



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**PERFIL DE PROTEÍNAS NUCLEARES EN  
CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA Y DURANTE  
SU PROTECCIÓN ANTIAPOPTÓTICA POR  
DEXAMETASONA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

**P R E S E N T A:**

**Q.F.B. IRMA BEATRIZ MITRE AGUILAR**

**DIRECTOR DE TESIS DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA**

**MÉXICO D., F.**

**OCTUBRE 2008**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**LIC. BALFRED SANTAELLA HINOJOSA**

Coordinador de la Unidad de la Administración del Posgrado  
Dirección General de la Administración Escolar  
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que el Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su reunión ordinaria del 22 de Septiembre de 2008, autorizó una **segunda y última prórroga** hasta el **15 de Octubre de 2008** a la alumna **MITRE AGUILAR IRMA BEATRIZ** con número de cuenta **77314208** para obtener el grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental).

Sin otro particular, me es grado enviarle un cordial saludo.

Atentamente

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cd. Universitaria, D.F., a 23 de Septiembre de 2008.



DR. JUAN NUÑEZ FARFÁN  
COORDINADOR DEL PROGRAMA

JNF\*YMP

**PERFIL DE PROTEÍNAS NUCLEARES EN CÉLULAS DE CÁNCER  
DE MAMA Y DURANTE SU PROTECCIÓN ANTIAPOPTÓTICA  
POR DEXAMETASONA**

**Irma Beatriz Mitre Aguilar**

## **RECONOCIMIENTOS**

Este trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Alejandro Zentella Dehesa en el Departamento de Bioquímica “Guillermo Soberón Acevedo” (Unidad Periférica de la UNAM, Instituto de Investigaciones Biomédicas) en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de este proyecto estuvo integrado por:

DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” e Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.  
DRA. IRMA OFELIA BERNAL LUGO, Facultad de Química, UNAM.  
DRA. VILMA MALDONADO LAGUNAS, Instituto Nacional de Cancerología.

El proyecto fue apoyado por CONACYT (45519-M) y PAPIIT (IN-229607). Durante los estudios de maestría conté con una beca de CONACYT (199434).

Agradezco el apoyo técnico y académico, las sugerencias y los consejos de mi maestro el M. en C. José Luis Ventura Gallegos del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM e Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”.

El apoyo otorgado por la Dra. Laura Ongay (unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular). Al apoyo técnico de la Bióloga Edith Noemi Aguilera V. (Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán) ., al apoyo técnico y académico de la candidata a Doctor Delina Montes Sánchez (Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán” e Instituto Nacional de Cancerología). Al apoyo de mi maestra la Dra. Criselda Mendoza Milla (Instituto de enfermedades respiratorias).

Agradezco especialmente al Ingeniero Químico Eusebio Moreno Ramírez por el invaluable apoyo técnico y académico en el asesoramiento del Análisis Bidimensional y durante todo el desarrollo de esta tesis.

## **MIEMBROS DEL JURADO**

Presidente: Dr. Sergio Manuel Encarnación Guevara  
Vocal: Dra. Irma Ofelia Bernal Lugo  
Secretario: Dr. Alejandro Zentella Dehesa  
Suplente: Dra. Rebeca López Marure  
Suplente: Dr. Luis Felipe Jiménez García

## DEDICATORIAS

*D*oy gracias a DIOS por darme la vida, una gran familia y con ello la felicidad.

*D*edico especialmente esta tesis a mi madre AGUSTINA, porque ella siempre fue mi motivo principal para seguir adelante. Sé que si hoy estuvieras conmigo, te sentirías orgullosa y feliz al ver que he logrado alcanzar una meta más. Aguitos donde quiera que estés tu sabes que vives dentro de mi, te amo y te amaré por siempre, MADRE MÍA.

*A* PAPÁ TOÑO, quiero agradecerte todo lo que has hecho y haces por mi, gracias por enseñarme a amar la vida, por mostrarme que crecer en un seno familiar es algo invaluable, por enseñarme a ser una mujer responsable, por tu ejemplo, por tus bendiciones, porque ellas me acompañan donde quiera que voy. Te amo PAPÁ.

## *Gracias*

A mi familia, porque este ha sido un trabajo en equipo, cada quien colaboró con su granito de arena y ahora el título nos lo llevamos cada uno de nosotros.

A ti EUSEBIO mi amado esposo, que has sido y eres una luz en mi camino.

Porque desde que te conocí el sol no se volvió a meter jamás.

Porque al trabajar junto a ti no existe el cansancio ni el fracaso.

Por tu minuciosa y atinada dirección para realizar este trabajo

Por ser un excelente maestro de una y mil materias.

Por atender a todos mis pendientes cuando yo no lo podía hacer.

Por darme una hermosa familia y permitirme realizar como mujer.

Por ser papá, mamá, maestro y guía de nuestros hijos.

Por ser el compañero de mi vida que siempre anhelé.

Por enseñarme, por tu paciencia.

Por todos tus desvelos.

Porque siempre estas ahí, siempre a pesar de todo.

Por tu amor, en verdad muchas gracias. TE AMO, Dios te bendiga.

A mis hijos que son el motivo principal de mis alegrías. Porque gracias a ustedes la vida vale más. Ustedes le han dado un valor agregado a mi existencia. Porque con ustedes aprendí que un hijo significa amor recíproco, amor leal, amor total, amor que todo lo puede y todo lo fortalece.

A DANIEL, Danito guantón, Mitrito, por tu ejemplo de cordura e inteligencia. Porque desde pequeño me has hecho sentir una madre orgullosa, por tus primeros lugares en la escuela, por tus logros, por tu disponibilidad para colaborar, porque además eres mi amigo y porque me encanta conversar contigo. Por tus atinados consejos que ya ayudan a papá y mamá. Porque hasta aprendiste a cocinar para liberarme muchas veces de esa tarea. Gracias More te amo.

A DIANA LAURA, Bella, mamá hermosura, Porque cuando sonrías sale el Sol, por todos tus consejos que me guían para salir de mis malos ratos, por tu cordura, por tu ejemplo de madurez. Por ser mi cómplice. Por ser mi ángel. Porque las noches que dormías entre mis brazos mientras yo estudiaba no los olvidaré jamás. Porque has sacrificado tus horas de juego por mi. Por tus buenos consejos para que un tutorial no me intimidara. Por tus festines para toda la familia. Por tu inmenso amor. Gracias Mora te amo.

Perdón a los dos, por todo el tiempo que he pasado alejada de ustedes porque "mamá esta ocupada". Pero esto vale la pena y se que para ustedes seré un buen ejemplo a seguir.

A mis queridos hermanos, los amo y extraño siempre. Porque nuestros padres nos enseñaron a amarnos y respetarnos en las buenas y en las malas. Porque aunque estemos lejos siempre estamos juntos.

Porque somos el producto de un gran amor que ni aun la muerte pudo separar.

A LULÚ, Luluchita, Luli, por tu ejemplo de responsabilidad, cordura, y sacrificio. Porque gracias a tus cuidados y desvelos mis sobrinos Mary, Christian y Josué han alcanzado ya gran parte de sus metas. A Arturo porque veo que ha construido una familia sólida en la que considero gobierna el bienestar y la felicidad.

A TOÑO, tío Toño, Toñin, a LYDIA, Lyan, tía Lydia , a TONY, y a DAVID, por estar siempre a nuestro lado, por ser nuestros confidentes, por las largas veladas charlando, por su enorme e incondicional hospitalidad, por permitirnos sentir que en mi familia no somos cuatro sino OCHO, por permitirnos pasar las vacaciones mas padres que nadie se pueda imaginar. Por esperarnos cada fin de semana. Dios los Bendiga.

A DALILA, manita, porque tal vez sin tí mis hermanos y yo no existiríamos. Por la alegría y unión que les diste a mis padres. Por ser nuestra hermana mayor y por siempre estar cuando mas te hemos necesitado. A RODOLFO, cuñis por todos los momentos que hemos convivido, las navidades, los agradables y los tristes momentos... A mis sobrinos RODOLFO, HEBERT y a mi sobrina y ahijada ELISA, porque han hecho crecer más a la familia y con ello las alegrías.

Al Dr. Zentella por darme la oportunidad de vivir este lapso tan aventurado y tan anhelado de mi vida. Por confiar en mí. Porque ha traído a mi vida un cambio muy importante y necesario que me ha hecho ver la vida desde amplias perspectivas y “bidimensiones”.

Porque sus sabias palabras “Irma disfrute su maestría, no la sufra” fueron un aliento para momentos difíciles, en los que mi vida parecía un circo de 5 y hasta de 7 pistas.

Por enseñarme que para trabajar no se necesita de una extrema disciplina, ni del regaño mucho menos del enojo.

Por permitirme trabajar en un ambiente donde se respira paz, amistad, progreso, donde se le da de beber al sediento de aprender. En donde las metas están cercanas de alcanzar. Por las veces que me compartió alimento de su mismo plato. Por las decenas de veces que he estado anotada en su agenda. En verdad gracias. Por ser como es.

Por ser mi jefe, mi tutor, mi maestro y muchas veces mí amigo.

A la Dra. Vilma, porque aceptaste además, ser mí asesora. Porque fuiste la primera persona que de entrada me enseñó a armar un anteproyecto, por toda la paciencia que tuviste conmigo, porque me dijiste como organizar mi tiempo, mi trabajo, desde como leer una artículo hasta como llevar una agenda diaria. Porque cada vez que he tenido la oportunidad de platicar contigo, termino llena de optimismo, me inyectas una buena dosis de energía.

A la Dra. Bernal, por sus enseñanzas y aportaciones, porque siempre se preocupó de que mi trabajo estuviera bien hecho. Porque siempre tuvo una opinión muy crítica para que aprendiera a hacer una buena tesis.

A los miembros del jurado de examen que leyeron esta tesis y contribuyeron con sus comentarios y observaciones para mejorar este trabajo.

A José Luis, mi compañero, amigo y compadre. Por tus enseñanzas, por mostrarme que el realizar bien las cosas te lleva a andar una sola vez el camino porque rinde buenos frutos. Por tu disponibilidad para el trabajo, porque haces a un lado tu trabajo para atender una solicitud de ayuda. Por tus consejos, comentarios y tu buen humor que permiten que el trabajo fluya por si solo. Porque gracias a tu auténtica y sincera forma de ser, la amistad se puede prolongar hasta nuestros rincones mas preciados: nuestra familia. A Marisela, Luis y Sebastián que son el motivo de tu lucha diaria.

A Deli, la Gober, D Montes, por tu amistad, por tu forma tan sencilla y práctica de hacer las cosas, por mostrarme que el trabajo sencillo y bien organizado da buenos resultados. Porque después de que aprendí me diste alas para volar sola y confiar en mi misma. Por las numerosas partidas a casa juntas. Por los congresos. Por todos los geles que escaneamos juntas en la facultad de química. Por las materias que llevamos juntas. Por los consejos recibidos después de largas charlas personales y de trabajo. En verdad gracias amiga, por alivianar mí carga. Buena suerte. Que logres todas tus metas al lado de Charly. Te voy a extrañar mucho.

