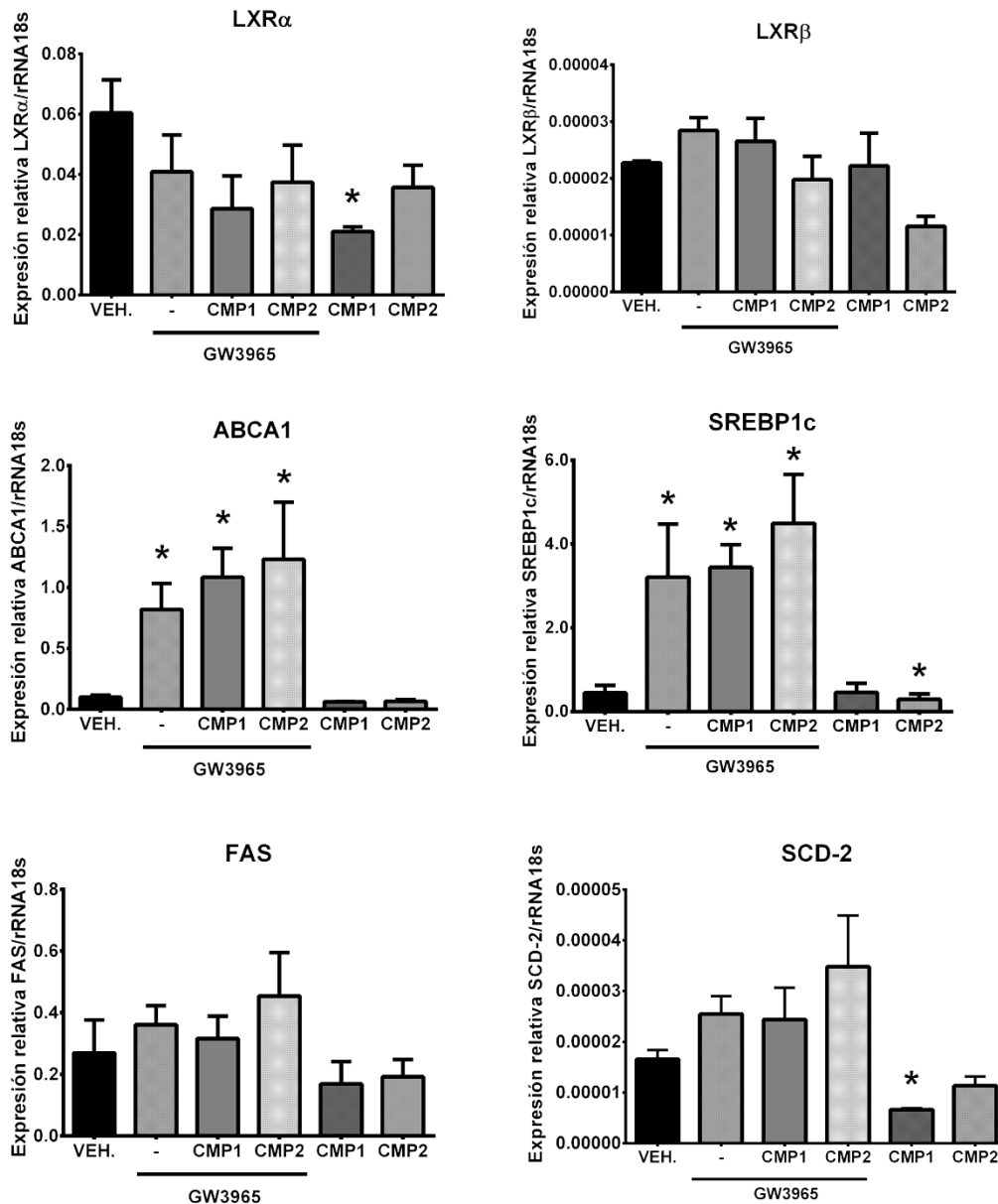


Figura 21. Acción de CMP1 y CMP2 sobre la expresión de genes en células mamarias murinas diferenciadas. Células HC11 competentes y diferenciadas fueron incubadas por 5 hs con el agonista de LXR GW3965 (1 μM) y/o los CMP1 y 2 (10 μM). Luego se determinó el número de copias de los ARNm de LXRα, LXRβ, ABCA1, SREBP1c, FAS, SCD-2, y se normalizaron con los valores de rRNA18s. Las barras indican la Media ± E.E. de tres experimentos independientes (n=3). * indica diferencias significativas (p<0.05).

Trabajos anteriores demostraron que los niveles de la sintasa de ácidos grasos FAS pueden ser regulados en el epitelio mamario a nivel de la traducción¹⁵⁰. Decidimos indagar si los niveles proteicos de FAS cambian cuando se tratan las células HC11 diferenciadas con el agonista GW3965 y los CMP1 y CMP2 (Figura 22). Los resultados muestran que, luego del tratamiento por 48hs con GW3965 [1 μ M], los niveles relativos de la proteína FAS aumentaron. El aumento de los niveles proteicos de FAS fue notable y contrasta con la incapacidad de GW3965 de estimular los ARNm (Figura 21). Por otro lado, este aumento fue inhibido por el cotratamiento con GW3965 más el CMP1 o el CMP2. Si bien estos resultados son aún preliminares, el incremento en los niveles proteicos FAS sugiere que la activación de los LXRs *in vitro* podría regular la síntesis *de novo* de ácidos grasos.

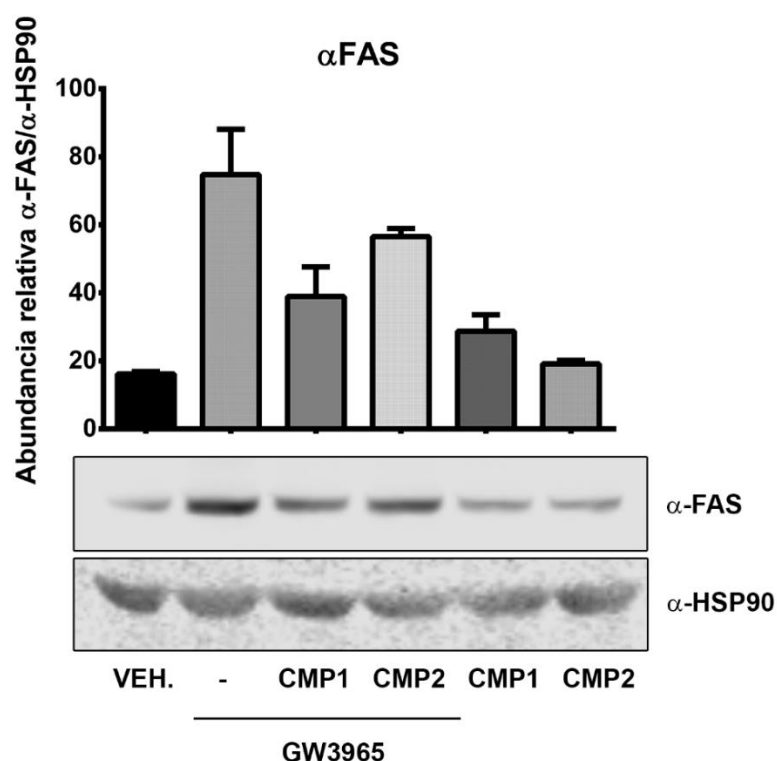


Figura 22. La activación del LXR regularía los niveles proteicos de FAS. Células HC11 competentes y diferenciadas fueron incubadas por 48 h con el agonista de LXR GW3965 (1 μ M) y/o los CMP1 y 2 (10 μ M). Luego se determinó la abundancia proteica de FAS por *western blot* y se normalizaron con los valores de HSP90. Las barras indican la Media \pm E.E. de dos pseudorréplicas de dos experimentos independientes (n=2).

RESULTADOS

9.1.4 Influencia de la activación de los LXR α en la formación de CLDs

Los lípidos de la leche se encuentran encerrados en glóbulos de grasa (MFGs). Estos se forman a partir de la fusión y posterior secreción de CLDs. En las células HC11 diferenciadas se forman CLDs^{167,171}. Considerando que la activación de los LXR α en estas células aumenta la expresión del mensajero de SREBP1c y la proteína de FAS y que ambos cumplen funciones lipogénicas, hipotetizamos que la activación de los LXR α podría afectar la cantidad y/o el tamaño de las CLDs. Para evaluarlo, células HC11 diferenciadas fueron estimuladas por 48 hs con GW3965 y/o los ligandos CMP1 y CMP2, luego incubadas con BODIPY (que tiñe lípidos neutros) y fijadas para su posterior observación (Figura 23).

La activación de los LXR α aumentó significativamente la superficie de CLDs por célula. Este efecto fue bloqueado por la presencia tanto de CMP1 como CMP2. Aún más, el tratamiento con el ligando CMP2 disminuyó 62% la superficie de CLDs por célula respecto al tratamiento control (0.069 ± 0.005 vs. 0.026 ± 0.007 u.a.).

Hasta aquí hemos mostrado que los receptores nucleares LXR α/β se expresan en células epiteliales mamarias murinas diferenciadas, que su activación induce la expresión de ARNm de ABCA1 y SREBP1c, los niveles proteicos de FAS y también el incremento en la superficie de CLDs. En base a la consistente evidencia obtenida de los análisis en cultivo consideramos relevante estudiar la actividad de los LXR α *in vivo* y su posible rol en la síntesis y transporte de lípidos de la leche.

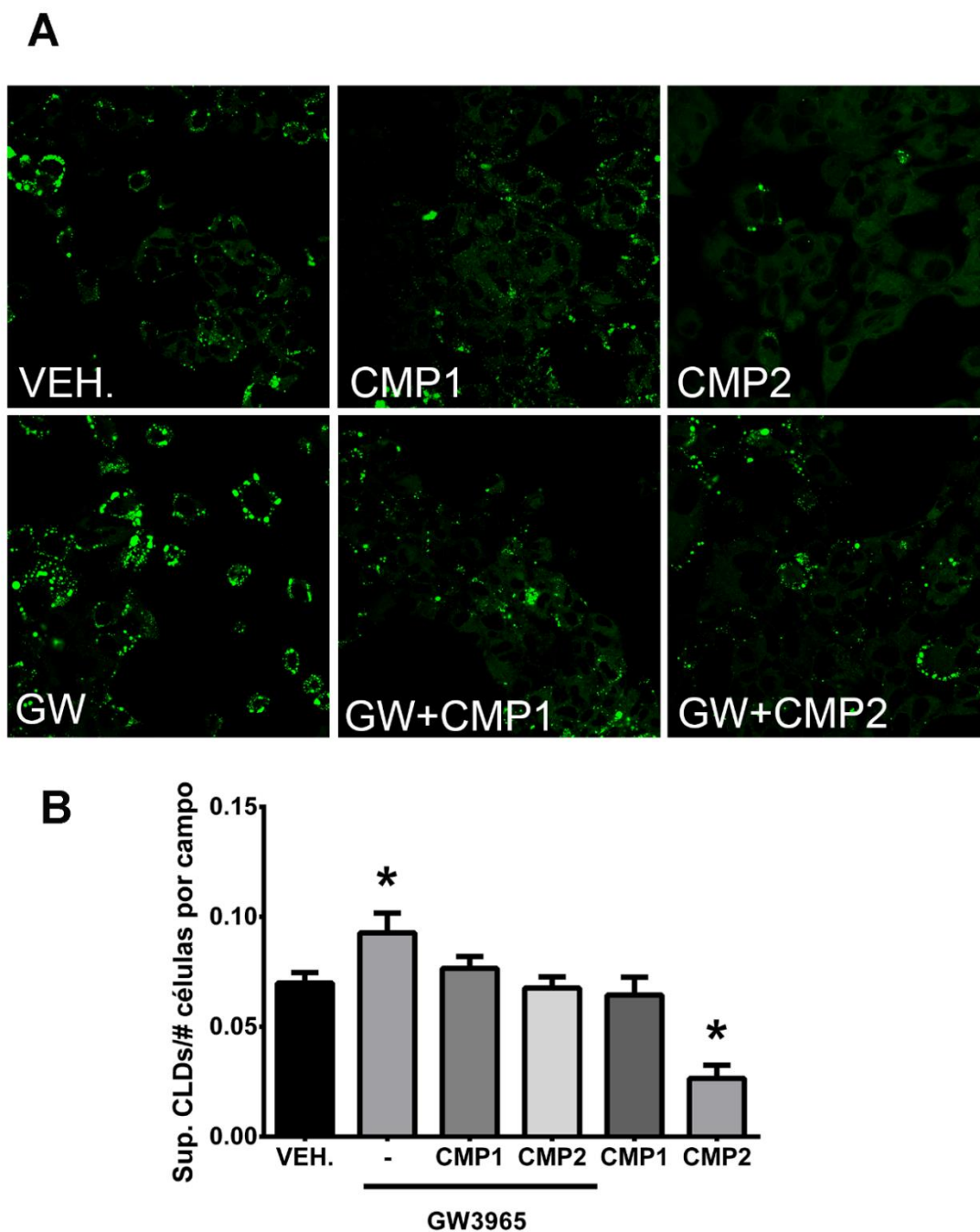


Figura 23. Los LXRs contribuyen a la formación de CLDs. Células HC11 diferenciadas fueron tratadas por 48 hs con GW3965 y/o los compuestos CMP1 y 2. Se fijaron y tiñeron con BODIPY por 1 h a 37 °C. Se muestran una imagen representativa por tratamiento (A) y el gráfico correspondiente a la cuantificación de la superficie de CLDs por célula por campo (B). Se analizaron imágenes correspondientes a 10 campos tomados al azar por réplica. Las barras indican la Media \pm E.E. de tres réplicas biológicas (n=3). * indica diferencias significativas ($p < 0.05$).

9.2 ACTIVIDAD DE LXR IN VIVO

9.2.1 Perfil de expresión de LXR α y LXR β en los diferentes estadios de desarrollo de la Glándula mamaria

9.2.1.1 Análisis de expresión génica en Balb/c

Nos propusimos identificar en una primera instancia si alguna o ambas isoformas del receptor (LXR α y LXR β) se expresan en el tejido mamario normal murino *in vivo* en diferentes estadios reproductivos. Para llevarlo a cabo, ratones hembra de la cepa Balb/c vírgenes, preñadas de 17 días (P17), lactantes de 7 días (Lac7) y post lactantes (a las cuales se les retiró las crías de manera forzada en el día 10 de lactancia) de 24 y 48hs (Inv24 e Inv48) fueron sacrificadas, se les removi6 quirúrgicamente los pares mamarios #4 y #5 y se midieron los niveles de expresión de mensajeros de los receptores LXR α , LXR β y de los blancos ABCA1, SREBP1c y FAS por RT-qPCR (Figura 24).

Tanto LXR α como LXR β se expresan en los lisados totales de glándula mamaria. Al igual que como ocurre con los niveles de ARNm de ABCA1, la expresión de LXR α disminuye drásticamente durante la preñez, se mantiene baja durante la lactancia y luego comienza a aumentar nuevamente en la involución. Por otro lado la expresión de LXR β y SREBP1c se mantiene invariable a lo largo de los distintos estadios reproductivos. Por último los niveles de ARNm de FAS aumentan significativamente durante la lactancia.