Al Dr. Pedraza, Fixi, Sigi tu extrema sencillez te abre las puertas de la amistad. Quiero que sepas que ya cuentas con la mía. Por solicitar mi opinión cuando la requieres, espero te sirva. Por el End Note, por el PDF converter. Por esas cazuelas tan exquisitas. Por tu sonrisa y la de Alejandra. No pierdas tu sencillez, no abuses.

A la Dra. Ibarra, Mary por tu atinada facilidad para integrar y armar la presentación para el segundo de mis tutorales. Me da mucho gusto observarte y sentir que poco a poco va floreciendo la gran persona que llevas dentro de ti.

A la Dra Erika, porque algunas de tus opiniones quedaron plasmadas en mi tesis, por tu capacidad para poder distinguir lo importante de las cosas, porque al fin Doña Irma dejó de parir chayotes con sus geles bidimensionales. Y dejó de ponerse triste ante el primer EMSA que no le salió, porque tú me dijiste que solo me preocupara después del séptimo.

A la valiente Dra. Criselda, Cris, porque siempre tuviste un momento para dedicarlo a mí cuando mas lo necesité, por tus enseñanzas en el IFC-Typhoon, por ser mi maestra de EMSAS, por recordarme a las cinasa y fosfatasas.

A Aime, Aimiko Veracruz, por tu constancia y perseverancia, la meta esta próxima no desistas! Por la niña tierna que llevas dentro, no permitas que la vida te lastime. Quitale las piedras del camino y sigue adelante.

A Gladis, porque desde siempre he recibido el consejo de una mujer luchadora y emprendedora, que ha vivido grandes retos de la vida y para mí es un placer contar contigo, recibir un abrazo sincero, es un placer y un honor ser tu amiga.

A Normita, por la ternura que te caracteriza.

A Maggi de 29, por tu alegre, jovial y extrovertida forma de ser. A Tania le ha de ir muy bien.

A la Sra. Mary gracias por estar siempre conmigo, por ser mi confidente, una madre durante tantos años, la quiero y aprecio mucho, Mary de mi vida.

A Jaime, por tu leal e incondicional amistad. Porque siempre cuento contigo. Porque ahora que somos padres de familia hemos logrado estrechar más nuestra amistad.

A la Sra. Manue por todos sus favores recibidos, porque siempre ha estado ahí cuando más la he necesitado. Por los chalecos y suéteres para Daniel cuando era bebé. Por todas sus preocupaciones, atenciones y paciencia que tiene para mí y para mi familia. Por las invitaciones a su casa. Por todas las comidas. En verdad gracias.

A Greta, comadre y amiga, por tu altruista forma de ser, por tu forma tan práctica de ver la vida, por la organización tan excelente que tienes para todo, espero algún día aprender de ti. Por los ratos de convivencia y de unión que has logrado con nuestro grupo de trabajo, por los pescaditos de semana santa, por las pizzas y los hot dogs de temporada, por las películas del camino...Dios te colme de bendiciones y también a July y a Greta.

A Carmita, por tu amistad, porque se que en las buenas y en las malas siempre he contado contigo. Me da gusto que por fin la vida cambia y hace justicia y todo parece ir como debe ser. Gracias amiga.

A Araceli, Ara, por los buenos ratos, por las buenas carcajadas que me has arrancado, por los memos y por los recados olvidados, pero eso que importa, lo importante es sentirse bien y tu tienes la gracia para que uno se sienta bien. Ara no cambies tu forma jovial que tienes de ser. Tal vez mucho se lo debes a tu inseparable compañero, Toxqui.

A Edith, por ser mí amiga. Por la ayudadota para el formato de este trabajo, por tus alicientes, por tu ternura, por tus porras, por tu respeto, por tu disponibilidad. Porque me prestaste la bibliografía necesaria de biología para presentar el examen de admisión a la maestría. Por tu PDF converter. Y más...

Al Dr. Huberman. Con todo respeto porque aunque tarde, un buen día me pregunto si deseaba mi libertad y gustosa la acepté.

A mis compañeros Ámbar

A César, el ex -Señorito Esquivel, felicidades por tus dos metas alcanzadas, tu maestría y tu matrimonio. Disfrútalas.

A Fernando, Pollo, a mi maestro, porque aprendí mucho de ti, no solo de tu clase sino de tu forma de ser. Por el artículo de huevecillos de *Xenopus* que me tuviste que explicar para mi clase de celular.

A Adriancito, espero algún día conozcas una mujer que valore la gran persona que eres.

A Alma Rosa, por compartir tus conocimientos, el trabajo, por tus críticas, tus porras y tu amistad.

A Víctor Edén, porque has mostrado que sí quieres puedes. Por ser un chico honesto, educado, estudioso y muy risueño. No te metiles tanto. Oh sea no?

A Gaby (Chapitas, mi gallita, picitos pelones) por tu candidez y tu gallardía. Por tu valentía y pasión por la aventura.

A Héctor, Hermaya, toda una personalidad.

A Mario Augusto, por tus regalos desde Texcoco, por tu ayuda para biología molecular. Por tu sencillez.

A Lenka por llevarme a casa al salir de la clase de biología celular.

A la Dra Martha Legorreta, a mi maestra, por tu amistad, por tus consejos, por las charlas cuando amablemente me llevabas de mi casa a la FES Zaragoza a mi clase de Bioquímica.

A Marco porque eres un ejemplo a seguir. Continúa así y triunfarás. Eres un chico admirable.

A mis amigas de toda la vida, Rosy, a Yvonne, a Rocío, por su amistad incondicional, porque al pasar del tiempo hemos logrado mas que una amistad y somos como hermanas. A Sarita Montaña, porque por mas de un semestre me prestaste el Alberts para emprender este camino.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, mi Universidad especialmente a la facultad de Química y de Ciencias que me han visto crecer. Aguárdenme que próximamente, ahí voy de nuevo.

A la vida que me ha dado tanto.

Porque me permite compartir con todos ustedes este momento tan grato y tan importante para mi, pero que sin ustedes cambiaría de sentido. Gracias por su amistad, por su compañía, sus críticas, por su amor, por ser como son y quien son.

A todos los que olvidé mencionar...

# ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE TABLAS	II
RESUMEN	III
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
1.    LA PROTEÓMICA EN EL CÁNCER DE MAMA	3
2.    CÁNCER DE MAMA	4
3.    FACTOR DE NECROSIS TUMORAL (TNF)	8
3.1.  Apoptosis	9
4.    FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NF- $\kappa$ B	11
4.1.  Activación de NF- $\kappa$ B por TNF	12
5.    GLUCOCORTICOIDES	13
5.1.  Dexametasona (Dex)	14
5.2.  Receptores Nucleares (RN)	15
JUSTIFICACIÓN	17
HIPÓTESIS	18
OBJETIVO GENERAL	19
OBJETIVOS PARTICULARES	19
MATERIALES Y MÉTODOS	20
I.    CULTIVO DE CÉLULAS MCF-7	20
II.   CURSOS TEMPORALES DE VIABILIDAD CELULAR	20
III.  OBTENCIÓN DE EXTRACTOS NUCLEARES	21
IV.   ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL	23
IV.I.  Preparación de la muestra	23
IV.II. Primera dimensión	24
IV.III. Segunda dimensión	24
IV.IV. Tinción de plata	25
IV.V.  Tinción con Deep Purple	26
IV.VI. Análisis de los Patrones de Proteínas en los Geles Bidimensionales	26
V.    ENSAYO DE RETARDO DE MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA (EMSA)	27
V.I.  Fosforilación de oligonucleótidos	27
VI.   INMUNOENSAYOS TIPO “WESTERN BLOT”	28
RESULTADOS	30
DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	59
CONCLUSIONES	75
BIBLIOGRAFÍA	78

# ÍNDICE DE FIGURAS

	INTRODUCCIÓN	1
Figura 1.	En células tumorales, el TNF estimula dos vías Antagónicas	2
Figura 2.	Cáncer de mama	5
Figura 3.	Mortalidad en mujeres por cáncer cérvico uterino y cáncer de mama.	6
Figura 4.	Características estructurales comunes del receptor de glucocorticoides.	15
	RESULTADOS	30
Figura 5.	Morfología celular durante la protección conferida por dexametasona contra la muerte inducida por el TNF.	31
Figura 6.	Morfología de células MCF-7 durante la protección conferida por dexametasona contra la muerte inducida por el TNF durante 96 h de tratamiento.	32
Figura 7.	Viabilidad de células MCF-7 durante la protección conferida por dexametasona contra la muerte por TNF	33
Figura 8.	Patrones bidimensionales de proteínas nucleares.	35
Figura 9.	Patrón bidimensional de proteínas nucleares de células tumorales MCF-7.	38
Figura 10.	Análisis de los patrones bidimensionales de proteínas nucleares asociados a la protección por dexametasona.	40
Figura 11.	Distribución porcentual de proteínas de acuerdo a su volumen, descritas en la tabla 2	45
Figura 12.	Expresión de la subunidad p65 del NF- $\kappa$ B.	49
Figura 13.	Translocación de la subunidad p65 del NF- $\kappa$ B en el núcleo y del I $\kappa$ B $\alpha$ en el citoplasma.	51
Figura 14.	Expresión del Receptor de glucocorticoides	53
Figura 15.	Análisis de los cambios de expresión de las cuatro manchas seleccionadas en la figura 8 después de 20 min de tratamiento.	55
Figura 16.	Histogramas del índice volumen/área de cada tratamiento en la proteína 1, 2, 3 y 4.	56
Figura 17.	Expresión del Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA)	58
	DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	59
Figura 18.	Distribución de vectores de deformación de extractos nucleares de células tratadas con TNF	64
Figura 19.	Análisis visual. Una comparación entre Control y Dexametasona	68
	CONCLUSIONES	75
Figura 20.	Señalización activada por TNF y Dexametasona en células MCF-7.	77

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>RESULTADOS</b>	<b>30</b>
Tabla 1.	Reporte obtenido después del análisis de los geles aplicado a 8 proteínas seleccionadas	42
Tabla 2.	Clasificación de las proteínas obtenidas de acuerdo a su volumen	44
Tabla 3.	Conjunto de proteínas que son comunes en todos los tratamientos	46
Tabla 4.	Disminución y/o aumento en el índice volumen/área de las proteínas 1, 2, 3 y 4 con respecto al control	56

## RESUMEN

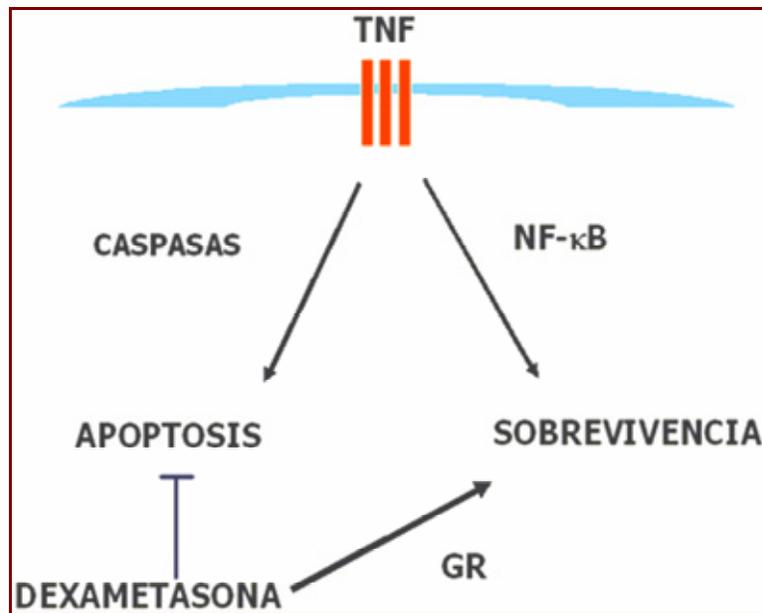
La dependencia hormonal en el cáncer de mama ha sido asociada a sus efectos sobre la proliferación celular y protección de la muerte celular por apoptosis. En la línea celular de cáncer de mama humana MCF-7, el Factor de Necrosis Tumoral (TNF), estimula dos respuestas celulares antagónicas: de muerte por apoptosis y de sobrevivencia por la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B. Este factor es un heterodímero, (p65, p50) generalmente localizado en el citoplasma de manera inactiva al estar unido a su inhibidor I $\kappa$ B $\alpha$ . La dexametasona (Dex), glucocorticoide sintético, protege de la muerte inducida por el TNF en células MCF-7 en forma dependiente de su receptor de glucocorticoides (GR). Hemos planteado la hipótesis de que el mecanismo por el cual la Dex protege de la muerte inducida por TNF se asocia a cambios en el perfil de proteínas nucleares, debido a la translocación nuclear de algunos factores de transcripción, los cuales incluyen a NF- $\kappa$ B y al GR. Utilizando la alta resolución de la electroforesis bidimensional, obtuvimos los perfiles de proteínas nucleares (aisladas con alta fuerza iónica) de células MCF-7 estimuladas con Dex, TNF, ambos Dex/TNF y su control sin estímulo, teñidas con fluorescencia. Se analizaron con el programa Image Master 2D Platinum 6.0. Nuestros resultados muestran que el perfil de proteínas nucleares se modificó con solo 20 min de tratamiento con Dex, TNF y con ambos Dex/TNF. Así mismo identificamos una proteína que por la localización de su peso molecular, punto isoeléctrico y comportamiento frente al estímulo, corresponde a la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B. El análisis de inmunoensayos tipo western blot y del retardo de la movilidad electroforética en extractos nucleares nos permitieron corroborar la translocación al compartimiento nuclear de NF- $\kappa$ B y GR. Los resultados del presente estudio indican que la protección de la Dex sí se asocia a cambios en el perfil de proteínas nucleares en las células MCF-7 y que sí incluyen al NF- $\kappa$ B y al GR. Finalmente, estos resultados muestran que el análisis proteómico puede ser un método valioso para la identificación de marcadores útiles para el tratamiento del cáncer de mama. Proponemos que el sistema NF- $\kappa$ B es un blanco terapéutico posible para combatir el cáncer de mama dependiente de hormonas.

## INTRODUCCIÓN

La dependencia hormonal en el cáncer de mama ha sido asociada a sus efectos sobre la proliferación celular, la resistencia tumoral, a modificaciones en los efectos de fármacos antineoplásicos y al aumento de la muerte celular por apoptosis.

El TNF es una citocina que participa en la regulación de la proliferación, diferenciación celular y apoptosis. En las células tumorales MCF-7, línea de adenocarcinoma mamario humano dependiente de hormonas (aislada de una efusión pleural de una paciente con carcinoma ductal es, probablemente la línea celular mejor estudiada de todas las líneas de cáncer de mama) (Soule et al, 1973), el TNF estimula dos vías antagónicas: una que activa la apoptosis dependiente de caspasas y otra de sobrevivencia celular mediada por la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, heterodímero formado por dos proteínas de diferente peso molecular, (p65 y p50) que generalmente se encuentra en el citoplasma inactivado al estar unido a su inhibidor I $\kappa$ B $\alpha$ . La dexametasona (Dex), glucocorticoide sintético derivado de la prednisolona, inhibe la apoptosis inducida por el TNF, aunque hasta el momento no se sabe cual es su mecanismo de acción, la protección contra la apoptosis que confiere la Dex ha sido utilizada como un modelo útil para el estudio de este tipo de cáncer de mama. La Dex se une a su receptor citoplasmático, conocido como receptor de glucocorticoides (GR), que está unido a la HSP90, una proteína de choque térmico. La unión de la Dex con su receptor, estimula que éste se active, se

transloque al núcleo y se una en forma dimérica a secuencias conocidas como elementos de respuesta a glucocorticoides GRE en el ADN, donde estimula la expresión de genes de supervivencia (Bcl-2, c-IAP1, c-IAP2, etc.). Dicha expresión se traduce en la modificación de los perfiles de proteínas nucleares, durante el lapso que precede a la muerte inducida por el TNF. Y por tanto se analizó el perfil de proteínas nucleares asociadas a esta protección.



**Figura 1.** En células tumorales, el TNF estimula dos vías antagónicas.

El factor de necrosis tumoral (TNF) en células tumorales estimula dos tipos de respuesta, una de muerte por apoptosis vía caspasas y otra de supervivencia, mediada por la activación del factor de transcripción NF-κB. La Dex, inhibe el efecto citotóxico del TNF a través de la activación de su receptor de glucocorticoides (GR) (Fig. 1)

## ANTECEDENTES

### 1. LA PROTEÓMICA EN EL CÁNCER DE MAMA

Ya que las proteínas son las responsables de las funciones celulares, es importante realizar el análisis de todas las proteínas (proteoma) presentes en la célula en un momento en particular. Este tipo de análisis ha mostrado que el proteoma es dinámico, que las proteínas cambian según el ambiente y estado fisiológico en que se encuentra el organismo. Dos o más estados diferentes de una célula (tejido sano y tejido enfermo) pueden ser comparados y con ello identificar cambios cualitativos y cuantitativos en las proteínas. Estas proteínas se podrán utilizar como marcadores para el diagnóstico y predicción de enfermedades y blancos terapéuticos (Mas, 2007).

La proteómica es una herramienta muy poderosa para estudiar las funciones de todas las proteínas de una célula. Esto provee de esperanza para la temprana detección y diagnóstico del cáncer de mama u otra enfermedad, el pronóstico y la predicción de la respuesta a la terapia. (Somari, 2005.).

El análisis proteómico implica la separación de proteínas a partir de mezclas complejas por electroforesis o cromatografía de una línea celular, tejido, etc, para la caracterización e identificación de cada una de ellas por espectrometría de masas.

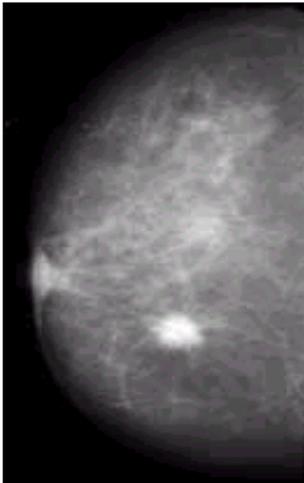
La electroforesis bidimensional (2D-PAGE), estudia el patrón global de las proteínas, su expresión, identificación y caracterización. Es una técnica de alta resolución que permite la separación de mezclas de proteínas altamente

complejas. La base de su elevado poder de resolución está precisamente en la bidimensionalidad, es decir en que las proteínas son separadas secuencialmente por dos criterios físicos. En primer lugar, según su punto isoeléctrico y en segundo lugar, según su peso molecular. Tras la tinción del gel las proteínas resueltas se observan como manchas circulares en un gel, también conocidas como "spots". Con esto se obtiene el perfil de las proteínas presentes en una mezcla y revela datos cualitativos (presencia o ausencia de una molécula) (Mas, 2007). Es una técnica ampliamente utilizada en la confección de mapas de referencia, es decir, en la disección de la composición proteica de un determinado organelo o tipo celular. Cuando estos mapas se utilizan para comparar distintas situaciones experimentales, (distintas condiciones de cultivo, diferentes tratamientos con fármacos o compuestos tóxicos, tejidos sanos o enfermos, líneas celulares normales y tumorales), la electroforesis bidimensional adquiere toda su importancia (Somari, 2005).

## **2. CÁNCER DE MAMA.**

El cáncer de mama ocupa en nuestros días un papel preponderante a nivel mundial como causa de enfermedad y muerte dentro del sexo femenino. En la mujer adulta el cáncer de mama constituye el tumor más frecuente, representa la segunda causa de morbimortalidad en la mujer. En el mundo se estima que por año se presentan un millón de casos de cáncer de mama (Informe 2002 de la Organización Mundial de la Salud, WHO). Cada año 40,000 mujeres del mundo mueren por cáncer mamario. En todo el mundo se hacen esfuerzos para detener su avance, encontrar una cura más efectiva y detectarlo en forma más temprana (Jiménez, 2001).

El cáncer es una enfermedad que se caracteriza por la proliferación descontrolada de células en las que han ocurrido alteraciones en los genes relacionados con el ciclo celular, donde pueden tener lugar tres tipos de cambios: inmortalización, transformación y metástasis (Lewin, 2000).



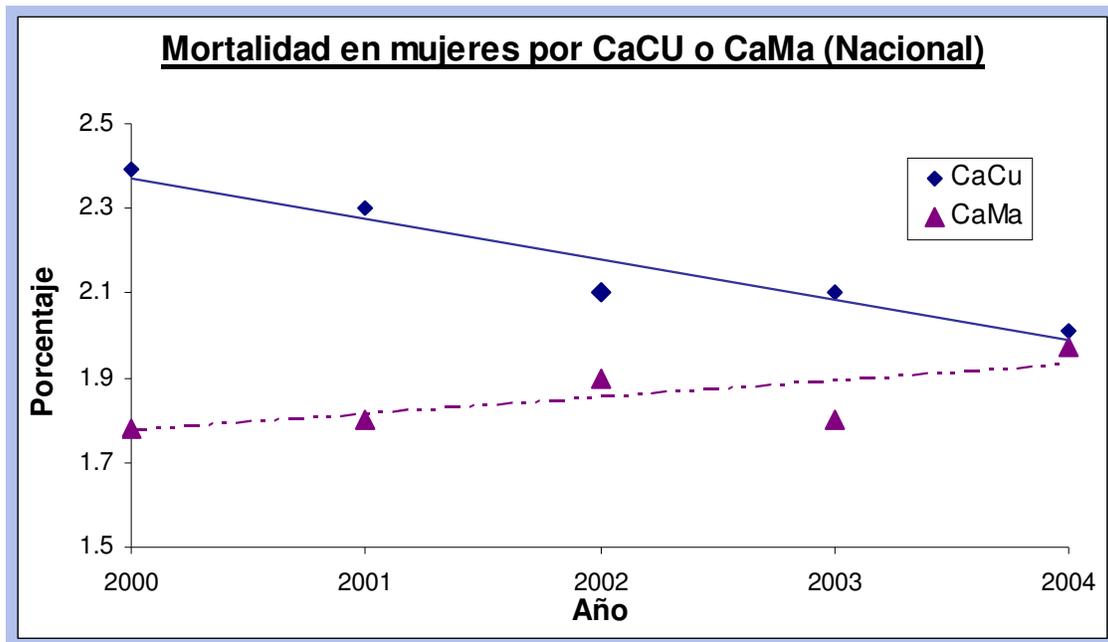
**Figura 2. Cáncer de mama.** La imagen muestra una mastografía de mama en la que se observa una mancha blanca que representa un tumor. El primer signo en el cáncer es, generalmente, una pequeña tumoración en una mama, a menudo en la parte superior del lado externo. Cuando el cáncer se disemina, lo hace a través de los vasos linfáticos y se presenta una tumefacción de los ganglios linfáticos de la axila.