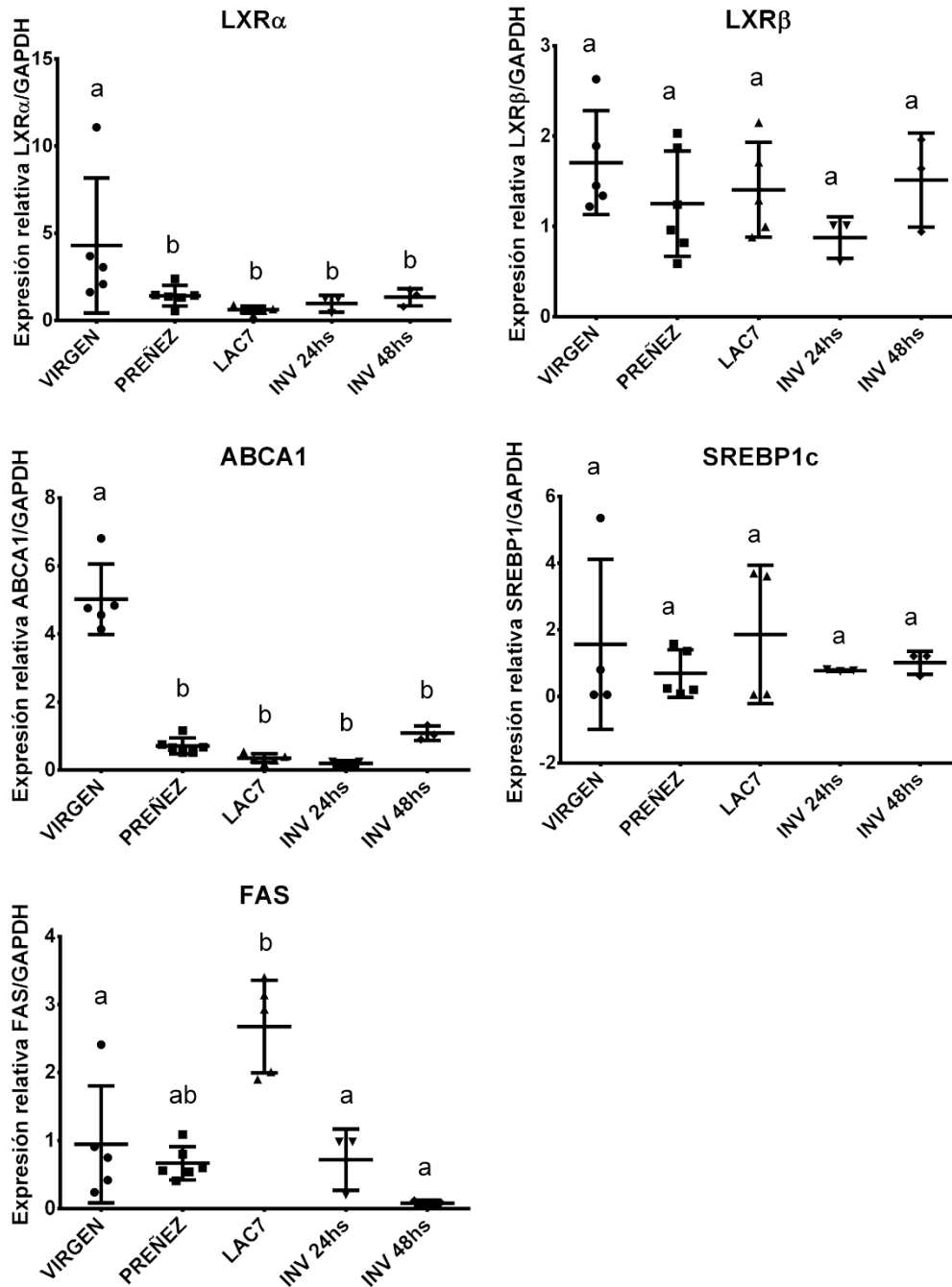


Figura 24. Expresión de genes involucrados en el metabolismo y transporte lipídico en lisados de mamas totales. Análisis de expresión génica por PCR cuantitativa en lisados de glándulas mamarias enteras de ratones hembra Balb/c vírgenes, en el día 17 de preñez, 7 de lactancia y a 24 y 48hs post destete (Involución 24-48 hs). Se grafica las observaciones individuales de expresión de mensajeros de LXR α , LXR β , ABCA1, SREBP1 y FAS para cada estadio relativas a GAPDH y su media \pm E.E. de cómo mínimo 3 individuos por estadio. Letras distintas indican medias significativamente diferentes ($p < 0.05$).

RESULTADOS

9.2.1.2 Análisis de expresión en MECs (C57bl/6j)

Es bien sabido que la glándula mamaria está constituida por múltiples tipos celulares cuya abundancia cambia en función del estadio reproductivo. Si bien durante la lactancia casi la totalidad de la almohadilla grasa es invadida por el tejido epitelial alveolar, también hay presentes adipocitos delipidados, células linfoides, intersticiales y endoteliales. Los resultados obtenidos a partir de la determinación de la abundancia de los ARNm de LXR α y de algunos de sus genes blanco, que se muestran en la Figura 24, sugieren que pueden existir diferencias en la contribución de cada tipo celular al *pool* de ARNm extraído de los lisados de glándula totales^{86,149,158}. Con el fin de estudiar la contribución particular del tejido epitelial mamario procedimos a obtener fracciones enriquecidas en epitelio a partir de glándulas enteras de ratones hembra preñadas y en distintos estadios de lactancia.

Para poder evaluar la abundancia de distintos mensajeros y proteínas específicamente del epitelio mamario, Rudolph *y col.* desarrollaron un método simple, rápido y efectivo para, a partir de glándulas mamarias provenientes de ratones en distintos estadios reproductivos, obtener una fracción enriquecida en células epiteliales mamarias (MECs)¹⁰.

Utilizando este procedimiento, volvimos a determinar los niveles de expresión de los LXR α en ratones hembra de la cepa C57bl/6jFCEN de 17 días de preñez (P17) y en etapas tempranas de lactancia (Lac2, Lac5, Lac7 y Lac10). Los animales fueron sacrificados, se les removió el par mamario #4, se prepararon fracciones enriquecidas con células epiteliales mamarias (MECs) y se obtuvieron extractos de proteínas totales. Evaluamos por *Western blot* la abundancia relativa de los LXR α tanto en los extractos de MECs como en lisados de mama total (Figura 25).

Encontramos que en las fracciones enriquecidas en células epiteliales el LXR α se expresa en la preñez y aumenta conforme avanza la lactancia con un máximo registrado en el día 10 post parto. En cambio, y en coincidencia con los

resultados obtenidos a partir ARNm de muestras de Balb/c, en lisados totales de mama, los niveles proteicos de LXR α son altos al comienzo de la lactancia y luego disminuyen hasta un mínimo en el día 10 de lactancia (Lac10) (si bien existe un incremento en Lac2, no es sostenido en el tiempo). Por el contrario, el LXR β no fue inmunodetectado en fracciones enriquecidas en MECs ni en lisados de mama totales.

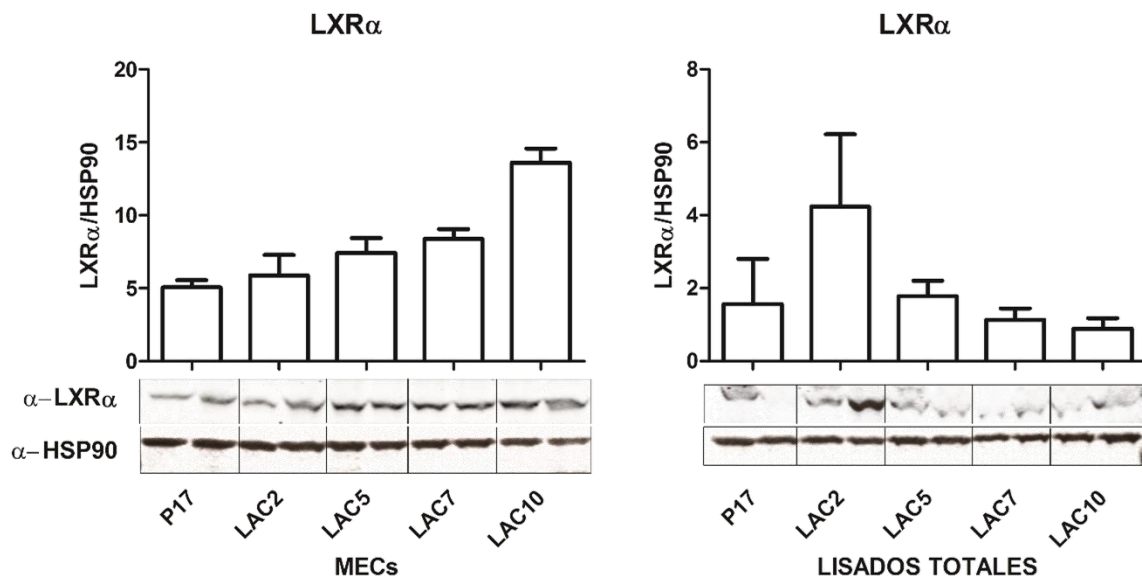


Figura 25. LXR α se expresa en la preñez y aumenta con la lactancia en el epitelio mamario murino. Análisis de los niveles de la proteína de LXR α por *western blot* en fracciones enriquecidas con MECs y en lisados totales de mama durante la preñez tardía y lactancia. Se grafican las su media \pm E.E. de la abundancia relativa a HSP90 de dos muestras independientes por grupo.

Seguidamente, se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia en cortes de glándula mamaria de ratones hembra en diferentes estadios reproductivos (P9, P14, P17 y Lac10) utilizando un anticuerpo que reconoce LXR α (Figura 26).

RESULTADOS

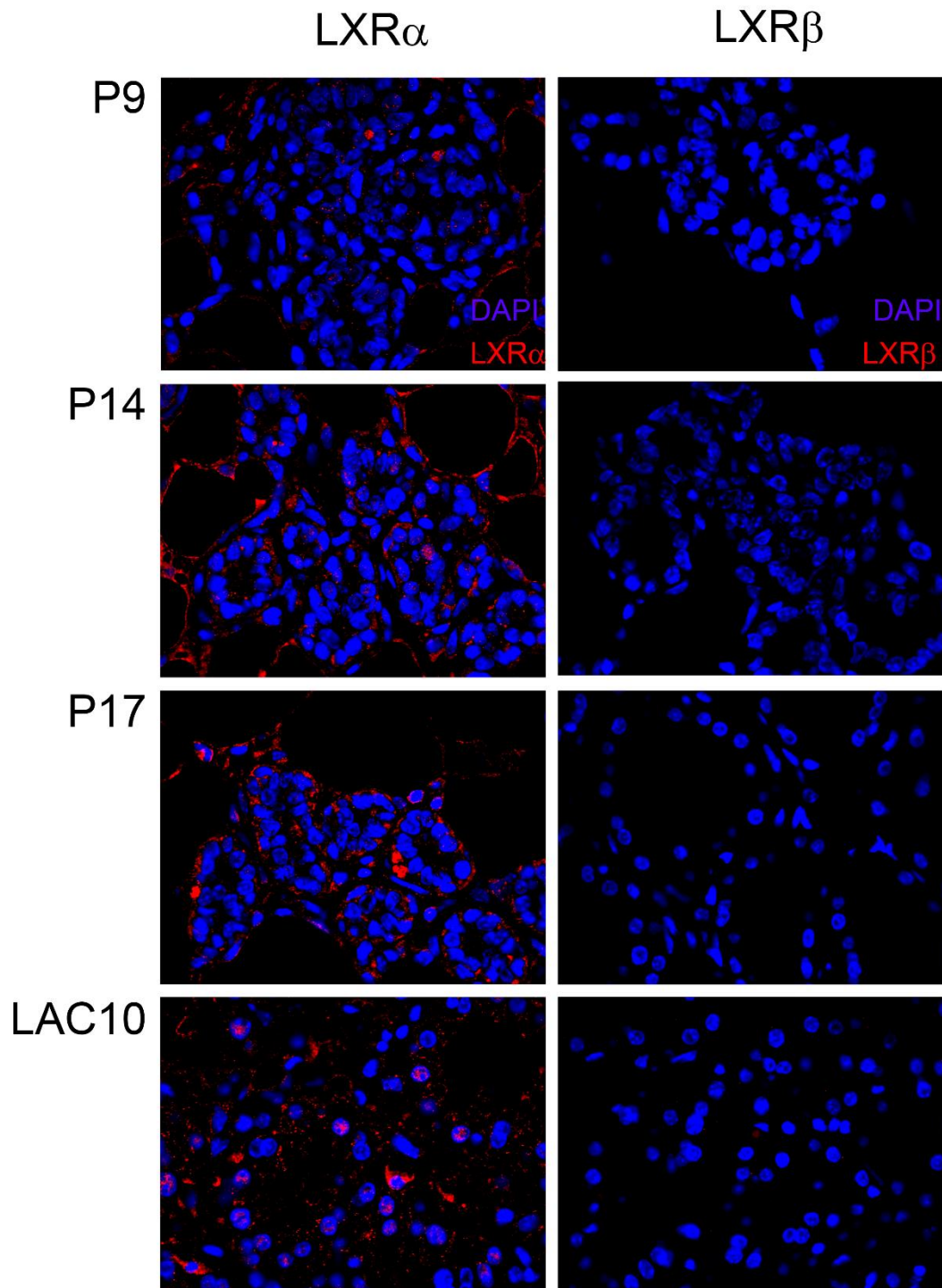


Figura 26. LXR α aumenta en el núcleo de células epiteliales de mamas Lac10. Análisis de localización de LXR α por inmunofluorescencia en cortes de glándulas de ratones hembra de la cepa C57bl/6 j en distintos estadios de desarrollo (preñez de 9, 14 y 17 días y lactancia 10 días). Utilizamos un anticuerpo que reconoce la isoforma α (izq) y β (der.) del LXR (rojo) y DAPI (azul) para teñir núcleos. Se muestran imágenes representativas de 3 individuos de cada estadio.

Encontramos que durante la preñez temprana (P9-14) la señal está enriquecida en el citoplasma del tejido adiposo y no hay detección de LXR α en el compartimento epitelial. Hacia el final de la preñez (P17) se evidencia una mayor señal en la cara basal citoplasmática de las células epiteliales alveolares. Finalmente en el estadio Lac10 detectamos abundantes núcleos de células epiteliales con señal positiva, indicando localización nuclear del receptor. Nuevamente no encontramos señal positiva de LXR β en ninguno de los estadios ensayados.

Se evaluaron también los niveles de expresión de mensajeros de LXR β junto con los de LXR α y PPAR γ a partir de MECs Lac5 (Figura 27). Encontramos que el número de copias promedio de mensajero de PPAR γ duplica los de LXR α en ese estadio (5667.6 ± 1923.2 vs 2068.4 ± 122.6 copias de ARNm) mientras que los de LXR β son significativamente más bajos (430.2 ± 177.6 copias de ARNm). Los bajos niveles de expresión de LXR β son consistentes con la dificultad para detectar la proteína de este receptor en la glándula mamaria murina.

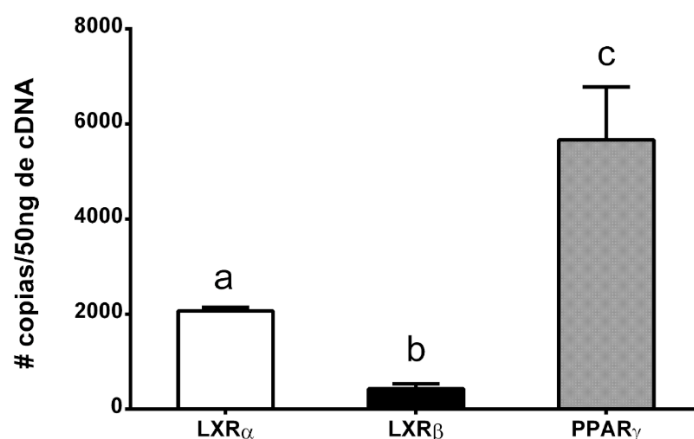


Figura 27. Expresión de LXRs y PPAR γ en MECs Lac5: A partir de 50ng de cDNA se analizó la expresión de LXR α , LXR β y PPAR γ de fracciones enriquecidas en células epiteliales mamarias (MECs) provenientes de hembras Lac5. Las barras indican número absoluto de copias de ARNm de cada gen. Se verificó que el número de copias del gen rRNA18s sea similar en el cDNA de cada réplica. Se grafican las medias \pm E.E., (n=4). Letras distintas indican medias significativamente diferentes (p<0.05).