En México, el cáncer de glándula mamaria representa la segunda causa de muerte por enfermedades oncológicas después del cáncer cérvico uterino (Informe Nacional de Salud, 2001). La incidencia de cáncer de mama es de 17 X 100,000 mujeres y la edad promedio es de 48 años. Actualmente mueren 10 mujeres al día por este motivo, se calcula que dentro de 3 años serán 13 mujeres al día.

Se ha estimado que una de cada 13 mujeres se ve afectada por la enfermedad (INEGI; 2006).

Uno de los problemas del cáncer de mama es su capacidad invasiva y producir metástasis.

Es conocido que cuando el cáncer se detecta en sus etapas iniciales, los esquemas terapéuticos existentes son altamente eficientes pero, esto no es así para las etapas invasivas, por lo que es claro que la adquisición de un fenotipo invasivo que permita la diseminación de células cancerosas representa hoy en día una de las principales causas de morbilidad en los pacientes oncológicos.



**Figura 3. Mortalidad en mujeres por cáncer cérvico uterino y cáncer de mama.** En México, la mortalidad por cáncer de mama en las mujeres ocupa el segundo lugar (13.1%), después del cáncer cérvico-uterino (13.3 %) (INEGI, 2006).

Desde el punto de vista epidemiológico se considera que en el momento que el cáncer de mama ha producido metástasis no existe tratamiento curativo para la enfermedad y es la principal causa de muerte en las mujeres con este tipo de cáncer (Jemal et al 2006; Parkin et al 2001).

La característica más importante de los tumores malignos de mama es que un 40% son hormona-dependientes (el contacto con hormonas los activa) lo cual brinda una pauta en el tratamiento a seguir (Vidal, 2003).

Por su etiología y desarrollo el cáncer de mama es una enfermedad compleja multifactorial que se asocia con una gran variedad de factores de riesgo. Entre estos factores se encuentran: factores hereditarios de 1<sup>er</sup> orden, el riesgo aumenta cuando lo padece la madre, la hermana o la hija; factores hereditarios de 2<sup>o</sup> orden cuando lo padece la abuela, la tía etc., factores hormonales, el riesgo aumenta cuando el primer embarazo a término se tuvo después de los 35 años; por ausencia de embarazos; en mujeres de raza blanca; primera menstruación (menarca) antes de los 11 años; última menstruación (menopausia) después de los 55; duración de la lactancia (en este caso el lapso de exposición a estrógenos, ventana estrogénica es muy amplio); factores genéticos como mutaciones en los genes BRCA I y BRCA II, p53, (Dumitrescu y Cotaria, 2005). etc. Factores ambientales como los relacionados con la ubicación geográfica (actualmente la mayor incidencia se observa en los estados del norte del país, el estado de Jalisco y el Distrito Federal); factores del medio ambiente como es la exposición prolongada a la luz ultravioleta del sol o exposición a químicos peligrosos que son liberados a la atmósfera por la industria (Lodish et al, 2004); el estatus socio-económico; el estilo de vida; dieta; obesidad; actividad física; consumo de alcohol, se ha mostrado que el alcohol puede actuar indirectamente a través de su primer metabolito, el acetaldehído, un mutágeno y carcinógeno muy bien caracterizado, que puede actuar como promotor tumoral o bien permitir la activación de pro carcinógenos (Dumitrescu y Cotaria, 2005).

### **3. FACTOR DE NECROSIS TUMORAL (TNF)**

El TNF, también conocido como caquectina es una citocina de 157 aminoácidos, conformada como heterotrímico en solución. Proteína de 26 KDa que hidrolizada por la enzima TACE (Enzima convertidora de TNF) da lugar al monómero de 17 KDa.

El factor de necrosis tumoral alfa fue aislado en 1975 a partir del suero de ratones sometidos a tratamiento con endotoxina bacteriana (Balkwill, 2002). El factor de necrosis tumoral además es una citocina derivada principalmente de fagocitos mononucleares, linfocitos T y células NK (Natural Killer). En fibroblastos, células de músculo liso y células tumorales, el TNF es expresado en bajas cantidades.

En ciertos tumores actúa como factor necrótico, de donde deriva su nombre, actúa como factor inflamatorio, estimula la proliferación y la diferenciación celular (Liu, 2005).

El TNF estimula diversas respuestas biológicas: en células tumorales una de las principales señales es que induce apoptosis, es interesante notar que el TNF no induce apoptosis en ninguna célula primaria normal.

El TNF actúa por vía de dos distintos receptores. Sin embargo, aunque la afinidad por el receptor 2 a TNF (TNFR-2) es cinco veces más alta que para el TNFR-1, éste último es quien inicia la mayoría de las actividades biológicas del TNF. El TNFR-1 se expresa en todos los tipos celulares, mientras que la expresión del TNFR-2 se restringe a las células del sistema inmune. La diferencia más importante entre ambos receptores es un dominio de muerte (DD) en TNFR-1, ausente en TNFR-2. Una razón por la que el TNFR-1 es un miembro importante de la familia de receptores de muerte, es que cuenta con la capacidad dual de

inducir muerte celular apoptótica a través de una cascada de caspasas y de transducir señales de supervivencia celular a través del sistema NF- $\kappa$ B (Van Horsen *et al*, 2006). Es un citotóxico selectivo para las células tumorales de cáncer de mama, promueve esta respuesta dual de apoptosis y supervivencia en células MCF-7 (Baltimore, 1996; Antwrep *et al.*, 2000; Donato y Klostergaard, 2004).

### 3.1. Apoptosis

La apoptosis o muerte celular programada es un mecanismo crucial durante el desarrollo de los organismos, por el cual se eliminan células dañadas, infectadas. La falta de coordinación en el proceso apoptótico se asocia a la aparición de padecimientos como el cáncer (Giannettiet al., 2004). Apoptosis es un término derivado del griego y está conformado por 2 vocablos: **apo** – proveniente de, y **ptosis** – que cae, por lo que de manera genérica hace referencia al evento de caída de hojas y pétalos que presentan plantas y flores. (Danial and Korsmeyer, 2004).

Durante el proceso apoptótico se presentan cambios bioquímicos y morfológicos característicos. Las células apoptóticas tienen una morfología característica: aparición de protuberancias en la membrana, reducción del tamaño celular, condensación nuclear y fragmentación del ADN. Eventualmente la cromatina se compacta en grado extremo y el núcleo termina por desintegrarse.

Existen principalmente dos vías apoptóticas, la extrínseca y la intrínseca. En la vía intrínseca intervienen la mitocondria y factores claves como el citocromo C. La vía extrínseca se inicia con la activación de receptores membranales. Las dos vías

convergen en la activación de caspasas, proteasas especializadas, las cuales son iniciadoras y efectoras responsables de desencadenar muchos de los mecanismos bioquímicos y metabólicos que caracterizan el proceso (Yan and Shi, 2005).

Las caspasas (en inglés caspases: cysteinyl aspartate-specific proteases) son cisteín-proteasas, se han dividido en dos tipos: las iniciadoras (tipo I) y las ejecutoras (tipo II) (**Schafer** and Kornbluth, 2006; Kornbluth and White, 2005). Se han identificado a la fecha 14 caspasas que participan en la muerte apoptótica, (Kornbluth and White, 2005).

En mamíferos las caspasas son inactivadas por la unión de proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPS). Las IAPS tienen motivos estructurales denominados BIR, que están formados por aproximadamente 80 amino ácidos y como sello característico presentan sitios de unión a  $Zn^{2+}$ , que son esenciales para su función anti-apoptótica. (Cashio et al, 2005).

Existen receptores de muerte localizados en la superficie celular, que se caracterizan por tener un dominio extracelular rico en cisteínas, y que al unir a su ligando específico promueven la muerte celular programada. Estos receptores pertenecen a la familia de proteínas de los Factores de Necrosis Tumoral (TNF).

La respuesta celular del TNF sigue la vía extrínseca, la cual se inicia cuando el TNF se une a sus receptores membranales TNFR1 (p65) y TNFR2 (p75) lo que provoca una trimerización. El receptor TNFR1 puede unirse a proteínas adaptadoras como TRADD y FADD, seguido de la activación de las caspasas ejecutoras 8 y 3 que son enzimas clave en la ejecución del programa de apoptosis. Su bioactividad es regulada por los receptores de unión a TNF soluble.

Aunque la afinidad por el TNFR2 a TNF es cinco veces más alta que por el TNFR1, éste último es quien inicia la mayoría de las actividades biológicas del TNF. La diferencia más importante entre ambos receptores es un dominio de muerte (DD) en TNFR1, ausente en TNFR2.

Las proteínas mitocondriales de la familia Bcl2 (del inglés B-cell lymphoma 2), actúan como sensores importantes de señales extra e intracelulares, y regulan positiva y negativamente el proceso apoptótico (Yan and Shi, 2005).

#### **4. FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NF- $\kappa$ B**

NF- $\kappa$ B, es el factor nuclear de la cadena *kappa* ( $\kappa$ ) de los linfocitos B opera como homodímero y heterodímero. Es un factor de transcripción primordial en la regulación de genes de sobrevivencia. Pertenece a la familia NF- $\kappa$ B en mamíferos e incluye a cinco miembros: (RelA p65, RelB, c-Rel, NF $\kappa$ B1 p50/p105 y NF $\kappa$ B2 p52/p100). Todos ellos comparten un dominio de homología Rel altamente conservado, el cual es responsable de la unión al ADN, de la dimerización e interacción con los inhibidores intracelulares de NF- $\kappa$ B denominados I $\kappa$ Bs (I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ , I $\kappa$ B $\gamma$  y Bcl-3), éstos bloquean la secuencia de destino nuclear de NF- $\kappa$ B. Este sistema de inhibidores requiere ser activado mediante la fosforilación por el complejo de cinasas IKKs. Esta familia de cinasas IKK incluye: (IKK- $\alpha$ , IKK- $\beta$  y NEMO IKK- $\gamma$ ), IKK- $\alpha$  es la cinasa de I $\kappa$ B- $\alpha$ . De las proteínas inhibidoras del NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$  es la más abundante. La fosforilación de dos residuos conservados de serina (Ser 32 y Ser 36) el dominio N-terminal de I $\kappa$ B- $\alpha$ ., permite la inmediata poliubiquitinación de I $\kappa$ B por el complejo SCF- $\beta$ -TrCP que actúa como ubiquitin-

transferasa tipo 3. Esta modificación convierte a la proteína en un blanco para la rápida degradación por parte de la subunidad 26 S del proteosoma. La degradación del inhibidor permite la liberación en el citoplasma la y translocación del NF- $\kappa$ B al núcleo gracias a sus dos secuencias de destino nuclear (Viatour et al, 2005; Lopez et al, 2004; Yamamoto-Gaynor, 2004; Perkins, 2000), donde éste se une a secuencias específicas en regiones reguladoras del ADN designados como elementos *kappa beta*, ( $\kappa$ B). La unión a los elementos  $\kappa$ B en el ADN resulta en la activación de la transcripción de genes mediadores de reacciones antiapoptóticas y de sobrevivencia como Bcl-xl, cIAP, XIAP, cFLIP (Aggarwal, 2004; Chen, 2001).

#### **4.1. Activación de NF- $\kappa$ B por TNF**

El TNF es miembro importante de la familia de receptores de muerte ya que en células tumorales estimula dos respuestas antagónicas, una de inducción de la apoptosis y otra de transducción de señales de sobrevivencia celular (Van Horssen, 2006), mediante la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B a través de su vía clásica. No se conoce el mecanismo de acción pero se ha mostrado que mediante proteínas adaptadoras como TRADD y RIP, el TNF activa al dímero de NF- $\kappa$ B, p50/p65 que en el citoplasma se encuentra unido a su inhibidor I $\kappa$ B $\alpha$ . Al ser fosforilado I $\kappa$ B $\alpha$  se degrada y el dímero se transloca al núcleo gracias a sus dos secuencias de destino nuclear donde pueden activar los promotores de sus genes blancos al unirse a los elementos de respuesta  $\kappa$ B (Viatour et al, 2005; López et al, 2004; Yamamoto et al, 2004; Perkins et al, 2000). Se ha mostrado que el efecto protector de NF- $\kappa$ B esta mediado por

sus subunidades. La expresión de p50 y p65 confiere protección contra apoptosis inducida por TNF. Este panorama es útil para buscar estrategias que involucren al TNF y al NF- $\kappa$ B como blancos terapéuticos para el tratamiento del cáncer.

## 5. GLUCOCORTICOIDES

Los glucocorticoides (GCs) son hormonas esteroideas secretadas por la corteza suprarrenal que participan en la regulación de la glucemia, presión arterial, respuesta inmune e inflamatoria y los mecanismos de adaptación al estrés, etc. Los glucocorticoides son moléculas liposolubles que circulan en la sangre unidos a proteínas, una fracción libre difunde a las células blanco y así ejercen su función. En el citosol, los glucocorticoides se unen a su receptor específico lo que da lugar a que el receptor se separe de proteínas de la familia HSP90, que normalmente bloquean la secuencia de destino nuclear en los receptores inactivos. El complejo receptor-glucocorticoide (GR-GC), se transloca al núcleo donde puede regular ambas la transactivación (activación, “encendido”) y la transrepresión (inactivación, “apagado”) de genes al unirse en forma dimérica al ADN en secuencias específicas en regiones reguladoras denominadas elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE), cuya secuencia consenso es AGAACANNNTGTTCT (Greenstein, 2002).

La síntesis de compuestos de gran potencia tópica, escaso efecto sistémico y su rápida metabolización ha revolucionado en los últimos años el uso de agonistas sintéticos de estos glucocorticoides (tamoxifén) en el tratamiento de algunas enfermedades (Almawi and Malemedjian, 2002; Pepin and Borden, 1991).

### 5.1. Dexametasona (Dex)

La Dex (9 $\alpha$ -fluoro-16 $\alpha$ -metil-prednisolona) es un glucocorticoide sintético, derivado fluorinado de la prednisolona que tiene potente actividad glucocorticoide. La Dex muestra dos respuestas biológicas en la regulación de la muerte celular (1) anti-apoptótico y (2) pro-apoptótico, dependiendo del tipo celular del que se trate: (1) Efecto anti-apoptótico: en células tumorales MCF-7 de cáncer de mama hormono-dependiente inhibe la apoptosis inducida por el TNF (Moran et al, 2000). En hepatocitos (Bailly-Maitre et al, 2002) y en osteoclastos (Weinstein et al, 2002). (2) Efecto pro-apoptótico: en células normales como linfocitos o células de bazo (Distelhort2002). El efecto protector que confiere la Dex ha sido reconocido como un modelo valioso para el estudio del cáncer de mama hormona-dependiente (Messmer et al, 2001; Pagliacci et al 1993). Actualmente no se sabe cual es el mecanismo por el que la Dex interfiere con la apoptosis inducida por el TNF en células tumorales MCF-7. Algunos estudios han mostrado que este glucocorticoide modula la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (Sheinman et al., 1995; Almawi y Maledjian, 2002; Machuca, 2006).

En los últimos 10 años se ha mostrado que además de sus efectos transcripcionales (efectos nucleares) los receptores de hormonas esteroides activan cascadas de señalización (efecto citoplasmático), como la cinasa tipo B o PKB/AKT tanto en células MCF-7 de cáncer de mama, como en células RG5P53-10 de la granulosa de rata y en células L929 de ratón (Sasson et al, 2003).

## 5.2. Receptores Nucleares (RN)

El receptor de glucocorticoides (GR) es un receptor nuclear (RN). Los RN son proteínas que actúan como factores transcripcionales, pues el complejo ligando-receptor nuclear regula la transcripción de genes blanco.

Los RN son estructuralmente semejantes a los factores de transcripción pero presentan además un dominio de unión a ligando. Además del dominio de unión al ligando (DUL), poseen una secuencia señal de localización nuclear (LN), un dominio de unión al ADN (DUA), localizado en la región central de la molécula y que está formado por dedos de Zinc, los cuales interactúan con la doble hélice del ADN en el surco mayor del mismo y un grupo de 5 aminoácidos que forma una hélice correspondiente a la zona de dimerización del receptor (DD). Asimismo, los extremos amino (NH<sub>2</sub>) y carboxilo (COOH) del receptor contienen los dominios de transactivación transcripcional DT1 y DT2, respectivamente (Fig. 4).



**Figura 4. Características estructurales comunes del receptor de glucocorticoides.**

Los receptores nucleares, se unen como dímeros a elementos de respuesta en el ADN (PuGGTCA o PuG(G/A)ACA) organizados en secuencias palindrómicas. El receptor para glucocorticoides (GR), es un factor de transcripción dependiente de

ligando. (Métivier- Reid, 2006). El gen del GR se localiza en el cromosoma 5 y consta de 9 exones. Su actividad está regulada por tres promotores principales (1A, 1B y 1C) que contienen sitios de unión para diversos factores de transcripción. Existen dos tipos de GR,  $-\alpha$  y  $-\beta$ , cuyo ARN mensajero deriva del corte y empalme alternativo del exón 9. Poco tiempo después de su clonación, se identificó al GR- $\alpha$  como el GR que interviene en las acciones mediadas por los glucocorticoides. En su forma inactiva se encuentra en el citoplasma unido a chaperonas (HSP90 – inmunofilinas y varias proteínas adicionales) que impiden su entrada al núcleo al bloquear la secuencia señal de localización nuclear. Cuando el ligando se une al receptor, este último se activa, debido a cambios conformacionales y a su hiperfosforilación mediada por MAP cinasas. Como resultado, las proteínas chaperonas se disocian y los dominios DUA y DD, quedan expuestos, lo cual da lugar a la formación de homo y heterodímeros con otros miembros de la misma familia. El dímero activo entra al núcleo y se une a secuencias específicas del ADN de genes blanco a través del dominio DUA, con lo cual hay un aumento en la expresión de dichos genes que se logra mediante un proceso de transactivación transcripcional. (Collingwood et al, 1999).

Al final, estos eventos promueven el reclutamiento de la maquinaria basal transcripcional, que incluye a la ARN polimerasa II y los factores transcripcionales generales (GTFs) (Rochette-Egly, 2005).

## JUSTIFICACIÓN

La protección antiapoptótica que confiere la Dex requiere de dos eventos moleculares asociados a la translocación de proteínas del citoplasma al núcleo: la activación del receptor de glucocorticoides GR y del factor de transcripción NF- $\kappa$ B. Proponemos que el efecto protector de la Dex requiere, además del GR y NF- $\kappa$ B, de otros factores de transcripción y proteínas asociadas a la remodelación de la cromatina. La identificación de factores de transcripción por medio de secuencias blanco (EMSA), por anticuerpos específicos (inmunoprecipitación o western blot) o por una combinación de ambas técnicas (CHIP), sólo permite el estudio de factores conocidos y además requiere de un análisis individual. Una alternativa para evidenciar las modificaciones en el perfil de proteínas nucleares asociadas a la protección es el análisis bidimensional de las proteínas nucleares. Esta aproximación proporciona una visión del universo de proteínas que se modifica durante el compromiso de muerte inducido por TNF y durante la protección que confiere la Dex contra este proceso.

A futuro puede uno centrar su atención en la señal de aquellas proteínas nucleares que aumenta, disminuye o cambia de posición para su identificación por espectrometría de masas.

## **HIPÓTESIS**

El mecanismo por el cual la Dexametasona protege de la muerte inducida por TNF se asocia a cambios en el perfil de proteínas nucleares, las cuales incluyen a los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y GR.

## OBJETIVO GENERAL

- Analizar los perfiles de proteínas nucleares en células tumorales MCF-7 tratadas con TNF y Dex o con ambos. Mediante Electroforesis Bidimensional, ensayos de EMSA e inmunoensayos tipo “Western blot”.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer en que momento la Dex induce protección en células MCF-7, mediante cursos temporales de viabilidad.
- Obtener el perfil de proteínas nucleares en MCF-7 por Electroforesis Bidimensional, en células tratadas y no tratadas.
- Análisis digital de los perfiles de proteínas nucleares obtenidos en los geles bidimensionales células MCF-7 tratadas y no tratadas.
- Analizar la translocación al núcleo de NF- $\kappa$ B por EMSA (Ensayo de Retardo Movilidad Electroforética)
- Analizar a NF- $\kappa$ B en el citoplasma por inmunoensayos tipo “western-blot”
- Analizar la translocación al núcleo del GR por EMSA.
- Analizar la presencia de GR en el núcleo por inmunoensayos tipo “western-blot”.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **I.- CULTIVO DE CÉLULAS MCF-7**

Las células MCF-7 aisladas de un cáncer humano de mama, fueron obtenidas de la American Type Culture Cell Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). Las células fueron crecidas en medio RPMI-1640 (GIBCO, Rockville MD, USA) suplementado con 10% (v/v) de suero fetal de bovino inactivado a 45 °C para eliminar las proteínas del complemento (SFBi, GIBCO, Rockville MD, USA), antibióticos (penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml), antimicótico (anfotericina B 0.25 µg/ml) y L-glutamina 2 mM (GIBCO, Rockville MD, USA). En todos los casos las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 100% de humedad relativa.