RESULTADOS

Dado que los niveles de mensajero de PPAR γ en MECs Lac5 son mayores a los de LXR α nos resultó interesante comparar los niveles proteicos de ambos receptores en MECs provenientes de Lac5 y Lac10 (Figura 28), a fin de determinar si existen variaciones en los niveles proteicos de PPAR γ también. Llamativamente, mientras que los niveles de LXR α aumentan 2.3 veces en Lac10 respecto de Lac5, PPAR γ disminuye 6.6 veces.

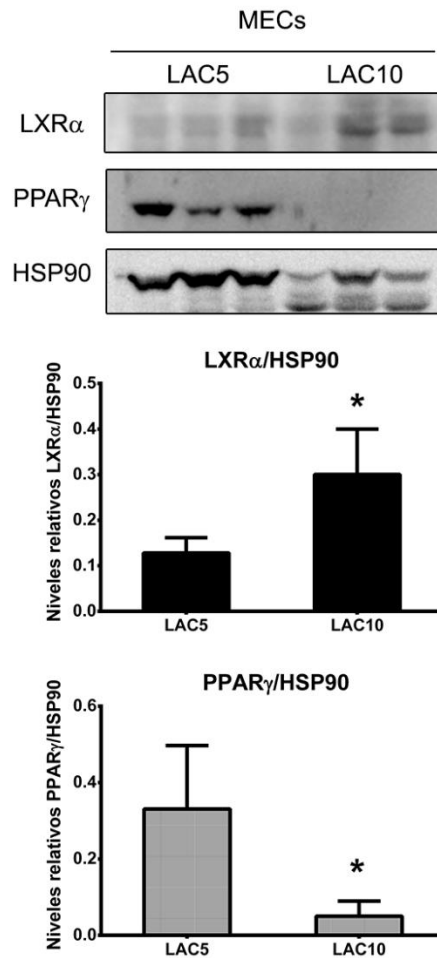


Figura 28. **PPAR γ disminuye con la lactancia en el epitelio mamario murino.** Análisis de los niveles de la proteína de PPAR γ y LXR α por *western blot* en fracciones enriquecidas con MECs provenientes de glándulas Lac5 y Lac10. Se grafican las medias \pm E.E. de la abundancia relativa a HSP90 de tres muestras independientes por grupo (n=3). * indica diferencias significativas (p<0.05).

En resumen, estos resultados sugieren que el LXR α (y no LXR β) se expresa en el epitelio mamario y que su abundancia y localización cambian durante la transición preñez-lactancia y a lo largo de este último estadio. Mientras que los niveles del LXR α aumentan los de PPAR γ disminuyen a lo largo de la lactancia. Durante la preñez el LXR α se localizaría principalmente el tejido adiposo incrementándose progresivamente sus niveles en el compartimento epitelial en estadios avanzados de preñez y durante lactancia. También es interesante destacar que su localización subcelular es principalmente citoplasmática en las células alveolares en P17 pero principalmente nuclear en Lac10.

9.3 ACCIÓN DEL LXR SOBRE LA COMPOSICIÓN DE LÍPIDOS DE LA LECHE

A continuación, se evaluó si el tratamiento con el agonista GW3965 tenía algún efecto sobre la composición de lípidos de la leche. Para eso utilizamos ratones hembra lactantes Lac10. Diez animales se dividieron al azar en dos grupos: i) los tratados con vehículo (VEH) y ii) los tratados con GW3965 (30 mg/kg). Las inyecciones se dieron en el día 9 de lactancia y 24 hs después se realizó la extracción de la leche. Para el análisis, partimos de una fracción lipídica que representaba, en promedio, el 30.8% (m/m) de la leche en el grupo “VEH.” y de 25.5% (m/m) en el grupo “GW3965”. Evaluamos tanto la composición de ácidos grasos del extracto lipídico como el contenido de colesterol total por CG-MASA.

Los resultados mostraron que el perfil de ácidos grasos presentes en la leche de animales tratados con vehículo fue indistinguible del tratado con el agonista comercial (Figura 29). La composición de ácidos grasos se correspondió con el perfil típico observado en otros trabajos ^{150,172,173}, con una gran representación del ácido palmítico (C16:0; 24.5 \pm 1.4%), oleico (C18:1; 22.0

RESULTADOS

$\pm 0.8\%$) y de ácidos grasos de cadena media sintetizados *de novo* en la propia glándula (C8-C14; $31.4 \pm 2.2\%$).

Por otro lado, analizamos el contenido de colesterol total en la leche de ambos grupos y encontramos un incremento significativo en la cantidad determinada, 2.6 ± 0.6 veces más colesterol en la leche proveniente de ratones tratados con GW3965 comparados con el tratamiento control (Figura 30), lo cual sugiere que el aumento de actividad del receptor LXR α durante la lactancia promueve el transporte de colesterol hacia la leche.

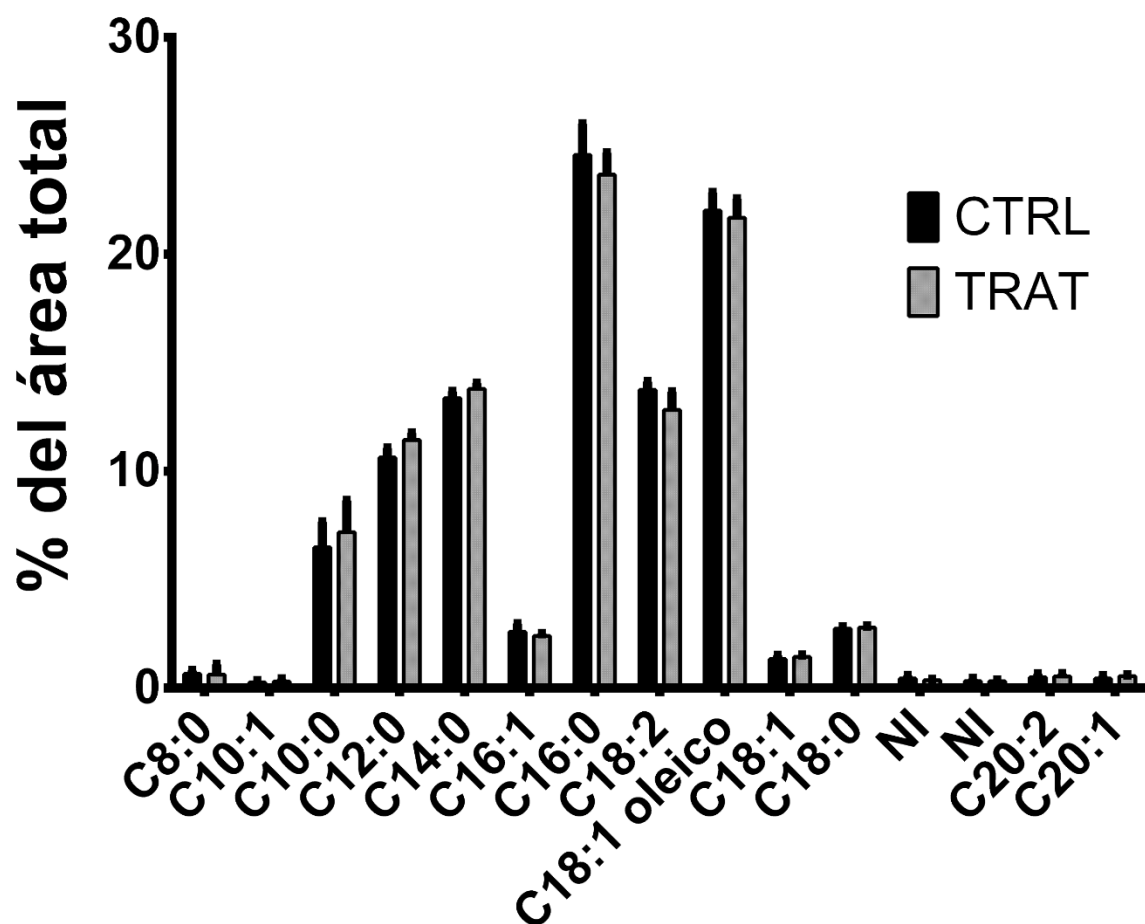


Figura 29. El tratamiento con GW3965 no modifica el perfil de ácidos grasos de la leche. A partir de un extracto de lípidos totales de una muestra de 10mg de leche se derivatizaron los ácidos grasos a esteres metílicos y se analizó la composición de los mismos por CG-MASA. Se grafica el promedio del porcentaje del área de cada ácido graso respecto del total, de 5 individuos por grupo (n=5). Se grafican las medias \pm E.E.

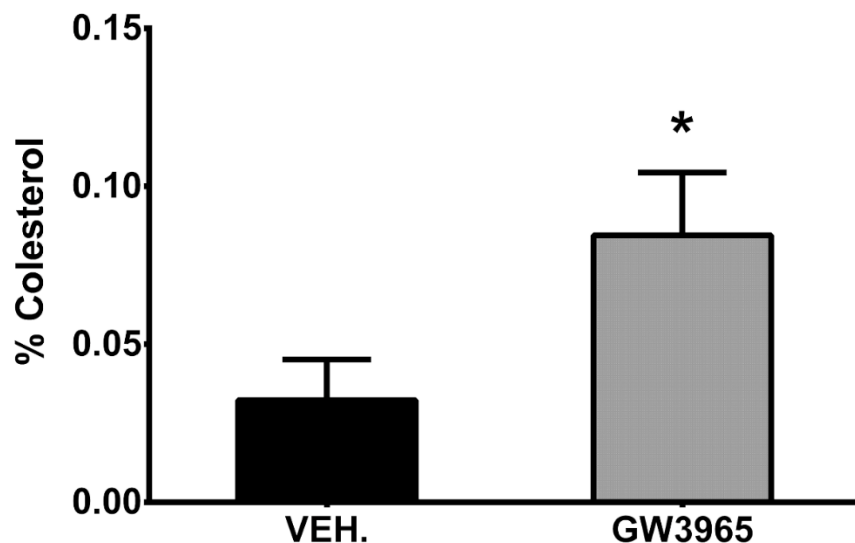


Figura 30. El tratamiento con GW3965 aumenta los niveles de colesterol totales en la leche de hembras Lac10. Se saponificaron los lípidos de una muestra de 2-7mg del extracto de lípidos totales de leche y se trimetilsililaron. Los trimetilsilil-derivados se cuantificaron por CG-MASA utilizando el método de estándar interno (estigmasterol 95%). Se grafica el promedio de los porcentaje de colesterol respecto a los lípidos totales de 5 individuos por grupo (n=5). Se grafican las medias \pm E.E, * indica diferencias significativas ($p < 0.05$).

Seguidamente, evaluamos la expresión de genes blanco de LXRs en MECs extraídas de las glándulas de las hembras control y tratadas *in vivo* con el agonista GW3965 (Figura 31). Luego del tratamiento, los niveles de expresión de los ARNm LXR α y PPAR γ no se modificaron. Llamativamente, tampoco encontramos diferencias en los niveles del transportador de colesterol ABCA1, sin embargo los niveles del factor de transcripción SREBP1c aumentaron notable y significativamente.

RESULTADOS

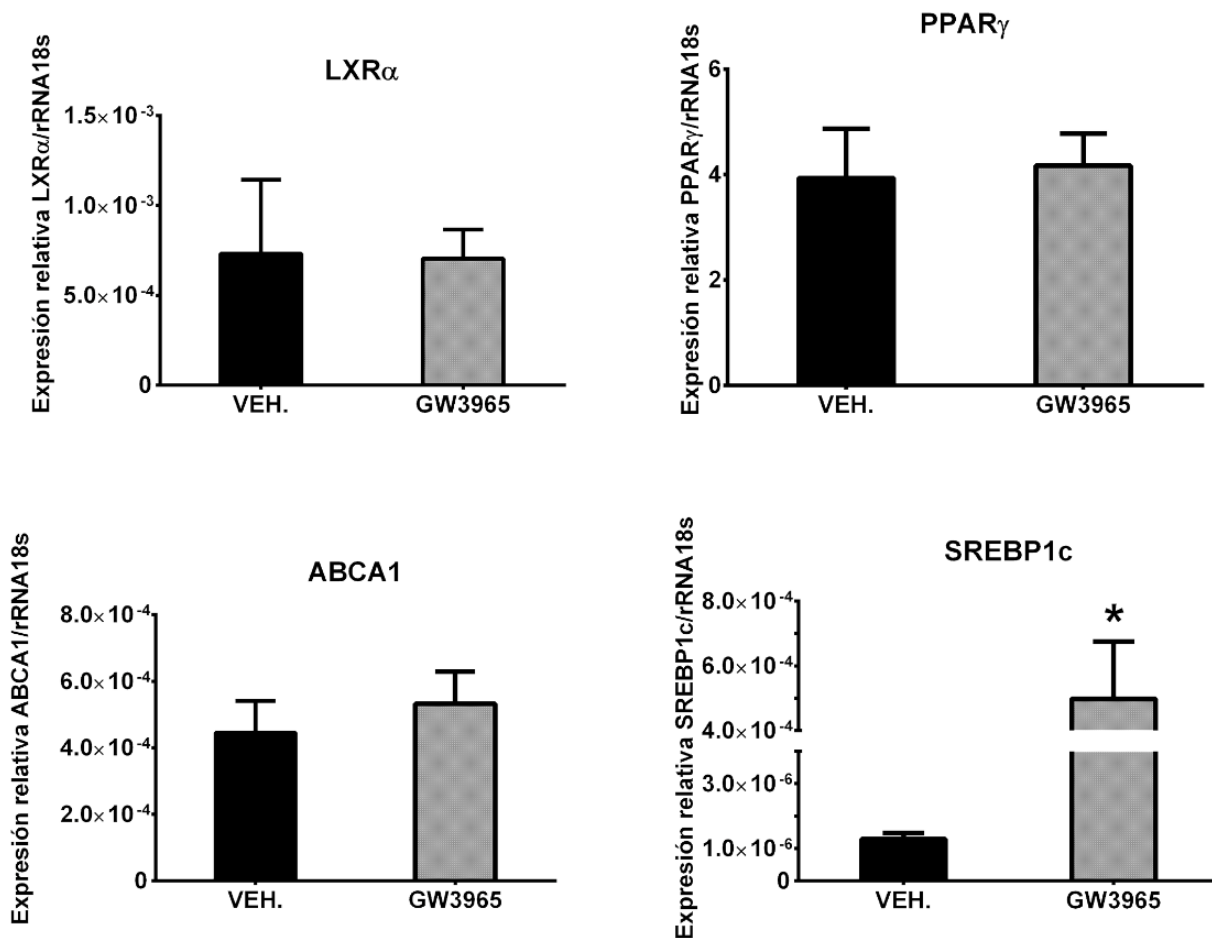


Figura 31. El tratamiento con GW3965 aumenta los niveles de SREBP1c. Se obtuvieron fracciones enriquecidas en MECs de hembras tratadas con vehículo (VEH.) o con GW3965. Se analizó la expresión de ARNm de LXR α , PPAR γ , ABCA1 y SREBP1c, por RT-qPCR. Se grafican las medias \pm E.E del número absoluto de copias de ARNm de cada gen relativizado al número de copias de rRNA18s. n=5. * indica diferencias significativas ($p < 0.05$).

Por último, no observamos cambios en la expresión de FAS tanto a nivel de ARNm como en sus niveles proteicos (Figura 32). Este resultado es coherente con la falta de modulación en el perfil de ácidos grasos en ratones tratados con el agonista del LXR α , y sugiere que el tratamiento con el GW3965 no altera la síntesis *de novo* de ácidos grasos en hembras Lac10.