Las soluciones empleadas para el cultivo celular fueron esterilizadas por filtración con membranas de 0.22 µm (Millipore, tipo GS). Para los ensayos experimentales se utilizaron cultivos celulares con una confluencia del 75%-80%, la resiembra y la proliferación celular se hicieron a partir de un cultivo de muy baja densidad celular llamado acarreador.

### **II.- CURSOS TEMPORALES DE VIABILIDAD CELULAR**

Este ensayo se realizó para medir la viabilidad de la células MCF-7 después de tratarlas con el TNF con o sin la dexametasona. Las células MCF-7 se sembraron en placas de 48 pozos (Corning, NY), a una densidad celular inicial de  $1.5 \times 10^4$  células/pozo, conteniendo 500 µl/pozo de RPMI-1640 suplementado como se describe en la sección

de cultivo celular. Las células fueron cultivadas durante diferentes períodos de tiempo para evaluar la muerte celular hasta 96 h.

Después de cumplir con el tiempo de tratamiento se retiró el medio de cultivo por aspiración y se fijaron las células con glutaraldehído (MERCK, Darmstadt, Alemania) al 1.1% en medio de cultivo DMEM (GIBCO, USA), suplementado con 2.5% de suero de ternera inactivado (STi). Las células se lavaron 2 veces con 500  $\mu$ l de PBS/pozo (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  4.3 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.4 mM, pH= 7.2-7.4) para eliminar el exceso de glutaraldehído, al final se secaron al aire. Las células adheridas y fijadas al pozo se tiñeron con cristal violeta al 0.1% por una hora (0.1% de cristal violeta en ácido fórmico 200 mM pH 6, filtrado con papel Whatman 3M). Después de una hora, se lavaron los pozos con agua bidestilada para eliminar el cristal violeta que no se pegó a la proteína. El cristal violeta que sí se pegó, se retiró solubilizándolo con ácido acético al 10% (J.T. Baker, Xalostoc, México) y la densidad óptica se leyó a 595 nm en una placa de 96 pozos en un lector de ELISA (Bio-Tec Instruments, Winoosky, VT). El resultado fue expresado como porcentaje de la densidad óptica contra los pozos controles.

### **III.- OBTENCION DE EXTRACTOS NUCLEARES**

Las células MCF-7 se sembraron a una densidad de  $2.5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> con 8 ml de RPMI-1640 suplementado con 10% SFBi. Después de los diferentes tratamientos las células se lavaron 2 veces con PBS, todo el proceso se llevó a cabo sobre hielo a 4 °C. Las células se rasparon en 1 ml de PBS con un gendarme, se recuperaron en un tubo eppendorff y se centrifugaron a 3000 X g durante 5 min. El sobrenadante se eliminó y el botón se congeló durante 1.5 min en un baño hielo seco-etanol. El botón se resuspendió

con 100  $\mu$ l de amortiguador hipotónico "A" (Hepes 10 mM, KCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, DTT 1 mM pH=7.9) y se incubó a 4 °C durante 10 min. Este amortiguador daña la membrana citoplásmica y permite obtener proteínas citoplásmicas. La células se centrifugaron a 3500 X g durante 10 min, el sobrenadante (fracción citoplásmica) se retiró cuidadosamente y se guardó en pequeñas alícuotas de 20  $\mu$ l a -70 °C hasta el momento de su uso, el botón de núcleos se resuspendió en 50  $\mu$ l de amortiguador hipertónico "C" (Hepes 20 mM, NaCl 400 mM, glicerol 25%, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, EDTA 0.2 mM, DTT 1 mM, PMSF 0.5 mM, pH 7.9). El buen estado de los núcleos se evaluó con la tinción de azul tripano (azul tripano 0.4%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.06%, NaCl 0.81%, Sigma, St. Louis MO, se filtró 0.22 $\mu$ m) en una proporción 1:1 (10  $\mu$ l de azul + 10  $\mu$ l de células). En base a que las células intactas excluyen al azul tripano, al microscopio se observaron refringentes e incoloras, mientras que las células dañadas se observaron teñidas de azul. Los núcleos se incubaron durante 30 min en agitación continua a 4 °C. Se centrifugaron durante 20 min a 4 °C a 14 000 X g. El sobrenadante obtenido que contiene la proteína nuclear fue colectado y se guardó en alícuotas de 20  $\mu$ l a -70 °C, hasta el momento de su uso. La concentración de proteína fue cuantificada en los extractos nuclear y citoplásmico por el método de Bradford a 595 nm (BioRad, Hércules, CA, USA), empleando una curva patrón de albúmina sérica bovina (ASB, Sigma, St. Louis MO).

#### **IV.- ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL**

La Electroforesis Bidimensional de proteínas de extractos nucleares, se basa en la separación de proteínas de acuerdo a su carga y tamaño. En la 1<sup>era</sup> dimensión: se utiliza un sistema de isoelectoenfoque (IEF) en un gradiente de pH inmovilizado en tiras de pH 3-10, de 7 cm de longitud (GE Healthcare, Bio-Science Sweden).

En la 2<sup>a</sup> dimensión mediante electroforesis desnaturizante con SDS en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) resulta una separación basada en su peso molecular.

##### **IV.I. Preparación de la Muestra.**

La preparación de la muestra es importante para que las proteínas se separen adecuadamente. Debido a que los extractos contienen sales que interfieren en la electroforesis bidimensional, es necesario desalar las muestras. Para ello se utilizó el Kit de purificación 2D Clean-Up Kit (Amersham, Piscataway USA), que consiste en la purificación de las proteínas, precipitándolas con ácido tricloroacético (TCA) en frío. Las sales, detergentes, lípidos y ácidos nucleicos son eliminados mediante centrifugación. Después de lavar con acetona -20 °C, se obtuvieron proteínas libres de sustancias que interfieren con el isoelectroenfoque. Las proteínas purificadas se resuspendieron en un volumen de 50 a 100 µl en un amortiguador de lisis compatible con la primera dimensión (Urea 7M, Tiourea 2M, CHAPS 4% y Anfólitos 2%, pl 3-10, sin DTT) y se cuantificó la concentración de proteínas por el método de Bradford.

**IV.II. Primera dimensión**

La hidratación de las tiras se hizo durante 10 a 18 h, con un volumen final de 125  $\mu$ l que contenía 50  $\mu$ g de extracto nuclear /10  $\mu$ l de amortiguador de lisis, 115  $\mu$ l de amortiguador de hidratación DeStreak (Urea, Tiourea CHAPS), (Amersham BioSciences, Piscataway USA). El isoelectroenfoque (IEF) se llevó a cabo en un sistema Ettan IPGphor II (GE Healthcare, Bio-Science Sweden), con un protocolo de 4 pasos: (1<sup>o</sup> 300 V – 200Vh; 2<sup>o</sup> gradiente 1000V – 300Vh; 3<sup>o</sup> gradiente 5000V – 4000Vh y 4<sup>o</sup> 5000V en 30 min), en un tiempo total de 4:15 h. Las tiras se almacenaron a -70 °C en seco. Las tiras se equilibraron durante 30 minutos en dos etapas: 15 min en 1.0 ml de DTT 70 mM en amortiguador desnaturante de equilibrio (Tris 50 mM pH 8.8, Urea 6 M, glicerol 30% SDS 2%) y 15 min en 1 ml de Iodoacetamida 140 mM en el mismo amortiguador desnaturante de equilibrio.

**IV.III. Segunda dimensión.**

La segunda dimensión SDS-PAGE se llevó a cabo utilizando geles desnaturantes de poliacrilamida al 10%, de 1.5 mm de grosor, preparados en el laboratorio antes de cada corrida. Se utilizó una cámara de electroforesis Protean III (Bio Rad, Hércules, CA, USA). El tiempo de corrida fue de 2 h, una hora a 80V y la otra hora a 100V. Después de la segunda dimensión se procedió a fijar el gel para su tinción. Posteriormente los geles se tiñeron mediante tinción de plata y/o la de Deep purple, que a continuación se detallan.

**IV.IV. Tinción de Plata .**

Todos los procedimientos se realizaron con agitación y a temperatura ambiente. El volumen aproximado por gel fue de 25 ml. Todas las soluciones se preparan con agua bidestilada, al momento de su uso y no fueron recuperables.

Se colocó el gel en 25 ml de una solución de fijación de ácido tricloroacético (TCA) al 20% en agua durante 1 hora. Se lavó durante 30 min por 2 veces con una segunda solución de fijación de etanol al 40% y de ácido acético al 10%. Se lavó el gel por 2 veces con 25 ml de agua bidestilada durante 20 min cada vez. Se colocó el gel en 25 ml de una solución de glutaraldehído al 10% en agua durante 30 min. Se lavó durante 10 min por 3 veces con agua bidestilada. El gel se tiñó con solución de plata durante 30 min (Preparación de la plata: se pesaron 0.8 g de nitrato de plata y se disolvieron en 4 ml de agua bidestilada. Esta solución se goteó lentamente y se disolvió en una solución acuosa que contenía 7 ml NaOH al 1% más 1.7 ml de hidróxido de amonio concentrado más 14 ml de agua desionizada, después de disolver se aforó a 100 ml. El gel se lavó por 3 veces con 25 ml de agua desionizada durante 5 min cada vez. Se colocó el gel en una charola limpia y se le agregó la solución de revelado (2.5 ml de ácido cítrico al 1%, 260 µl de formaldehído al 37%, aforado a 500 ml con agua desionizada), durante 10 min o hasta que las bandas y puntos se visualizaron de forma clara y sin tener mucho fondo en el gel. El revelado se terminó con la solución de paro (40% de etanol y 10% de ácido acético) por 20 min. Se lavó por 3 veces con agua desionizada de forma rápida. Se colocó la solución de conservación (10% etanol, 4% de glicerol). Se procedió a escanear los geles.

**IV.V. Tinción con Deep Purple.**

Los geles se fijaron toda la noche en etanol 10%, ácido acético al 7.5%, 25 a 50 ml por gel, se lavaron con agua desionizada durante 30 min, se tiñeron durante 1 hora en la oscuridad con una solución que contiene una parte del colorante fluorescente Deep purple y 200 partes de Carbonato de sodio  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  200 mM. Se lavó por 3 veces con 25 ml de ácido acético al 7% durante 15 min cada vez. Se procedió a escanear los geles en el Typhoon 9400 (Fluorescencia filtro laser verde 532 nm, sensibilidad PMT de 550-600 V, 50 micrones, tiempo escaneo por gel de 9:50 min). La longitud de onda de excitación es a 532 nm, filtro Green Laser y la de emisión es con el filtro 560 LP o 610 BP. Escanear a una resolución de 100 micrones.

**IV.VI. Análisis de los Patrones de Proteínas en los Geles Bidimensionales**

Para el análisis de proteínas a partir de geles bidimensionales, primero debemos digitalizar la imagen y posteriormente analizarla mediante algún programa. Para digitalizar las imágenes existe la fotografía convencional, la autorradiografía con luminol que cataliza la peroxidasa o la adquisición de la imagen por sistemas de escaneo como el Typhoon, que es nuestro caso. Para el análisis existen varios programas, en nuestro caso utilizamos el programa Image Master 2D Platinum versión 6.0. Este programa de análisis era nuevo y no había sido usado antes por nuestro grupo de trabajo, por lo que me llevó tiempo aprender a utilizarlo.

**V.- ENSAYO DE RETARDO DE MOVILIDAD ELECTROFORETICA (EMSA).**

En este ensayo se utilizó la interacción específica de la formación de un complejo DNA-proteína *in vitro* entre un oligonucleótido con una variante de la secuencia de una caja de control (que previamente ha sido marcado con un isótopo radiactivo) y su factor de transcripción. Al resolver por electroforesis en un gel no desnaturizante de poliacrilamida se separan el ADN unido a la proteína del ADN no unido, que corre más rápidamente. Para determinar si el NF- $\kappa$ B y el GR se translocaron al núcleo se detectaron las uniones ADN-proteína (Mas Oliva Jaime, 2007).

**V.I. FOSFORILACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS.**

A partir de 20 ng/ $\mu$ l de oligonucleótido kappa B (secuencia consenso NF- $\kappa$ B 5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGG-3'; Santa Cruz, CA) y del receptor de glucocorticoides (secuencia consenso GRE, 5'-AGAACANNNTGTTCT-3') se hizo la reacción de fosforilación del extremo 3' con ATP radiactivo ( $^{32}$ P) marcado en la posición gamma. A 1  $\mu$ l del oligonucleótido correspondiente, se le agregó 0.5  $\mu$ l de la enzima T4 poli nucleótido cinasa equivalente a 5 unidades (Fermentas, PNK), mas 1  $\mu$ l de amortiguador de cinasa T4 (Fermentas, PNK), mas 0.5  $\mu$ l de ( $^{32}$ P)  $\gamma$ -ATP con una actividad específica de 6000 Ci/mmol más 7  $\mu$ l de agua. Todo se mezcló perfectamente bien y con cuidado, se incubó a 37 °C durante 30 min, posteriormente se inactivó a 65 °C durante 15 min. La mezcla se enfrió lentamente y se le agregaron 30  $\mu$ l de amortiguador TBE (Tris-HCl 89 mM, ácido bórico 89 mM y EDTA 0.5 mM, pH 8.0). A 10  $\mu$ g de extractos nucleares de células control y células tratadas se les

agregaron 5  $\mu$ l de un cocktail que contenía: DTT 1 mM, 2% glicerol, 10  $\mu$ g de ASB, 1  $\mu$ g de poly-dI-dC (Amersham Biosciences, Germany), 1  $\mu$ l de la sonda marcada ( $^{32}$ P)  $\gamma$ -ATP y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente. Los complejos formados (volumen final de 20  $\mu$ l) se separaron por electroforesis a 100 volts durante 2 h en un gel nativo de poliacrilamida al 5% en amortiguador TBE (Tris-HCl 89 mM, Borato 89 mM y EDTA 0.5 M, pH 8.0). Después de la corrida el gel se secó y se colocó por lo menos 6 h en una pantalla amplificadora para incrementar la señal. Las imágenes se visualizaron por autoradiografía en un sistema analizador de imágenes Phosphorimager con un programa de Image Quant (Molecular Dynamics, San Francisco CA, USA) o en el Typhoon 9400 (Amersham Bioscience).

#### **VI.- INMUNOENSAYOS TIPO “WESTERN-BLOT”**

La inmunodetección consistió en los siguientes pasos: a) bloqueo de la membrana incubada con una solución rica en proteínas (leche al 5% en PBS- 0.1% Tween) por 1h (previno la unión inespecífica del anticuerpo), b) incubación con el anticuerpo primario toda la noche a 4°C, permitió la detección de las proteínas de interés por parte del anticuerpo marcado con peroxidasa c) incubación con anticuerpo secundario, el complejo anticuerpo proteína fue reconocido por el anticuerpo secundario que permitió la detección por ECL y la amplificación de la señal y d) el revelado que detectó proteínas de interés mediante quimioluminiscencia; este reactivo estuvo basado en una versión mejorada de una reacción de quimioluminiscencia en la cual la enzima peroxidasa de rábano (HRP)

catalizó la emisión de luz a través de la oxidación del luminol, el uso de este reactivo aumentó 100 veces la emisión de luz después de la adición del reactivo a la membrana ocurrió la degradación oxidativa del luminol resultando una emisión de luz de la longitud de onda de 428 nm (Ausubel. M., Brent, R et al., 2002 vol. 2). En geles desnaturizantes de poliacrilamida al 10% tipo SDS-PAGE se separaron de 20  $\mu$ g a 30  $\mu$ g/pozo de proteína de extractos citoplásmicos previamente desnaturizada a 94 °C durante 5 min en amortiguador de carga 5X (Tris-HCl 125 mM, pH 6.8, SDS 1% v/w, glicerol 10% v/v, azul de bromofenol 0.1%,  $\beta$ -mercaptoetanol 2% (v/v). La separación de las proteínas se realizó en una cámara de electroforesis mini Protean III (Bio-RAD, Hércules, CA, USA) en dos etapas: primero a 40 volts durante 15 min y después de 100-120 volts durante 2 h más, evitando la salida del frente. Mediante una electrotransferencia húmeda con un amortiguador ( Tris-HCl 25mM , Gly 125 mM, metanol 10%, pH 7.5) las proteínas separadas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa Hybond-ECL o de PVDF (Amersham, Buckinghamshire, UK) durante toda la noche a 70 Volts. Las membranas transferidas fueron bloqueadas por 1 h con 5% de leche descremada (Svelty, Nestlé) en TBS-Tween 0.1%. Posteriormente, fueron incubadas durante 1.5 a 2 h con el anticuerpo anti-I $\kappa$ B- $\alpha$  a una dilución de 1:1000 (Santa Cruz, CA, USA) en TBS-Tween y 1% de ASB. Finalmente se incubó durante 45 min a 1 h con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa anti-IgG de conejo a una dilución de 1:10 000 (Zymed, Carlsbad, CA, USA) en TBS-Tween con 5% de leche descremada. La señal fue revelada por quimio-luminiscencia con un reactivo comercial supersignal (PIERCE, Rockford, GB) exponiendo contra una película fotográfica (Kodak, Rochester NY, USA).

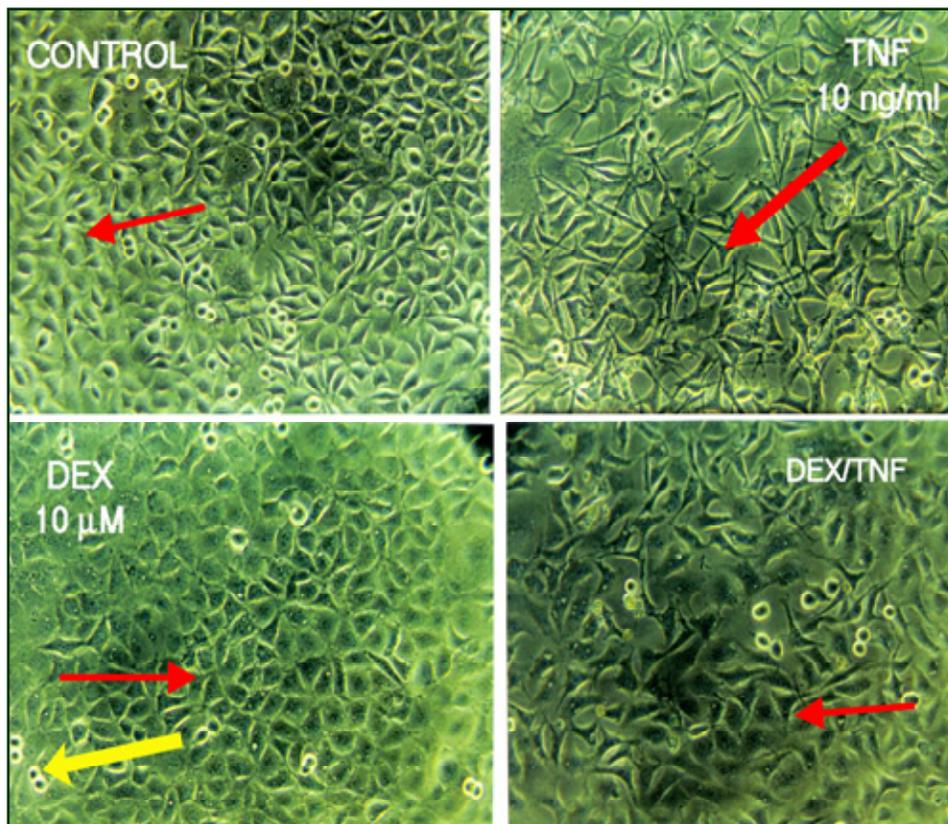
---

## RESULTADOS

### I. Morfología de la células MCF-7 tratadas con Dex, TNF o Dex/TNF.

Con la finalidad de verificar el efecto apoptótico por TNF y la protección antiapoptótica por Dex en las células tumorales MCF-7 con las que trabajaríamos durante el análisis bidimensional, realizamos cultivo celular, estimulación de las células y medición de la viabilidad celular.