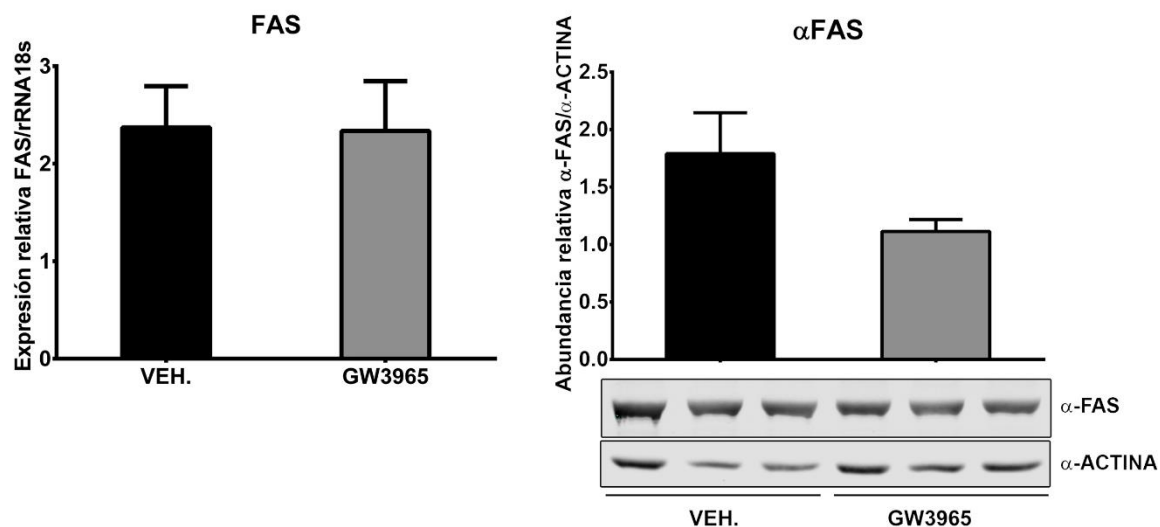


Figura 32. El tratamiento con GW3965 no modifica los niveles de transcritos y proteína de FAS. Se obtuvieron fracciones de MECs de hembras tratadas con vehículo (VEH.) o con GW3965. Se analizó la expresión de ARNm de FAS por RT-qPCR (Izq., n=5) y la abundancia proteica (Der., n=3).

9.4 ACTIVIDAD DEL LXR EN MECs

Con el objetivo de evaluar la actividad del LXR α en forma directa y específica sobre el epitelio mamario murino, diseñamos un protocolo que permitiría ensayar a partir de un solo par mamario de un ratón hembra los efectos de los distintos ligandos de LXR sobre la expresión de genes blanco (Figura 12, ver sección 8.14). Además, este procedimiento tenía la intención de poder ensayar varios tratamientos en simultáneo y minimizar la cantidad de droga y el número de ratones utilizados por ensayo. Se obtuvieron fracciones enriquecidas en MECs a partir de glándulas #4 de hembras Lac5 y se incubaron por 3 hs con concentraciones crecientes de GW3965 (Figura 33). Finalizadas las incubaciones, se obtuvo ARNm total y se evaluó la expresión de los receptores LXR α , y PPAR γ y los genes blanco ABCA1, SREBP1c y FAS.

RESULTADOS

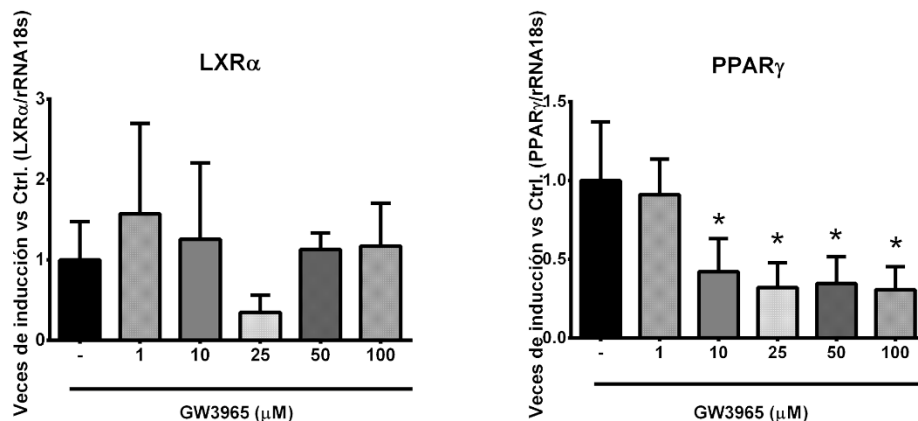


Figura 33. Actividad del LXR en MECs Lac5: receptores nucleares. Fracciones enriquecidas en células epiteliales mamarias (MECs) provenientes de hembras Lac5 se incubaron durante 3hs con GW3965 1, 10, 25, 50 y 100 μ M. A partir de 50ng de cDNA se analizó la expresión de LXR α y PPAR γ . Se grafican las medias \pm E.E de las veces de inducción con respecto al control con vehículo (-, DMSO) y fueron calculados como número absoluto de copias de ARNm de cada gen relativizado al número de copias de rRNA18s. , n=4. * indica diferencias significativas (p<0.05).

Los niveles de LXR α no cambiaron con las distintas concentraciones de GW3965, sin embargo los mensajeros de PPAR γ disminuyeron significativamente a partir de 10 μ M (Figura 33). Este resultado sugiere que LXR α podría regular negativamente los niveles de PPAR γ en células epiteliales mamarias murinas.

Con respecto a los genes blanco de LXRs, no encontramos diferencias significativas en los niveles de expresión tanto de ABCA1, SREBP1c o FAS (Figura 34). Los niveles de expresión de cada tratamiento fueron altamente variables entre réplicas, y en consecuencia no podemos afirmar que la incubación con GW3965 haya modulado la síntesis de ARNm de ninguno de los tres blancos del LXR evaluados bajo estas condiciones experimentales.

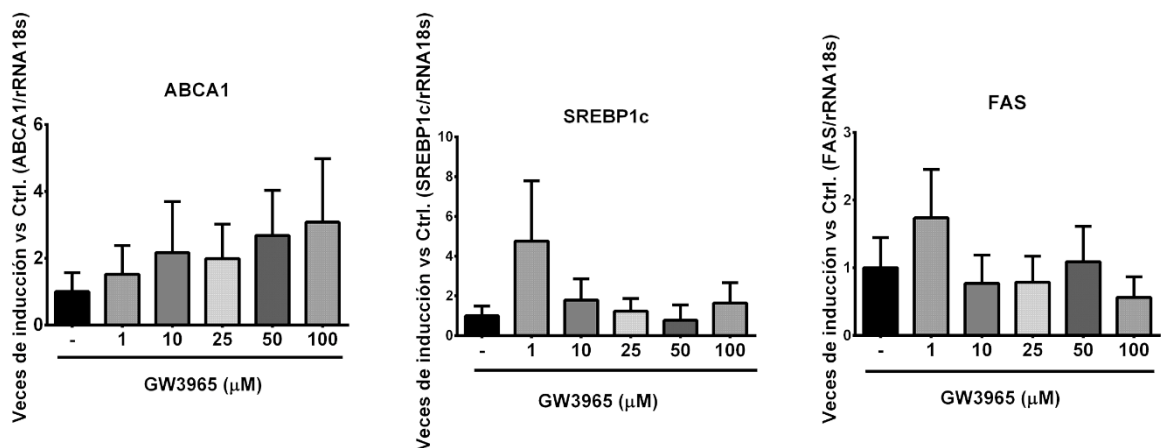


Figura 34. Actividad del LXR en MECs Lac5: genes blanco de LXR α . Fracciones enriquecidas en células epiteliales mamarias (MECs) provenientes de hembras Lac5 se incubaron durante 3hs con GW3965 1, 10, 25, 50 y 100 μ M. A partir de 50ng de cDNA se analizó la expresión de ABCA1, SREBP1c y FAS. Se grafican las medias \pm E.E de las veces de inducción con respecto al control con vehículo (-, DMSO) y fueron calculados como número absoluto de copias de ARNm de cada gen relativizado al número de copias de rRNA18s., n=4. * indica diferencias significativas ($p < 0.05$).

En base a estos resultados concluimos que, si bien aún no hemos podido reproducir los resultados que obtuvimos *in vivo*, este diseño experimental es prometedor ya que permitiría ensayar distintos ligandos en forma simultánea y con menores costos.

10 DISCUSIÓN

Durante la lactancia la glándula mamaria produce y secreta una gran cantidad de lípidos en forma de TGs y ésteres de colesterol para satisfacer las demandas del neonato. En particular, el epitelio alveolar mamario regula la captación de sustancias desde el tejido intersticial, el transporte intracelular, el almacenamiento, la síntesis *de novo* de nuevas moléculas y la secreción hacia el lumen alveolar. Estos procesos deben estar finamente controlados ya que desbalances en cualquiera de ellos pueden tener consecuencias en la composición de la leche y, por lo tanto, en el desarrollo del neonato. Si bien los mecanismos involucrados en la síntesis de proteínas de la leche fueron ampliamente estudiados en numerosos trabajos a fines de los '90 ^{11,87,88}, las investigaciones orientadas a dilucidar como se regula la síntesis y transporte de lípidos son más recientes y todavía hay muchos esfuerzos por realizar por intentar comprenderlos.

Los LXRs son factores de transcripción que actúan como sensores de esteroides modulando la expresión de genes cuyos productos están involucrados en inhibir la acumulación del exceso de colesterol en el organismo, disminuyendo su absorción y aumentando su transporte reverso y su catabolismo ¹⁷⁴. Un incremento en los niveles de colesterol libre intracelular aumenta proporcionalmente la abundancia de oxisteroides ^{145,146} que son a su vez ligandos de los LXRs ⁹⁸. En ese sentido, la activación de la vía de los LXRs por metabolitos de colesterol estimula la expresión de varios transportadores de la familia de los ABCs favoreciendo el eflujo de colesterol desde tejidos periféricos hacia el hígado ^{113-115,165,175-177}. Luego, los LXRs hepáticos estimulan por un lado la excreción del colesterol ^{100,178} y, por el otro, la síntesis y acumulación de TGs ^{179,180}. Es decir que estos receptores regulan la homeostasis lipídica del

DISCUSIÓN

organismo aumentando la excreción del exceso de colesterol y favoreciendo la acumulación de TGs ¹⁸¹.

Considerando que la composición de lípidos en la leche materna es vital para el normal desarrollo del neonato y la capacidad de los LXRs de regular la homeostasis lipídica, en este trabajo nos preguntamos si los LXRs se expresan en el epitelio mamario murino y si regulan la síntesis *de novo* de lípidos y/o su transporte a la leche durante la lactancia.

10.1 EXPRESIÓN DE LOS LXRS EN EL EPITELIO MAMARIO MURINO

Análisis de microarreglos de expresión de mensajeros a partir de lisados de glándula totales de ratones hembra FVB mostraron que los LXRs se expresan en este órgano ⁸⁶. De acuerdo con estos estudios, los niveles de expresión de LXR α son altos en la preñez pero disminuyen al momento del parto y continúan bajos durante la lactancia mientras que los de LXR β se mantienen constante a lo largo de los distintos estadios reproductivos. En este trabajo de Tesis se validó lo observado por Rudolph *y col.* mediante ensayos de RT-qPCR. Se observaron; cambios en los niveles de expresión de mensajeros de LXR α y mantenimiento de los niveles de LXR β en lisados de glándula totales de ratones Balb/c en distintos estadios reproductivos. También, en paralelo al desarrollo de esta Tesis, O. Mani *y col.* hallaron que los niveles de LXR α disminuyen a lo largo de la lactancia en lisados totales de glándula mamaria ⁸² y Y. Fu *y col.* detectaron la presencia de la proteína de LXR α en lisados totales de mama de ratones entre el día 5 y 7 de lactancia.

Como es bien sabido, la glándula mamaria es un órgano compuesto por múltiples tipos celulares cuya abundancia relativa cambia en función del estadio reproductivo. Si bien el tejido epitelial es el más abundante en la glándula durante la lactancia, todos los tipos celulares presentes en el intersticio (como adipocitos delipidados, endotelio, tejido linfático, etc.) contribuyen al *pool* de ARNm y

proteínas que se obtiene cuando se parte de lisados totales de la glándula, sin previo enriquecimiento en determinado tipo celular. En ese sentido, es probable que, por ejemplo, los altos niveles de ARNm de LXR α que hallamos en glándulas de hembras preñadas puedan deberse no sólo a su expresión en el epitelio mamario sino también al aporte elevado de adipocitos y en menor medida de tejido endotelial ^{72,182,183}. Es por ello que varios autores sugirieron que, para estudiar procesos que ocurren en el epitelio mamario es conveniente realizar un paso previo de purificación ya que la contribución de otro tipo celular al *pool* de ARNm o proteínas puede enmascarar variaciones ocurridas en las células epiteliales ^{72,158}. Tomando esta precaución, continuamos nuestro trabajo realizando el análisis de expresión de los LXRs y de sus blancos moleculares, partiendo de fracciones enriquecidas en MECs obtenidas de glándulas en distintos estadios a fin de estudiar su rol específicamente en ese tipo celular.

Primeramente decidimos evaluar los niveles proteicos de los LXRs desde la preñez tardía (P17) hasta el día 10 de lactancia (Lac10) en fracciones enriquecidas de células epiteliales mamarias y encontramos que este receptor se expresa en el epitelio mamario durante la preñez y aumenta durante la lactancia, llegando a un máximo de abundancia en MECs de glándulas Lac10. También, si bien es una observación cualitativa, encontramos que esta proteína se encuentra preponderantemente en el citoplasma del epitelio mamario en cortes de mamas P17 mientras que el epitelio de Lac10 presenta abundante señal nuclear, sugiriendo mayor actividad como factor de transcripción durante ese estadio. Consistentemente, hallamos que en la línea celular de epitelio mamario murino HC11 aumenta la expresión de mensajeros de LXR α durante el proceso de diferenciación. Por otro lado, si bien detectamos que la abundancia de ARNm del LXR β también aumenta en HC11 durante la competencia, sus niveles de expresión tanto en esta línea celular como en MECs son muy bajos con respecto a LXR α .

En este trabajo demostramos por primera vez que el LXR α se expresa en el epitelio mamario murino al final de la preñez y que su abundancia aumenta

DISCUSIÓN

conforme avanza la lactancia. Estos resultados sugieren que la isoforma α del LXR podría jugar un papel clave durante la lactancia murina.

10.2 EXPRESIÓN DE PPAR γ EN EL EPITELIO MAMARIO MURINO

Al igual que los LXRs, PPAR γ está involucrado en el control de la biosíntesis y metabolismo de lípidos ¹⁵¹. PPAR γ orchestra la diferenciación de adipocitos y es blanco de distintos fármacos como por ejemplo Rosiglitazona (aprobado por la FDA ¹⁸⁴) y Tioglitazona utilizados para el tratamiento de diabetes tipo 2 ^{185–190}. Sus ligandos endógenos son ácidos grasos de cadena larga y sus derivados como prostaglandinas y eicosanoides. En los análisis de expresión en lisados totales de glándula mamaria en distintos estadios PPAR γ acompaña los cambios observados en los niveles de LXR α ^{82,86}. Nosotros encontramos que los niveles de PPAR γ disminuyen notablemente de Lac 5 a Lac10 mientras que entre esos estadios los de LXR α aumentan. Aún más, la incubación de MECs Lac5 con GW3965 en concentraciones mayores a 1 μ M disminuyó los niveles de ARNm de PPAR γ significativamente, sugiriendo una acción represora de LXR α sobre la expresión de este factor de transcripción. Por qué disminuyen los niveles de PPAR γ durante la lactancia es un interrogante interesante de indagar ya que no encontramos antecedentes de que los LXRs regulen negativamente la expresión de ese receptor.

Para regular la expresión de sus genes blanco LXR α y PPAR γ heterodimerizan con un receptor común, el RXR α . La presencia simultánea y en abundancias similares de ambos receptores podría resultar en una mutua competencia por la heterodimerización con RXR α y, en consecuencia, en una modulación cruzada de la expresión de genes blanco de cada receptor. Se ha demostrado que este tipo de mecanismo competitivo ocurre en cultivos primarios de hepatocitos entre el LXR α y PPAR α . La activación farmacológica del LXR α bloquea la actividad del otro receptor y viceversa; sin embargo este efecto es revertido por la sola sobreexpresión de RXR α , indicando que este mecanismo

en parte puede ser explicado por la competencia entre el LXR α y PPAR α por el RXR α ^{191,192}.

El único antecedente del que tengamos conocimiento donde se evaluaron los niveles de RXR α en glándula mamaria durante la lactancia proviene de análisis de microarreglos de expresión de lisados de glándulas totales murinas ⁸⁶. Si bien ese trabajo se muestra que los niveles de RXR α se mantienen constantes a lo largo de la preñez-lactancia, consideramos que es necesario evaluar en futuros estudios los niveles de expresión y abundancia proteica de este receptor estrictamente en MECs a lo largo de los distintos estadios reproductivos.

Respecto de la acción cruzada que puedan tener LXR α y PPAR γ , en un elegante trabajo, M. Morroni y *col.* demostraron que los adipocitos presentes en el intersticio mamario son capaces de “transdiferenciarse” a células epiteliales secretoras y viceversa, células epiteliales alveolares pueden diferenciarse a adipocitos en glándulas post-lactantes ¹⁹³. Dado que PPAR γ es un factor clave en la diferenciación y desarrollo de los adipocitos ^{194,195} su represión durante la lactancia podría estar relacionada con disminuir el proceso de transdiferenciación de células epiteliales a adiposas. Aún más, para diferenciar las HC11 hacia un fenotipo secretor es necesario crecerlas hasta confluencia en presencia del factor de crecimiento epidérmico (EGF), que luego debe ser removido debido a su acción inhibitoria del proceso de diferenciación de las células HC11. Nuestros resultados muestran que la expresión del LXR α aumenta luego de la remoción de EGF del cultivo, mientras que el mantener presente a este factor de crecimiento previene su incremento. Si bien estos resultados requieren de futuros estudios, sugieren que el LXR α podría estar involucrado en la diferenciación del epitelio mamario murino. Hipotetizamos que el equilibrio en la abundancia relativa entre LXR α y PPAR γ puede jugar un papel clave en el balance celular en la glándula mamaria entre epitelio y adipocitos.

10.3 REGULACIÓN DEL COLESTEROL DE LA LECHE

A nuestro criterio, el mayor hallazgo de este trabajo de Tesis es haber determinado cambios en el porcentaje de colesterol presente en la leche materna en respuesta a la activación del LXR en epitelio mamario en lactancia. En efecto, el tratamiento con el agonista GW3965 en hembras Lac10 aumenta casi tres veces los niveles de colesterol en la leche.

Este incremento en el porcentaje de colesterol, producto del tratamiento con el agonista de los LXRs podría ser consecuencia de: a) un efecto directo del receptor, induciendo la expresión de proteínas involucradas en el transporte de colesterol o b) un efecto indirecto, regulando otros procesos celulares que conducen a un aumento del *pool* intracelular de colesterol (ya sea por un incremento en la captación desde el torrente sanguíneo o por síntesis *de novo*) que a su vez contribuya a su esterificación y posterior secreción al lumen alveolar.

Como mencionamos anteriormente existen tres mecanismos propuestos de transporte del colesterol a través de las MECs hacia el lumen alveolar: i) transporte pasivo a través de la membrana plasmática, ii) el transporte activo que involucra miembros de la familia de los *ATP-binding cassette* (ABC) o iii) el transporte como ésteres de colesterol contenidos los CLDs que luego formarán los MFGs⁷² (Figura 5).

- i) En cuanto al transporte pasivo, el colesterol libre intracelular difunde por la membrana y luego puede unirse o no a proteínas *carrier* (como BSA) presentes en la leche. Ha sido demostrado que existe pasaje de H³-colesterol a través de membranas de cultivos primarios de MECs bovinas cuando el medio contiene BSA y esto ocurre aún en presencia de probucol, un inhibidor de ABCA1^{72,78}. Sin embargo este mecanismo ha sido poco estudiado y nosotros no lo hemos abordado en esta Tesis.

- ii) El transporte activo mediado por proteínas de la familia de los ABC ha sido estudiado con más detalle ^{78,82,196}. Con gasto de ATP, estos transportadores catalizan el pasaje de colesterol libre desde el citoplasma a aceptores apoproteicos. Algunos miembros de la familia de los ABC fueron detectados en el epitelio secretor de glándulas murinas y bovinas ⁸² e inclusive en los MFGs de leche vacuna ¹⁹⁶. Aún más, se ha encontrado ApoA1 en la leche humana y bovina ¹⁹⁷⁻¹⁹⁹ y también se detectó un eflujo de colesterol tanto desde la cara basolateral como apical en MECs bovinas crecidas en *transwell* ⁷⁸. Nuestros resultados indican que la activación de los LXRs aumenta significativamente los niveles de ARNm de ABCA1 en HC11 diferenciadas; sin embargo, no encontramos diferencias en la expresión de este transportador en MECs de ratones hembras Lac10 luego del tratamiento con GW3965. De todas formas no podemos descartar que sí haya habido cambios en los niveles proteicos de este o de alguno de los otros transportadores (como ABCG1 o ABCA7 ⁸²) en respuesta al agonista de LXRs, análisis aún pendiente de realizar.

Por último, es posible que en respuesta al GW3965 haya aumentado la proporción de ésteres de colesterol en los CLDs. Nuestros resultados muestran que en las HC11 diferenciadas la incubación con GW3965 aumenta la superficie ocupada por los CLDs sugiriendo un incremento en la cantidad de lípidos neutros incluidos en estas estructuras; pero aún queda pendiente evaluar si hubo aumento en los niveles de TGs, de ésteres de colesterol o de ambos en respuesta al agonista de LXRs.

Un aumento del *pool* de colesterol libre intracelular desplazaría el equilibrio hacia su esterificación (mediante un incremento en la actividad de la enzima acetilcoA carboxilasa-colesteryl liasa (ACAT)) y posterior secreción en MFGs. Es decir que la estimulación de la actividad de la ACAT o de mecanismos que aumenten la cantidad de colesterol intracelular favorecería su posterior salida hacia la leche. Como al momento no hay evidencias que la actividad del LXR α module la expresión o actividad de ACAT, al menos directamente, un aumento en la

DISCUSIÓN

captación de colesterol o un incremento en su síntesis *de novo* en las MECs podría explicar el aumento de colesterol en la leche observado. Con respecto a la captación de colesterol, Ishimoto y *col.*²⁰⁰ demostraron que la activación del LXR aumenta la expresión del receptor de LDL (LDLr) en células hepáticas, vía estimulación del sitios LRE presentes en su promotor. En contraposición, Zelcer y *col.*¹¹¹ demostraron que el LXR disminuye la captación de colesterol dependiente del LDLr por la vía LXR-Idol (*inducible degrader of the LDLr*). LXR induce la expresión de Idol que a su vez cataliza la ubiquitinación del LDLr y su posterior degradación. Es menester entonces evaluar los niveles del receptor de LDL en MECs de ratones tratados con GW3965.

Con respecto a la influencia de LXR sobre la síntesis de colesterol al momento tampoco hay consenso. Algunos autores demostraron que la actividad del LXR estimula la síntesis *de novo* -aunque probablemente por mecanismos indirectos-²⁰¹ mientras que otros autores mostraron que la activación del LXR en hígado de ratón regula negativamente la expresión de dos enzimas claves en la biosíntesis de colesterol como la HMG-CoA sintasa y la escualeno sintasa²⁰². En ese sentido, aún queda por explorar la contribución de cada uno de estos mecanismos sobre el incremento en los niveles de colesterol en la leche materna, disparados por el LXR α presente en las MECs.

En un contexto fisiológico, es probable que todos estos mecanismos estén ocurriendo de manera integrada a fin de contribuir a la homeostasis lipídica. El aumento de colesterol intracelular durante la lactancia activaría al LXR y favorecería su transporte hacia la leche. Esto contribuiría a una disminución de colesterol intracelular provocando un incremento en los niveles de SREBP2, un factor de transcripción maestro involucrado en la inducción de proteínas que participan en la síntesis de colesterol, perteneciente a la familia de los SREBPs. SREBP2 aumenta cuando disminuyen los niveles de colesterol hepáticos²⁰³ mientras que ratones que sobreexpresan SREBP2 tienen aumentada la

biosíntesis de colesterol por inducción de la expresión de la HMG-CoA reductasa

204

En lisados totales de glándula mamaria es otra la isoforma de SREBPs, la SREBP1c, que se expresa con mayor abundancia y que a diferencia de SREBP2 está involucrada en el control de la expresión de enzimas que catalizan la síntesis de TGs. Sin embargo, aún se desconoce la abundancia de SREBP2 en MECs durante la lactancia y por lo tanto su importancia en el control de los niveles de colesterol. En esta Tesis, si bien encontramos que el tratamiento con GW3965 aumenta significativamente los niveles de SREBP1c, al momento tampoco hallamos evidencias que este factor de transcripción esté involucrado en el aumento de colesterol en la leche. Aún nos queda por analizar la expresión de SREBP2 en MECs en respuesta al agonista de LXR.

En resumen, los mecanismos responsables del aumento en los niveles de colesterol en la leche luego del tratamiento con GW3965 aún no lo hemos dilucidado. Sin embargo, identificamos varios candidatos para evaluar en un futuro, como los niveles proteicos de los transportadores ABCA1, ABCG1 y ABCA7, el LDLr, ACAT, SREBP2 y las actividades de la HMG-CoA sintasa y la reductasa.

10.4 REGULACIÓN DE LOS NIVELES DE ÁCIDOS GRASOS EN LA LECHE

J. McFadden & A. Corl y más tarde K. Harvatine y col., demostraron que los LXRs se expresan en líneas celulares mamarias bovinas y que el tratamiento con el agonista comercial T0901317 aumenta la expresión de SREBP1c y FAS y, consistentemente, la síntesis *de novo* de ácidos grasos, determinada por incorporación de ^{14}C ^{144,205}. En esta Tesis demostramos por primera vez en una línea celular epitelial mamaria murina –HC11- que la activación del LXR en células diferenciadas también aumenta los niveles de mensajeros del factor de transcripción SREBP1c y de la proteína FAS. Además, este aumento estaría asociado a un incremento en la superficie de gotas lipídicas citoplasmáticas que

DISCUSIÓN

encierran TGs y ésteres de colesterol. Junto con la expresión de β -Caseína al comienzo de la preñez y de WAP cerca de la mitad, la presencia de CLDs es una marca de diferenciación del epitelio mamario y de capacidad de síntesis lipídica³. El tratamiento con el agonista del LXR aumenta la superficie de CLDs en células diferenciadas, sugiriendo que la activación del receptor estimula la síntesis de lípidos.

A diferencia de lo que esperábamos, no encontramos evidencias que demuestren que el tratamiento con GW3965 en hembras Lac10 produzca cambios el perfil de ácidos grasos de la leche. No observamos variaciones en el porcentaje de los ácidos grasos de cadena mediana ni de los de cadena larga respecto del total lípidos. Si bien sí hallamos un notable incremento en los niveles de SREBP1c, factor de transcripción responsable de la inducción de proteínas involucradas en la lipogénesis, la abundancia relativa de ARNm y proteína FAS no se vieron modificadas luego del tratamiento con GW3965, sugiriendo que el agonista no tiene un efecto en la síntesis *de novo* de ácidos grasos en MECs Lac10 en las condiciones ensayadas. Como se mencionó anteriormente, Rudolph y *col.* demostraron que SREBP1c es la isoforma de SREBPs que más se expresa en lisados totales de glándulas de ratones hembra preñadas y lactantes y que el porcentaje de ácidos grasos de cadena media (producto de la síntesis *de novo*) es máximo en leche de hembras Lac10¹⁵⁰. Para estudiar su rol en la formación de lípidos de la leche, estos autores generaron un ratón *knock out* de SCAP (SREBF cleavage-activating protein) específico del epitelio mamario. Esta proteína es necesaria para activar a los SREBPs. La sola falta de SCAP (y por consiguiente de SREBP1c activo) disminuye un 25% los niveles de los ácidos grasos de cadena media en la leche y la expresión de enzimas lipogénicas como la FAS, SCD-2 y el transportador SLC25a1 en MECs de respecto del ratón WT. En función de estos antecedentes hipotetizamos que durante el día 10 de lactancia la maquinaria destinada a la síntesis *de novo* de ácidos grasos podría estar saturada y la actividad del LXR α no sería un factor limitante ya que un incremento en la misma (con la subsecuente inducción de la expresión de SREBP1c) no logran modular positivamente la ya elevada

expresión de FAS. En MECs de hembras Lac10 hay en promedio $3.3 \times 10^8 \pm 5.4 \times 10^7$ copias de ARNm de FAS en 100ng de cDNA, una cantidad equivalente a la expresión de rRNA18s, probablemente uno de los ARNs más abundante en células eucariotas ($5.9 \times 10^8 \pm 1.1 \times 10^7$ copias de ARN).

Estos resultados ponen en evidencia la necesidad de evaluar el efecto de anular la actividad o expresión de LXR α en las MECs durante la lactancia a fin de determinar la relevancia de este receptor sobre el aumento de TGs en la leche.

10.5 LOS COMPUESTOS 1 Y 2

La cantidad de publicaciones que caracterizan moléculas, producto del diseño racional, con capacidad de actuar como ligandos y modular la actividad de los LXRs ha crecido de manera exponencial en los últimos 15 años junto con el interés por estudiar estos receptores. En colaboración con el grupo del Dr. Gerardo Burton (UMyMFOR-DQO, FCEN, UBA-CONICET) hemos ensayado la capacidad de dos compuestos derivados del ácido colestenoico como posibles ligandos de LXRs. Demostramos que ambos compuestos antagonizan la activación del LXR mediada por GW3965 y, más aún, muestran actividad de agonistas inversos, disminuyendo la actividad basal de ambas isoformas del receptor, de acuerdo con ensayos de transfecciones transitorias de genes reporteros. Además, la actividad de CMP1 como agonista inverso también se evidenció en células hepáticas HepG2 donde observamos disminución de la expresión basal de FAS y SREBP1c¹⁵². De acuerdo con ello, estos compuestos son una herramienta prometedora para evaluar la relevancia de los LXRs en la lactancia ya que nos permitiría inhibir farmacológicamente la actividad de los receptores tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*. En efecto, en los ensayos realizados con células HC11 diferenciadas ambos compuestos fueron capaces de antagonizar el incremento en la superficie de CLDs mediado por GW3965 y de inhibir parcialmente el aumento en la abundancia de la proteína FAS. Sin

DISCUSIÓN

embargo, cuando evaluamos su actividad *per se* encontramos diferencias en la acción de cada uno de ellos. Por un lado, el CMP1 disminuyó significativamente la expresión basal de SCD-2 y del propio LXR α mientras que el CMP2 inhibió la expresión basal de SREBP1c y llamativamente, la capacidad de las células HC11 diferenciadas de formar CLDs. Estas observaciones resultan alentadoras a fin de profundizar el estudio de la posible acción selectiva de estos compuestos y ponen en evidencia la importancia de realizar una buena caracterización de nuevas drogas determinando su acción sobre blancos definidos.

10.6 ACERCA DE LOS MODELOS UTILIZADOS PARA EVALUAR EL ROL DE LXR EN LACTANCIA

En este trabajo utilizamos tres modelos distintos para evaluar la contribución de los LXRs sobre la síntesis y secreción de lípidos durante la lactancia. A continuación enumeraremos las ventajas y desventajas del uso de cada uno de ellos y concluiremos sobre el aprendizaje obtenido de los mismos.

Línea celular HC11. Esta línea de epitelio mamario murino normal es sumamente útil para entender procesos de diferenciación y muerte celular. Pueden ser crecidas en ausencia de una matriz extracelular exógena ya que sintetizan su propia matriz. Sin embargo, solamente en presencia de una matriz tridimensional, como por ejemplo Matrigel, son capaces de polarizarse y generar estructuras del tipo alveolar que recapitulan su disposición espacial en la glándula durante la lactancia^{206,207}. El fenotipo diferenciado se evalúa comúnmente analizando la expresión de una proteína muy representada en la leche madura como lo es la β -Caseína⁸⁹. Las células HC11 también son capaces de sintetizar lípidos aunque con un perfil de ácidos grasos con mayor abundancia en ácidos grasos de cadena larga respecto de la composición de la leche murina¹⁶⁷.

En este trabajo no crecimos las células en presencia de matriz extracelular exógena y por lo tanto nuestros resultados podrían tener un alcance limitado. Observamos que las células HC11 diferenciadas responden al estímulo con GW3965 induciendo la expresión de genes blanco del LXR. Además producen CLDs cuya superficie aumenta en respuesta al agonista GW3965.

Fracciones enriquecidas en MECs. Este procedimiento mostró ser altamente eficaz para obtener fracciones de MECs con un bajo porcentaje de adipocitos que se encuentran presentes en distintas cantidades en los diferentes estadios de desarrollo de la glándula mamaria. La obtención de MECs resultó de gran utilidad para evaluar el grado de expresión de los receptores y de sus blancos moleculares. La preparación de MECs es un procedimiento sencillo, económico y que permite la recuperación de suficiente material biológico para analizar ARNm y proteínas. Luego, en cuanto a las incubaciones *in vitro* de MECs, el objetivo era evaluar en forma directa la actividad de los LXRs y poder dilucidar la contribución exclusiva del epitelio conservando las características fisiológicas de las MECs al momento de ser removidas de la glándula. Las células pudieron ser incubadas y sometidas a distintos tratamientos por un tiempo no mayor de tres horas, debido a la pérdida de viabilidad de las mismas en incubaciones más prolongadas. Los resultados que obtuvimos fueron limitados debido a la variabilidad en la respuesta proveniente de cada preparación. La falta de adherencia celular, las condiciones del medio de cultivo y la distribución inequitativa del material biológico en cada uno de los tubos, son algunas de los motivos que pudieron contribuir al alto grado de dispersión obtenido en estos ensayos. De todas formas el diseño experimental no se había realizado con anterioridad a este trabajo y consideramos que es una herramienta muy valiosa ya que nos permitirá, una vez encontradas las condiciones adecuadas, ensayar una variedad de ligandos disminuyendo el número de animales de laboratorio.

Ensayos in vivo. En este trabajo de Tesis nos dispusimos estudiar la contribución de los LXRs en la composición lipídica de la leche. La experimentación con células epiteliales mamarias en cultivo nos permitió concluir

DISCUSIÓN

que la activación del LXR podría tener implicancias en la síntesis y transporte de lípidos al regular genes involucrados en tales funciones. Sin embargo, la intervención farmacológica en un modelo murino nos permitió también indagar si la actividad del LXR α es relevante en un contexto fisiológico de lactancia normal. Más aún, nos permitió evaluar no sólo sobre cuáles son las consecuencias del tratamiento con el ligando del LXR en la leche si no también profundizar en los mecanismos que producen el aumento del colesterol en la leche mediante la obtención de las MECs.

Una desventaja importante de esta aproximación experimental es que al inyectar de manera intraperitoneal por 24 hs la droga, esta actúa en múltiples órganos, tejidos, e inclusive dentro de la glándula mamaria en varios tipos celulares. Por lo tanto, con este diseño experimental, el aumento de colesterol puede ser reflejo de un efecto indirecto que involucra múltiples tipos celulares e inclusive órganos.

Sin embargo no hay que perder de vista que la última barrera que existe entre el organismo y el lumen alveolar (donde se secreta la leche) es el epitelio mamario, por lo tanto cualquier modificación en la composición de la leche tiene que evaluarse desde la perspectiva de un cambio en el epitelio. En este caso, por ejemplo, la activación *in vivo* del LXR por GW3965 provocó la inducción de la expresión del factor de transcripción SREBP1c en MECs, indicando que LXR α es capaz de controlar la expresión de genes clave en el control de la homeostasis lipídica durante la lactancia.

En resumen, cada modelo utilizado tiene sus virtudes y limitaciones, hemos aprendido de ellas e intentaremos maximizar las primeras y reducir las segundas en los próximos estudios a realizar para profundizar en el rol de los receptores nucleares LXR α y PPAR γ en el control de epitelio mamario y la composición de la leche materna.

11 RESUMEN DE RESULTADOS

- LXR α y LXR β se expresan en la línea de epitelio mamario murino HC11 y aumentan cuando las células son diferenciadas. LXR α es la isoforma más abundante.
- La activación del LXR en cultivo aumenta la superficie de CLDs junto con la expresión de los genes SREBP1c y ABCA1 y la proteína FAS.
- Los niveles proteicos de LXR α aumentan entre el final de la preñez y el día 10 de lactancia en epitelio mamario in vivo, mientras que los niveles de PPAR γ disminuyen.
- LXR α se acumula en adipocitos y citoplasma del epitelio durante la preñez y aumenta en el núcleo de las células epiteliales en el día 10 de lactancia.
- La activación del LXR en MECs disminuye la abundancia de mensajeros de PPAR γ .
- La activación del LXR in vivo produce un aumento en el porcentaje de colesterol en la leche asociado a un incremento en los mensajeros de SREBP1c

CONCLUSIONES FINALES

- .

12 CONCLUSIONES FINALES

En este trabajo de Tesis demostramos por primera vez que el LXR α no sólo se expresa en el epitelio mamario murino al final de la preñez sino que su abundancia aumenta conforme avanza la lactancia. Estos resultados sugieren que la isoforma α del LXR podría jugar un papel clave durante la lactancia. De hecho, observamos que el porcentaje de colesterol presente en la leche materna se incrementó casi tres veces en respuesta a la activación del LXR mediante la inyección del agonista GW3965 en ratones hembras Lac10. Si bien los mecanismos involucrados en dicho incremento no los hemos dilucidado aún, sí observamos en esta Tesis cambios en la expresión de distintos genes blanco de LXR α involucrados en el metabolismo y transporte lipídico en los modelos murinos *in vitro* e *in vivo*. Consistentemente, la activación del LXR aumentó la superficie ocupada por los CLDs en células HC11 diferenciadas lo que sugiere que este receptor regularía la cantidad de lípidos neutros encerrados en estas estructuras.

Por otro lado, el hecho de que los LXR α unan oxisteroles -cuya abundancia puede ser modulada indirectamente a través de la ingesta de colesterol- y que a su vez estos receptores sean potenciales blancos drogables abre un abanico de posibilidades enfocadas al diseño de terapias para madres lactantes con desbalances nutricionales. Además, la capacidad de modular la composición lipídica de la leche podría resultar de gran interés en la industria láctea. En ese sentido, los resultados obtenidos a partir de los ensayos con los análogos sintéticos del ácido colestenoico inician un camino para entender la acción de estos receptores en el epitelio mamario lactante. Por lo tanto, si bien aún quedan muchos interrogantes por contestar, hemos encontrado que el LXR α

CONCLUSIONES FINALES

podría ser un modulador relevante de la homeostasis lipídica en el epitelio mamario durante la lactancia.

13 BIBLIOGRAFÍA

1. Andrechek, E. R., Mori, S., Rempel, R. E., Chang, J. T. & Nevins, J. R. Patterns of cell signaling pathway activation that characterize mammary development. *Development* **135**, 2403–13 (2008).
2. Inman, J. L., Robertson, C., Mott, J. D. & Bissell, M. J. Mammary gland development: cell fate specification, stem cells and the microenvironment. *Development* **142**, 1028–1042 (2015).
3. Anderson, S. M., Rudolph, M. C., McManaman, J. L. & Neville, M. C. Key stages in mammary gland development. Secretory activation in the mammary gland: it's not just about milk protein synthesis! *Breast Cancer Res.* **9**, 204 (2007).
4. Taurig, H. H. A radioautographic study of cell proliferation in the mammary gland of the pregnant mouse. *Anat. Rec.* **159**, 239–247 (1967).
5. Djonov, V., Andres, A.-C. & Ziemiecki, A. Vascular remodelling during the normal and malignant life cycle of the mammary gland. *Microsc. Res. Tech.* **52**, 182–189 (2001).
6. Schwertfeger, K. L., McManaman, J. L., Palmer, C. A., Neville, M. C. & Anderson, S. M. Expression of constitutively activated Akt in the mammary gland leads to excess lipid synthesis during pregnancy and lactation. *J. Lipid Res.* **44**, 1100–1112 (2003).
7. McManaman, J. L., Palmer, C. A., Anderson, S. M., Schwertfeger, K. & Neville, M. C. in 263–279 (Springer US, 2004). doi:10.1007/978-1-4757-4242-8_22
8. Rosen, J. M., O'Neal, D. L., McHugh, J. E. & Comstock, J. P. Progesterone-mediated inhibition of casein mRNA and polysomal casein synthesis in the rat mammary gland during pregnancy. *Biochemistry* **17**, 290–7 (1978).
9. LOIZZI, R. F. Progesterone Withdrawal Stimulates Mammary Gland Tubulin Polymerization in Pregnant Rats*. *Endocrinology* **116**, 2543–2547 (1985).

BIBLIOGRAFÍA

10. Deis, R. P. & Delouis, C. Lactogenesis induced by ovariectomy in pregnant rats and its regulation by oestrogen and progesterone. *J. Steroid Biochem.* **18**, 687–90 (1983).
11. Neville, M. C., McFadden, T. B. & Forsyth, I. Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **7**, 49–66 (2002).
12. MIZOGUCHI, Y. *et al.* Acute Expression of the PRL Receptor Gene after Ovariectomy in Midpregnant Mouse Mammary Gland. *Endocr. J.* **43**, 537–544 (1996).
13. Djiane, J. & Durand, P. Prolactin-progesterone antagonism in self regulation of prolactin receptors in the mammary gland. *Nature* **266**, 641–3 (1977).
14. Elias, J. J., Pitelka, D. R. & Armstrong, R. C. Changes in fat cell morphology during lactation in the mouse. *Anat. Rec.* **177**, 533–547 (1973).
15. Richert, M. M., Schwertfeger, K. L., Ryder, J. W. & Anderson, S. M. An atlas of mouse mammary gland development. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **5**, 227–41 (2000).
16. Masso-Welch, P. A., Darcy, K. M., Stangle-Castor, N. C. & Ip, M. M. A Developmental Atlas of Rat Mammary Gland Histology. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **5**, 165–185 (2000).
17. Walker, N. I., Bennett, R. E. & Kerr, J. F. Cell death by apoptosis during involution of the lactating breast in mice and rats. *Am. J. Anat.* **185**, 19–32 (1989).
18. Strange, R., Friis, R. R., Bemis, L. T. & Geske, F. J. Programmed cell death during mammary gland involution. *Methods Cell Biol.* **46**, 355–68 (1995).
19. McManaman, J. L. & Neville, M. C. Mammary physiology and milk secretion. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **55**, 629–641 (2003).
20. Mather, I. H. & Keenan, T. W. Origin and secretion of milk lipids. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **3**, 259–273 (1998).

21. Nguyen, D.-A. D. & Neville, M. C. Tight Junction Regulation in the Mammary Gland. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **3**, 233–246 (1998).
22. Pitelka, D. R., Hamamoto, S. T., Duafala, J. G. & Nemanic, M. K. Cell contacts in the mouse mammary gland. I. Normal gland in postnatal development and the secretory cycle. *J. Cell Biol.* **56**, 797–818 (1973).
23. Neville, M. C. & Picciano, M. F. Regulation of Milk Lipid Secretion and Composition. *Annu. Rev. Nutr.* **17**, 159–184 (1997).
24. Patton, S., Huston, G. E., Montgomery, P. A. & Josephson, R. V. in *Human Lactation* 2 231–239 (Springer US, 1986). doi:10.1007/978-1-4615-7207-7_20
25. Jenness, R. The composition of human milk. *Semin. Perinatol.* **3**, 225–39 (1979).
26. Murphy, D. J. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Prog. Lipid Res.* **40**, 325–438 (2001).
27. Londos, C., Brasaemle, D. L., Schultz, C. J., Segrest, J. P. & Kimmel, A. R. Perilipins, ADRP, and other proteins that associate with intracellular neutral lipid droplets in animal cells. *Semin. Cell Dev. Biol.* **10**, 51–58 (1999).
28. Heid, H. W., Moll, R., Schwetlick, I., Rackwitz, H. R. & Keenan, T. W. Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases. *Cell Tissue Res.* **294**, 309–21 (1998).
29. Brasaemle, D. L. *et al.* Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein. *J. Lipid Res.* **38**, 2249–63 (1997).
30. Buhman, K. K., Chen, H. C. & Farese, R. V. The Enzymes of Neutral Lipid Synthesis. *J. Biol. Chem.* **276**, 40369–40372 (2001).
31. Smith, S. J. *et al.* Obesity resistance and multiple mechanisms of triglyceride synthesis in mice lacking Dgat. *Nat. Genet.* **25**, 87–90 (2000).
32. Cases, S. *et al.* Development of the mammary gland requires DGAT1 expression in stromal and epithelial tissues. *Development* **131**, 3047–55 (2004).

BIBLIOGRAFÍA

33. Shand, J. H. Acyl-CoA . Cholesterol Acyltransferase Activity in the Rat Mammary Gland : Variation During Pregnancy and Lactation. 150–154
34. Shand, J. H. & West, D. W. Effects of an antiserum to rat growth hormone and bromocriptine on cholesterol-metabolizing enzymes in the lactating rat mammary gland. *J. Endocrinol.* **128**, 287–95 (1991).
35. Stein, O. & Stein, Y. Lipid synthesis, intracellular transport, and secretion. II. Electron microscopic radioautographic study of the mouse lactating mammary gland. *J. Cell Biol.* **34**, 251–63 (1967).
36. McManaman, J. L. Milk lipid secretion: Recent biomolecular aspects. *Biomol. Concepts* **3**, 581–591 (2012).
37. Patton, S., Stemberger, B. H. & Knudson, C. M. The supression of milk fat globule secretion by clochicine: an effect coupled to inhibition of exocytosis. *Biochim. Biophys. Acta* **499**, 404–10 (1977).
38. Delplanque, B., Gibson, R., Koletzko, B., Lapillonne, A. & Strandvik, B. Lipid Quality in Infant Nutrition: Current Knowledge and Future Opportunities. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **61**, 8–17 (2015).
39. Jensen, R. G., Bitman, J., Carlson, S. E. & Couch, S. C. Milk Lipids. *Handb. Milk Compos.* 12–18 (1991). doi:10.1016/B978-0-12-384430-9.50023-8
40. Dils, R. R. R. Comparative aspects of milk fat synthesis. *J. Dairy Sci.* **69**, 904–910 (1986).
41. Allen, J. C., Keller, R. P., Archer, P. & Neville, M. C. Studies in human lactation: Milk composition and daily secretion rates of macronutrients in the first year of lactation. *Am. J. Clin. Nutr.* **54**, 69–80 (1991).
42. Wakil, S. J. & Abu-Elheiga, L. A. Fatty acid metabolism: target for metabolic syndrome. *J. Lipid Res.* **50 Suppl**, S138-43 (2009).
43. Abraham, S. & Chaikoff, I. Glycolytic Pathways and Lipogenesis in Mammary Glands of Lactating and Nonlactating Normal Rats*. *J. BIO~QICAL Chem.* **234**,

44. Mohammad, M. A., Sunehag, A. L. & Haymond, M. W. De novo synthesis of milk triglycerides in humans. *AJP Endocrinol. Metab.* **306**, E838–E847 (2014).
45. Coleman, R. A. & Lee, D. P. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Prog. Lipid Res.* **43**, 134–176 (2004).
46. Winter, C. H., Having, E. B. & Muskiet, F. A. J. Fatty acid composition of human milk triglyceride species Possible consequences for optimal structures of infant formula triglycerides. *J. Chromatogr. Biomed. Appl. Elsevier Sci. Publ. B.V* **616**, 9–24 (1993).
47. Smith, S. Mechanism of Chain Length Determination in Biosynthesis of Milk Fatty Acids. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **14**, 245–260 (2009).
48. Jensen, D. R. *et al.* Regulation of lipoprotein lipase activity and mRNA in the mammary gland of the lactating mouse. *Biochem. J.* **298**, 321–327 (1994).
49. McManaman, J. L. Lipid transport in the lactating mammary gland. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **19**, 35–42 (2014).
50. Smith, S. & Dils, R. Factors affecting the chain length of fatty acids synthesised by lactating-rabbit mammary glands. *Biochim. Biophys. Acta - Lipids Lipid Metab.* **116**, 23–40 (1966).
51. Libertini, L. J. & Smith, S. Purification and properties of a thioesterase from lactating rat mammary gland which modifies the product specificities of fatty acid synthetase. *J. Biol. Chem.* **253**, 1393–1401 (1978).
52. Daniel, S. & Kim, K.-H. Sp1 Mediates Glucose Activation of the Acetyl-CoA Carboxylase Promoter. *J. Biol. Chem.* **271**, 1385–1392 (1996).
53. Kim, K. H. & Tae, H. J. Pattern and regulation of acetyl-CoA carboxylase gene expression. *J. Nutr.* **124**, 1273S–1283S (1994).
54. Munday, M. R. & Hardie, D. G. The role of acetyl-CoA carboxylase phosphorylation in the control of mammary gland fatty acid synthesis during the starvation and re-feeding of lactating rats. *Biochem. J.* **237**, 85–91 (1986).

BIBLIOGRAFÍA

55. Smith, S. The animal fatty acid synthase: one gene, one polypeptide, seven enzymes. *FASEB J.* **8**, 1248–59 (1994).
56. Breckenridge, W. C. & Kuksis, A. Molecular weight distributions of milk fat triglycerides from seven species. *J Lipid Res* **8**, 473–478 (1967).
57. Smith, S., Gagné, H. T., Pitelka, D. R. & Abraham, S. The effect of dietary fat on lipogenesis in mammary gland and liver from lactating and virgin mice. *Biochem. J.* **115**, 807–15 (1969).
58. Ntambi, J. M. & Miyazaki, M. Regulation of stearyl-CoA desaturases and role in metabolism. *Prog. Lipid Res.* **43**, 91–104 (2004).
59. Simons, K. & Ikonen, E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569–572 (1997).
60. Simons, K. & Toomre, D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 31–39 (2000).
61. Gofflot, F. *et al.* Molecular mechanisms underlying limb anomalies associated with cholesterol deficiency during gestation: implications of Hedgehog signaling. *Hum. Mol. Genet.* **12**, 1187–1198 (2003).
62. Bayley, T. M. *et al.* Influence of Formula versus Breast Milk on Cholesterol Synthesis Rates in Four-Month-Old Infants. *Pediatr. Res.* **44**, 60–67 (1998).
63. Wong, W. W., Hachey, D. L., Insull, W., Opekun, A. R. & Klein, P. D. Effect of dietary cholesterol on cholesterol synthesis in breast-fed and formula-fed infants. *J. Lipid Res.* **34**, 1403–11 (1993).
64. Cruz, M. L. A. *et al.* Effects of Infant Nutrition on Cholesterol Synthesis Rates. *Pediatr. Res.* **35**, 135–140 (1994).
65. Long, C. A., Patton, S. & McCarthy, R. D. Origins of the cholesterol in milk. *Lipids* **15**, 853–857 (1980).
66. Raphael, B. C., Patton, S. & McCarthy, R. D. The serum lipoproteins as a source of milk cholesterol. *FEBS Lett.* **58**, 47–49 (1975).

67. Duncan, R. E., El-Sohemy, A. & Archer, M. C. Delivery of mevalonate to murine extrahepatic tissues via mini-osmotic pumps. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **50**, 139–143 (2004).
68. SHAND, J. H. & WEST, D. W. Co-ordinate diurnal variations in the activities of cholesterol-metabolizing enzymes in the rat mammary gland. *Biochem. Soc. Trans.* **17**, (1989).
69. Bionaz, M., Chen, S., Khan, M. J. & Looor, J. J. Functional Role of PPARs in Ruminants: Potential Targets for Fine-Tuning Metabolism during Growth and Lactation. *PPAR Res.* **2013**, 684159 (2013).
70. Jensen, R. G. *et al.* The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *J. Dairy Sci.* **85**, 295–350 (2002).
71. Jensen, D. R., Bessesen, D. H., Etienne, J., Eckel, R. H. & Neville, M. C. Distribution and source of lipoprotein lipase in mouse mammary gland. *J Lipid Res* **32**, 733–742 (1991).
72. Ontsouka, E. C. & Albrecht, C. Cholesterol transport and regulation in the mammary gland. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **19**, 43–58 (2014).
73. Landschulz, K. T., Pathak, R. K., Rigotti, A., Krieger, M. & Hobbs, H. H. Regulation of scavenger receptor, class B, type I, a high density lipoprotein receptor, in liver and steroidogenic tissues of the rat. *J.Clin.Invest.* **98**, 984–995 (1996).
74. Monks, J. *et al.* A lipoprotein-containing particle is transferred from the serum across the mammary epithelium into the milk of lactating mice. *J. Lipid Res.* **42**, 686–96 (2001).
75. Dewettinck, K. *et al.* Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material. *Int. Dairy J.* **18**, 436–457 (2008).
76. Bracco, U., Hidalgo, J. & Bohren, H. Lipid composition of the fat globule membrane of human and bovine milk. *J. Dairy Sci.* **55**, 165–72 (1972).
77. Patton, S. & Jensen, R. G. Lipid metabolism and membrane functions of the mammary gland. *Prog. Chem. Fats Other Lipids* **14**, (1975).

BIBLIOGRAFÍA

78. Ontsouka, E. C., Huang, X., Stieger, B. & Albrecht, C. Characteristics and Functional Relevance of Apolipoprotein-A1 and Cholesterol Binding in Mammary Gland Tissues and Epithelial Cells. *PLoS One* **8**, 1–12 (2013).
79. Phillips, M. C. *et al.* Mechanisms of high density lipoprotein-mediated efflux of cholesterol from cell plasma membranes. *Atherosclerosis* **137**, (1998).
80. McLean, L. R. & Phillips, M. C. Mechanism of cholesterol and phosphatidylcholine exchange or transfer between unilamellar vesicles. *Biochemistry* **20**, 2893–2900 (1981).
81. Oram, J. F. & Vaughan, A. M. ATP-binding cassette cholesterol transporters and cardiovascular disease. *Circ. Res.* **99**, 1031–1043 (2006).
82. Mani, O. *et al.* Expression, localization, and functional model of cholesterol transporters in lactating and nonlactating mammary tissues of murine, bovine, and human origin. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **299**, R642–R654 (2010).
83. Rudolph, M. C., McManaman, J. L., Hunter, L., Phang, T. & Neville, M. C. Functional development of the mammary gland: Use of expression profiling and trajectory clustering to reveal changes in gene expression during pregnancy, lactation, and involution. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **8**, 287–307 (2003).
84. Rudolph, M. C. *et al.* Metabolic regulation in the lactating mammary gland: a lipid synthesizing machine. *Physiol. Genomics* **28**, 323–336 (2007).
85. Boxer, R. B. *et al.* Isoform-specific requirement for Akt1 in the developmental regulation of cellular metabolism during lactation. *Cell Metab.* **4**, 475–490 (2006).
86. Rudolph, M. C., Neville, M. C. & Anderson, S. M. Lipid synthesis in lactation: Diet and the fatty acid switch. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **12**, 269–281 (2007).
87. Schmitt-Ney, M., Doppler, W., Ball, R. K. & Groner, B. Beta-casein gene promoter activity is regulated by the hormone-mediated relief of transcriptional repression and a mammary-gland-specific nuclear factor. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 3745–3755 (1991).

88. Gouilleux, F., Wakao, H., Mundt, M. & Groner, B. Prolactin induces phosphorylation of Tyr694 of Stat5 (MGF), a prerequisite for DNA binding and induction of transcription. *EMBO J.* **13**, 4361–9 (1994).
89. Ball, R. K., Friis, R. R., Schoenenberger, C. A., Doppler, W. & Groner, B. Prolactin regulation of beta-casein gene expression and of a cytosolic 120-kd protein in a cloned mouse mammary epithelial cell line. *EMBO J.* **7**, 2089–95 (1988).
90. Catalano, P. M. Obesity and Pregnancy—The Propagation of a Viscous Cycle? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **88**, 3505–3506 (2003).
91. Young, B. E., Johnson, S. L. & Krebs, N. F. Biological Determinants Linking Infant Weight Gain and Child Obesity: Current Knowledge and Future Directions. *Adv. Nutr. An Int. Rev. J.* **3**, 675–686 (2012).
92. Innis, S. M. Impact of maternal diet on human milk composition and neurological development of infants. *Am J Clin Nutr.* **99**, 734–741 (2014).
93. Muhlhausler, B. S. & Ailhaud, G. P. Omega-6 polyunsaturated fatty acids and the early origins of obesity. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* **20**, 56–61 (2013).
94. Rudolph, M. C. *et al.* Early infant adipose deposition is positively associated with the n-6 to n-3 fatty acid ratio in human milk independent of maternal BMI. *International Journal of Obesity* (Nature Publishing Group, 2016). doi:10.1038/ijo.2016.211
95. Janowski, B. A., Willy, P. J., Devi, T. R., Falck, J. R. & Mangelsdorf, D. J. An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR α . *Nature* **383**, 728–731 (1996).
96. Shinar, D. M. *et al.* NER, a new member of the gene family encoding the human steroid hormone nuclear receptor. *Gene* **147**, 273–6 (1994).
97. Apfel, R. *et al.* A novel orphan receptor specific for a subset of thyroid hormone-responsive elements and its interaction with the retinoid/thyroid hormone receptor subfamily. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 7025–35 (1994).
98. Janowski, B. A. *et al.* Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X

BIBLIOGRAFÍA

- receptors LXRalpha and LXRbeta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 266–71 (1999).
99. Repa, J. J. & Mangelsdorf, D. J. the Role of Orphan Nuclear Receptors in the Regulation of Cholesterol Homeostasis. (2000).
100. Peet, D. J. *et al.* Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR?? *Cell* **93**, 693–704 (1998).
101. Svensson, S. *et al.* Crystal structure of the heterodimeric complex of LXRalpha and RXRbeta ligand-binding domains in a fully agonistic conformation. *EMBO J.* **22**, 4625–33 (2003).
102. Hu, X., Li, S., Wu, J., Xia, C. & Lala, D. S. Liver X Receptors Interact with Corepressors to Regulate Gene Expression. *Mol. Endocrinol.* **17**, 1019–1026 (2003).
103. Huuskonen, J., Fielding, P. E. & Fielding, C. J. Role of p160 Coactivator Complex in the Activation of Liver X Receptor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 703–708 (2004).
104. Lee, S., Lee, J., Lee, S.-K. & Lee, J. W. Activating Signal Cointegrator-2 Is an Essential Adaptor to Recruit Histone H3 Lysine 4 Methyltransferases MLL3 and MLL4 to the Liver X Receptors. *Mol. Endocrinol.* **22**, 1312–1319 (2008).
105. Kim, G. H. *et al.* Characterization of ASC-2 as an Antiatherogenic Transcriptional Coactivator of Liver X Receptors in Macrophages. *Mol. Endocrinol.* **23**, 966–974 (2009).
106. Son, Y. L. & Lee, Y. C. Molecular determinants of the interactions between LXR/RXR heterodimers and TRAP220. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **384**, 389–393 (2009).
107. Repa, J. J. Regulation of Absorption and ABC1-Mediated Efflux of Cholesterol by RXR Heterodimers. *Science (80-.)*. **289**, 1524–1529 (2000).
108. Lehmann, J. M. *et al.* Activation of the Nuclear Receptor LXR by Oxysterols Defines a New Hormone Response Pathway. *J. Biol. Chem.* **272**, 3137–3140

- (1997).
109. Hong, C. & Tontonoz, P. Liver X receptors in lipid metabolism: opportunities for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **13**, 433–444 (2014).
 110. Saucier, S. E., Kandutsch, A. A., Gayen, A. K., Swahn, D. K. & Spencer, T. A. Oxysterol regulators of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in liver. Effect of dietary cholesterol. *J. Biol. Chem.* **264**, 6863–6869 (1989).
 111. Zelcer, N., Hong, C., Boyadjian, R., Tontonoz, P. & Mev, S. Ubiquitination of the LDL Receptor. *Life Sci.* **325**, 100–104 (2009).
 112. Repa, J. J. *et al.* Regulation of Absorption and ABC1-Mediated Efflux of Cholesterol by RXR Heterodimers. *Science (80-.).* **289**, 1524–1529 (2000).
 113. Costet, P., Luo, Y., Wang, N. & Tall, A. R. Sterol-dependent transactivation of the human ABC1 promoter by LXR/RXR. *J. Biol. Chem.* **275**, 28240–5 (2000).
 114. Kennedy, M. A. *et al.* Characterization of the human ABCG1 gene: liver X receptor activates an internal promoter that produces a novel transcript encoding an alternative form of the protein. *J. Biol. Chem.* **276**, 39438–47 (2001).
 115. Sabol, S. L., Brewer, H. B. & Santamarina-Fojo, S. The human ABCG1 gene: identification of LXR response elements that modulate expression in macrophages and liver. *J. Lipid Res.* **46**, 2151–2167 (2005).
 116. Basso, F. *et al.* Role of the hepatic ABCA1 transporter in modulating intrahepatic cholesterol and plasma HDL cholesterol concentrations. *J. Lipid Res.* **44**, 296–302 (2003).
 117. Wellington, C. L. *et al.* Alterations of plasma lipids in mice via adenoviral-mediated hepatic overexpression of human ABCA1. *J. Lipid Res.* **44**, 1470–1480 (2003).
 118. Gelissen, I. C. *et al.* ABCA1 and ABCG1 Synergize to Mediate Cholesterol Export to ApoA-I. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**, 534–540 (2005).
 119. Yu, L. *et al.* Disruption of *Abcg5* and *Abcg8* in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 16237–16242 (2002).

BIBLIOGRAFÍA

120. Wang, Y. *et al.* Regulation of Cholesterologenesis by the Oxysterol Receptor, LXR. *J. Biol. Chem.* **283**, 26332–26339 (2008).
121. Repa, J. J. *et al.* Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev.* **14**, 2819–30 (2000).
122. Yoshikawa, T. *et al.* Identification of Liver X Receptor-Retinoid X Receptor as an Activator of the Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1c Gene Promoter. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 2991–3000 (2001).
123. Mooijaart, S. P. *et al.* Liver X receptor alpha associates with human life span. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **62**, 343–349 (2007).
124. Antebi, A. *Steroid regulation of C. elegans diapause, developmental timing, and longevity.* *Current Topics in Developmental Biology* **105**, (Elsevier Inc., 2013).
125. Töröcsik, D., Szanto, A. & Nagy, L. Oxysterol signaling links cholesterol metabolism and inflammation via the liver X receptor in macrophages. *Mol. Aspects Med.* **30**, 134–152 (2009).
126. Venkateswaran, A. *et al.* Human white/murine ABC8 mRNA levels are highly induced in lipid-loaded macrophages. A transcriptional role for specific oxysterols. *J. Biol. Chem.* **275**, 14700–7 (2000).
127. Tangirala, R. K. *et al.* Identification of macrophage liver X receptors as inhibitors of atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 11896–11901 (2002).
128. Wang, N. & Tall, A. R. Regulation and mechanisms of ATP-binding cassette transporter A1-mediated cellular cholesterol efflux. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**, 1178–1184 (2003).
129. Joseph, S. B. *et al.* Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 7604–7609 (2002).
130. Joseph, S. B., Castrillo, A., Laffitte, B. A., Mangelsdorf, D. J. & Tontonoz, P. Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat. Med.* **9**, 213–219 (2003).

131. Fu, Y. *et al.* Liver X receptor agonist prevents LPS-induced mastitis in mice. *Int. Immunopharmacol.* **22**, 379–383 (2014).
132. Cui, W. *et al.* Liver X receptor activation attenuates inflammatory response and protects cholinergic neurons in APP/PS1 transgenic mice. *Neuroscience* **210**, 200–210 (2012).
133. Wang, D. *et al.* Synthetic LXR agonist T0901317 attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats. *Int. Immunopharmacol.* **11**, 2098–2103 (2011).
134. Hindinger, C. *et al.* Liver X receptor activation decreases the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neurosci. Res.* **84**, 1225–1234 (2006).
135. Chintalacharuvu, S. R., Sandusky, G. E., Burris, T. P., Burner, G. C. & Nagpal, S. Liver X receptor is a therapeutic target in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* **56**, 1365–1367 (2007).
136. Chuu, C.-P., Kokontis, J. M., Hiipakka, R. a & Liao, S. Modulation of liver X receptor signaling as novel therapy for prostate cancer. *J. Biomed. Sci.* **14**, 543–553 (2007).
137. Chuu, C.-P. & Lin, H.-P. Antiproliferative effect of LXR agonists T0901317 and 22(R)-hydroxycholesterol on multiple human cancer cell lines. *Anticancer Res.* **30**, 3643–3648 (2010).
138. Chuu, C.-P. Modulation of liver X receptor signaling as a prevention and therapy for colon cancer. *Med. Hypotheses* **76**, 697–699 (2011).
139. Fukuchi, J., Kokontis, J. M., Hiipakka, R. A., Chuu, C. & Liao, S. Antiproliferative effect of liver X receptor agonists on LNCaP human prostate cancer cells. *Cancer Res.* **64**, 7686–7689 (2004).
140. Vedin, L. L.-L., Lewandowski, S. A., Parini, P., Gustafsson, J.-A. J.-A. & Steffensen, K. R. The oxysterol receptor LXR inhibits proliferation of human breast cancer cells. *Carcinogenesis* **30**, 575–579 (2009).
141. Vedin, L.-L., Lewandowski, S. A., Parini, P., Gustafsson, J.-A. & Steffensen, K. R.

BIBLIOGRAFÍA

- The oxysterol receptor LXR inhibits proliferation of human breast cancer cells. *Carcinogenesis* **30**, 575–579 (2009).
142. Pencheva, N., Buss, C. G., Posada, J., Merghoub, T. & Tavazoie, S. F. Broad-Spectrum Therapeutic Suppression of Metastatic Melanoma through Nuclear Hormone Receptor Activation. *Cell* **156**, 986–1001 (2014).
143. Mani, O., Sorensen, M. T., Sejrsen, K., Bruckmaier, R. M. & Albrecht, C. Differential expression and localization of lipid transporters in the bovine mammary gland during the pregnancy-lactation cycle. *J. Dairy Sci.* **92**, 3744–3756 (2009).
144. McFadden, J. W. W. & Corl, B. A. Activation of liver X receptor (LXR) enhances de novo fatty acid synthesis in bovine mammary epithelial cells. *J. Dairy Sci.* **93**, 4651–4658 (2010).
145. Schroeffer, G. J. Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiol. Rev.* **80**, 361–554 (2000).
146. Björkhem, I. & Diczfalusy, U. Oxysterols: friends, foes, or just fellow passengers? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **22**, 734–42 (2002).
147. Forman, B. M., Chen, J. & Evans, R. M. Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 4312–7 (1997).
148. Kliewer, S. A. *et al.* Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 4318–23 (1997).
149. Rodriguez-Cruz, M. *et al.* Participation of mammary gland in long-chain polyunsaturated fatty acid synthesis during pregnancy and lactation in rats. *Biochim. Biophys. Acta* **1811**, 284–93 (2011).
150. Rudolph, M. M. C. *et al.* Sterol regulatory element binding protein and dietary lipid regulation of fatty acid synthesis in the mammary epithelium. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **299**, E918-27 (2010).

151. Schadinger, S. E., Bucher, N. L. R., Schreiber, B. M. & Farmer, S. R. PPARgamma2 regulates lipogenesis and lipid accumulation in steatotic hepatocytes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **288**, E1195-205 (2005).
152. Álvarez, L. D. *et al.* Destabilization of the torsioned conformation of a ligand side chain inverts the LXR β activity. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1851**, (2015).
153. Willy, P. J. *et al.* LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes Dev.* **9**, 1033–1045 (1995).
154. Ishizuka, T. & Lazar, M. A. The N-CoR/Histone Deacetylase 3 Complex Is Required for Repression by Thyroid Hormone Receptor. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 5122–5131 (2003).
155. Ball, R. K. *et al.* Prolactin regulation of beta-casein gene expression and of a cytosolic 120-kd protein in a cloned mouse mammary epithelial cell line. *EMBO J.* **7**, 2089–95 (1988).
156. Merlo, G. R. *et al.* Growth suppression of normal mammary epithelial cells by wild-type p53. *Oncogene* **9**, 443–53 (1994).
157. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).
158. Rudolph, M. C., Wellberg, E. A. & Anderson, S. M. Adipose-depleted mammary epithelial cells and organoids. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **14**, 381–386 (2009).
159. Russell, T. D. *et al.* Cytoplasmic lipid droplet accumulation in developing mammary epithelial cells: roles of adipophilin and lipid metabolism. *J. Lipid Res.* **48**, 1463–75 (2007).
160. Depeters, E. J. & Hovey, R. C. Methods for collecting milk from mice. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **14**, 397–400 (2009).
161. Gomez-Gallego, C. *et al.* A method to collect to high volumes of milk from mice.

BIBLIOGRAFÍA

- An. Vet. Murcia* **29**, 55–61 (2013).
162. Fukuta, K. in *The Laboratory Mouse* 543–554 (2004). doi:10.1016/B978-012336425-8/50086-8
163. Bligh, E. G. & Dyer, W. J. A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911–917 (1959).
164. Collins, P. J. *et al.* Identification of a Nonsteroidal Liver X Receptor Agonist through Parallel Array Synthesis of Tertiary Amines. *J. Med. Chem.* **45**, 1963–1966 (2002).
165. Repa, J. J. Regulation of Absorption and ABC1-Mediated Efflux of Cholesterol by RXR Heterodimers. *Science (80-.)*. **289**, 1524–1529 (2000).
166. Danielson, K. G., Oborn, C. J., Durban, E. M., Butel, J. S. & Medina, D. Epithelial mouse mammary cell line exhibiting normal morphogenesis in vivo and functional differentiation in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 3756–60 (1984).
167. Dória, M. L. *et al.* Fatty acid and phospholipid biosynthetic pathways are regulated throughout mammary epithelial cell differentiation and correlate to breast cancer survival. *FASEB J.* **28**, 4247–4264 (2014).
168. Williams, C., Helguero, L., Edvardsson, K., Haldosén, L.-A. & Gustafsson, J.-Å. Gene expression in murine mammary epithelial stem cell-like cells shows similarities to human breast cancer gene expression. *Breast Cancer Res.* **11**, R26 (2009).
169. Taverna, D., Groner, B. & Hynes, N. E. Epidermal growth factor receptor, platelet-derived growth factor receptor, and c-erbB-2 receptor activation all promote growth but have distinctive effects upon mouse mammary epithelial cell differentiation. *Cell Growth Differ.* **2**, 145–54 (1991).
170. Laffitte, B. A. *et al.* Autoregulation of the Human Liver X Receptor α Promoter. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 7558–7568 (2001).
171. Pauloin, A. *et al.* Oleate and linoleate stimulate degradation of β -casein in prolactin-treated HC11 mouse mammary epithelial cells. *Cell Tissue Res.* **340**,

- 91–102 (2010).
172. Saben, J. L. *et al.* Maternal obesity reduces milk lipid production in lactating mice by inhibiting acetyl-CoA carboxylase and impairing fatty acid synthesis. *PLoS One* **9**, 17–19 (2014).
 173. Suburu, J. *et al.* Fatty acid synthase is required for mammary gland development and milk production during lactation. *AJP Endocrinol. Metab.* **306**, E1132–E1143 (2014).
 174. Repa, J. J. & Mangelsdorf, D. J. The liver X receptor gene team: potential new players in atherosclerosis. *Nat Med* **8**, 1243–1248 (2002).
 175. Repa, J. J. *et al.* Regulation of ATP-binding Cassette Sterol Transporters ABCG5 and ABCG8 by the Liver X Receptors alpha and beta. *J. Biol. Chem.* **277**, 18793–18800 (2002).
 176. Berge, K. E. *et al.* Heritability of plasma noncholesterol sterols and relationship to DNA sequence polymorphism in ABCG5 and ABCG8. *J. Lipid Res.* **43**, 486–94 (2002).
 177. Venkateswaran, A. *et al.* Human White / Murine ABC8 mRNA Levels Are Highly Induced in. **275**, 14700–14707 (2000).
 178. Chiang, J. Y., Kimmel, R. & Stroup, D. Regulation of cholesterol 7alpha-hydroxylase gene (CYP7A1) transcription by the liver orphan receptor (LXRalpha). *Gene* **262**, 257–65 (2001).
 179. Repa, J. J. *et al.* Regulation of mouse sterol regulatory by oxysterol receptors , LXR α and LXR β . *Genes Dev.* 2819–2830 (2000). doi:10.1101/gad.844900.four
 180. Yoshikawa, T. *et al.* Identification of Liver X Receptor-Retinoid X Receptor as an Activator of the Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1c Gene Promoter Identification of Liver X Receptor-Retinoid X Receptor as an Activator of the Sterol Regulatory Element-Binding Protei. *Society* **21**, 2991–3000 (2001).
 181. Kalaany, N. Y. *et al.* LXRs regulate the balance between fat storage and oxidation.

BIBLIOGRAFÍA

- Cell Metab.* **1**, 231–244 (2005).
182. Norata, G., Ongari, M., Uboldi, P., Pellegatta, F. & Catapano, A. Liver X receptor and retinoic X receptor agonists modulate the expression of genes involved in lipid metabolism in human endothelial cells. *Int J Mol Med* **16**, 717–22 (2005).
 183. Lu, T. T., Repa, J. J. & Mangelsdorf, D. J. Orphan nuclear receptors as eLiXIRs and FiXeRs of sterol metabolism. *J. Biol. Chem.* **276**, 37735–8 (2001).
 184. FDA. Drug Safety and Availability - FDA Drug Safety Communication: FDA eliminates the Risk Evaluation and Mitigation Strategy (REMS) for rosiglitazone-containing diabetes medicines. (2015).
 185. Lehmann, J. M. *et al.* An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *The Journal of biological chemistry* **270**, 12953–12956 (1995).
 186. Mayerson, A. B. *et al.* The effects of rosiglitazone on insulin sensitivity, lipolysis, and hepatic and skeletal muscle triglyceride content in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* **51**, 797–802 (2002).
 187. Rosenblatt, S. *et al.* The impact of pioglitazone on glycemic control and atherogenic dyslipidemia in patients with type 2 diabetes mellitus. *Coron. Artery Dis.* **12**, 413–23 (2001).
 188. Miyazaki, Y. *et al.* Improved glycemic control and enhanced insulin sensitivity in type 2 diabetic subjects treated with pioglitazone. *Diabetes Care* **24**, 710–9 (2001).
 189. Buchanan, T. A. *et al.* Preservation of Pancreatic β -Cell Function and Prevention of Type 2 Diabetes by Pharmacological Treatment of Insulin Resistance in High-Risk Hispanic Women. *Diabetes* **51**, (2002).
 190. Kumar, S. *et al.* Troglitazone, an insulin action enhancer, improves metabolic control in NIDDM patients. Troglitazone Study Group. *Diabetologia* **39**, 701–9 (1996).
 191. Ide, T. *et al.* Cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor

- (PPAR) alpha and liver X receptor (LXR) in nutritional regulation of fatty acid metabolism. II. LXRs suppress lipid degradation gene promoters through inhibition of PPAR signaling. *Mol. Endocrinol.* **17**, 1255–1267 (2003).
192. Yoshikawa, T. *et al.* Cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and liver X receptor (LXR) in nutritional regulation of fatty acid metabolism. I. PPARs suppress sterol regulatory element binding protein-1c promoter through inhibition of LXR sig. *Mol. Endocrinol.* **17**, 1240–1254 (2003).
193. Morrioni, M. *et al.* Reversible transdifferentiation of secretory epithelial cells into adipocytes in the mammary gland. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 16801–6 (2004).
194. Rosen, E. D. *et al.* PPAR γ is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol. Cell* **4**, 611–617 (1999).
195. Barak, Y. *et al.* PPAR γ is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol. Cell* **4**, 585–595 (1999).
196. Mani, O. *et al.* Identification of ABCA1 and ABCG1 in milk fat globules and mammary cells--implications for milk cholesterol secretion. *J. Dairy Sci.* **94**, 1265–76 (2011).
197. D'Alessandro, A., Scaloni, A. & Zolla, L. Human milk proteins: An interactomics and updated functional overview. *J. Proteome Res.* **9**, 3339–3373 (2010).
198. Reinhardt, T. A. & Lippolis, J. D. Bovine Milk Fat Globule Membrane Proteome. *J. Dairy Res.* **73**, 406 (2006).
199. Fong, B. Y., Norris, C. S. & MacGibbon, A. K. H. Protein and lipid composition of bovine milk-fat-globule membrane. *Int. Dairy J.* **17**, 275–288 (2007).
200. Ishimoto, K. *et al.* Identification of human low-density lipoprotein receptor as a novel target gene regulated by liver X receptor alpha. *FEBS Lett.* **580**, 4929–4933 (2006).
201. Aravindhan, K. *et al.* Assessing the effects of LXR agonists on cellular cholesterol handling: a stable isotope tracer study. *J. Lipid Res.* **47**, 1250–1260 (2006).

BIBLIOGRAFÍA

202. Schultz, J. R. *et al.* Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev.* **14**, 2831–2838 (2000).
203. Bennett, M. K., Seo, Y.-K. K., Datta, S., Shin, D.-J. J. & Osborne, T. F. Selective binding of sterol regulatory element-binding protein isoforms and co-regulatory proteins to promoters for lipid metabolic genes in liver. *J. Biol. Chem.* **283**, 15628–15637 (2008).
204. Horton, J. D. *et al.* Activation of cholesterol synthesis in preference to fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of transgenic mice overproducing sterol regulatory element-binding protein-2. *J. Clin. Invest.* **101**, 2331–9 (1998).
205. Harvatine, K. J., Boisclair, Y. R., Bauman, D. E., Kevin Harvatine, C. J. & Henning, W. Liver x receptors stimulate lipogenesis in bovine mammary epithelial cell culture but do not appear to be involved in diet-induced milk fat depression in cows. *Physiol. Rep.* **2**, n/a-n/a (2014).
206. Xian, W., Schwertfeger, K. L., Vargo-gogola, T. & Rosen, J. M. Pleiotropic effects of FGFR1 on cell proliferation, survival, and migration in a 3D mammary epithelial cell model. *J. Cell Biol.* **171**, 663–673 (2005).
207. Liu, F. *et al.* Prolactin/Jak2 directs apical/basal polarization and luminal lineage maturation of mammary epithelial cells through regulation of the Erk1/2 pathway. *Stem Cell Res.* **15**, 376–383 (2015).