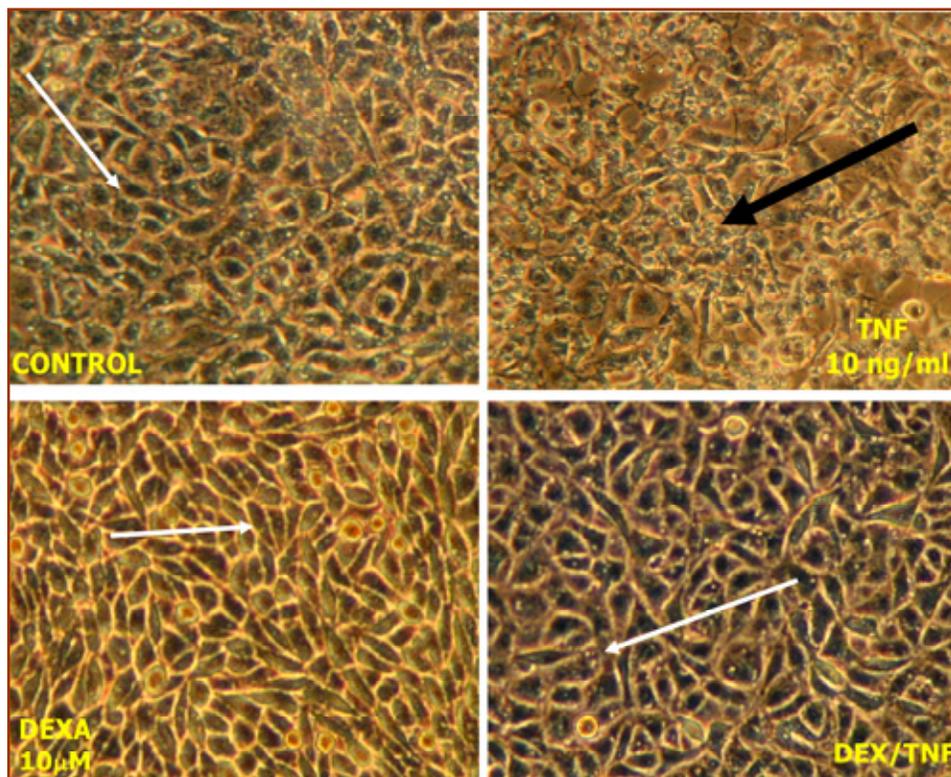
Para observar la protección que confiere la dexametasona ante el efecto citotóxico del TNF, utilizamos cuatro condiciones diferentes de tratamiento: células MCF-7 sin tratar a las que nombraremos control, células estimuladas con TNF (10 ng/ml), Dexametasona (Dex) 10  $\mu$ M y células con ambos tratamientos Dex / TNF. Estos tratamientos dieron como resultado cambios en la morfología celular y fueron registrados por micrografía (figura 5 y 6). En la figura 5 se muestran imágenes de células MCF-7 después de 48 h de tratamiento. Las células tratadas con TNF mostraron cambios morfológicos, como la retracción de los cuerpos celulares y la formación de células alargadas con formas espiculadas (flecha roja gruesa en la micrografía figura 5 correspondiente a TNF). La observación al microscopio mostró que en todos los tratamientos se redujeron el número de figuras mitóticas (figura 5, flecha amarilla se observan figuras redondas en pares, flotantes y refringentes como antifaces) con respecto al control. La disminución fue del 62%, 56% y 58%, en las células tratadas con TNF, Dex y Dex/TNF respectivamente, lo que parece indicar que en todos los tratamientos se disminuyó la tasa de proliferación celular.



**Figura 5. Morfología celular durante la protección conferida por dexametasona contra la muerte inducida por el TNF.** Micrografía de células tumorales MCF-7 después de 48 h de tratamiento. Micrografías adquiridas en un microscopio NIKON, modelo TMS, con un aumento 20X y filtro verde. Las flechas delgadas muestran morfología normal de las células, la flecha gruesa morfología anormal, células alargadas.

En la figura 6 se muestran imágenes de células MCF-7 después de 96 h de tratamiento, las diferencias morfológicas con respecto al control son más evidentes que las que se observaron a las 48 h en la figura 5. En los cultivos tratados durante 96 h con TNF se observa mucho detritus celular (flecha negra en la micrografía figura 6 de células tratadas con TNF), un conteo comparativo de TNF contra el control, reflejó un 50% de células viables. También se observó una retracción de

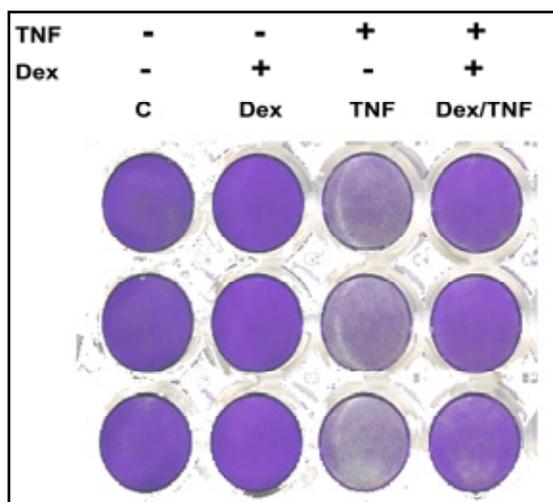
los cuerpos celulares en células tratadas con TNF, así como células despegadas. En las células tratadas con Dex y con Dex/TNF, no se observó ninguno de los cambios morfológicos observados con TNF. La morfología de estos cultivos (Dex y Dex/TNF) fue muy similar a la de las células control.



**Figura 6. Morfología de células MCF-7 durante la protección conferida por dexametasona contra la muerte inducida por el TNF durante 96 h de tratamiento.** Micrografías adquiridas con filtro amarillo. Las flechas blancas muestran la morfología normal de las células, la flecha negra morfología anormal, células dañadas.

### I.I. La viabilidad celular ante el tratamiento con dexametasona y TNF.

Con el fin de cuantificar la muerte celular observada en las micrografías de la figuras 5 y 6 empleamos el ensayo de tinción con cristal violeta y medimos la densidad óptica. Los resultados de la tinción después de 72 h de tratamiento se muestran en la figura 7. El tratamiento con dexametasona, no indujo cambios morfológicos que pudieran indicar muerte celular, se cuantificó una viabilidad del 70% de acuerdo a la intensidad de la tinción con cristal violeta con respecto al control, que indica una posible interferencia con la proliferación celular, estudios previos en nuestro grupo de trabajo han mostrado que la Dex interfiere con la proliferación celular en células MCF-7 (Machuca 2006). Las células tratadas con TNF mostraron una viabilidad celular del 16% con respecto al control. Al comparar el tratamiento de Dex/TNF con respecto a Dex se observó una protección en la viabilidad del 92%. Datos mostrados no mostrados.

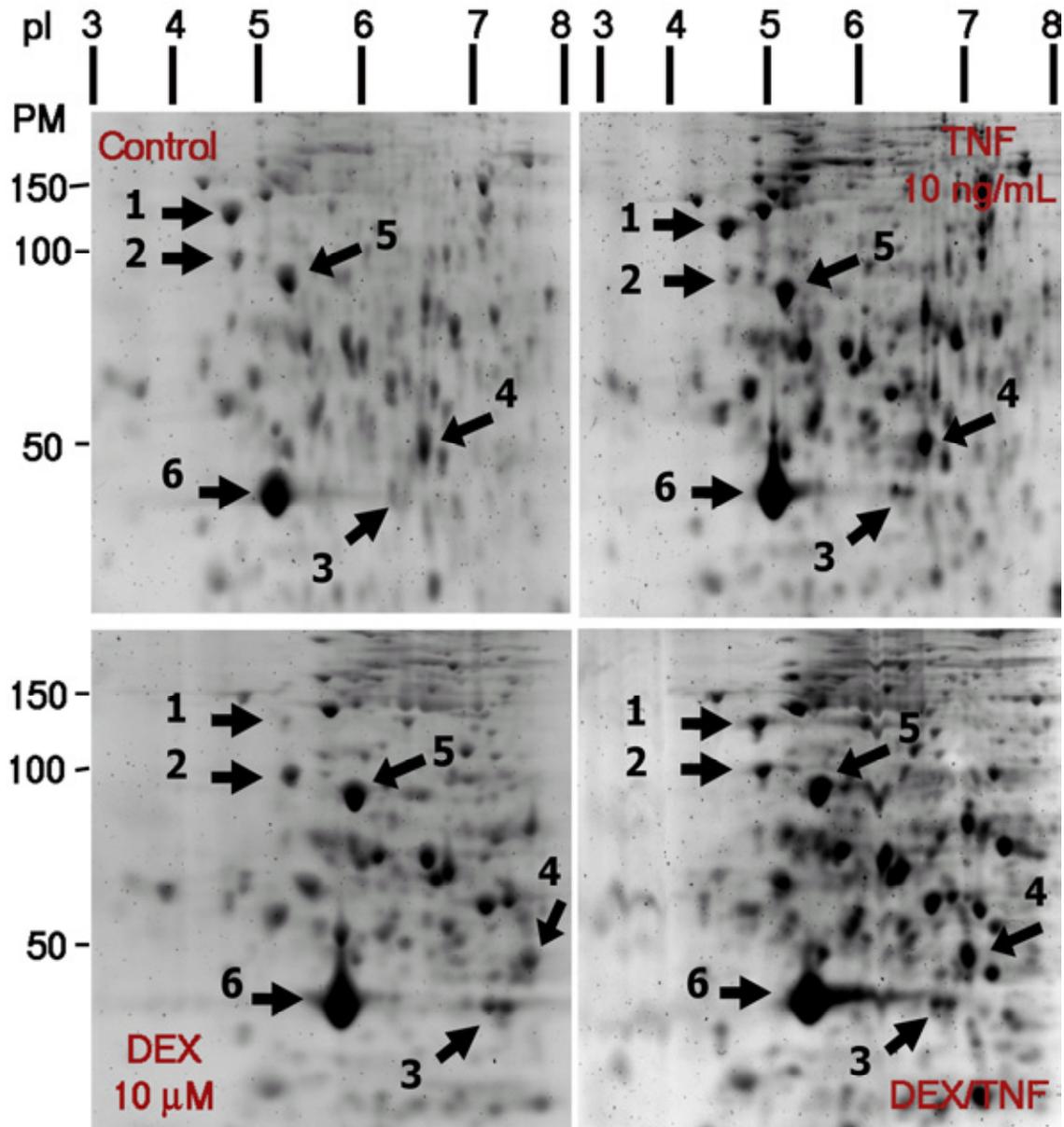


**Figura 7. Viabilidad de células MCF-7 durante la protección conferida por dexametasona contra la muerte por TNF.** Tinciones con cristal violeta obtenidas después de 72 h con los tratamientos indicados: C: control; Dex: dexametasona (10  $\mu$ M); TNF: Factor de necrosis tumoral (10 ng/ml) y Dex/TNF: células que recibieron simultáneamente ambos tratamientos

## II. Obtención de perfiles nucleares bidimensionales

Después de haber corroborado mediante cambios morfológicos y de viabilidad que la protección antiapoptótica que confiere la Dex, en nuestro modelo celular sí se llevaba a cabo, procedimos a observar el perfil bidimensional de proteínas nucleares de células tumorales MCF-7. A los extractos nucleares de células sin tratamiento, control, solo se le cambió el medio de cultivo donde crecieron con medio fresco que contenía el vehículo que disuelve a la dexametasona (etanol), y se incubaron durante 20 min. En la figura 8 se muestran imágenes correspondientes al perfil de proteínas nucleares de la región de pI de 3 a 8 y de PM de 40 a 150 KDa de células tumorales MCF-7 con los tratamientos ya descritos. El enfoque logrado fue muy satisfactorio considerando que solo se cargaron 50 µg de proteína nuclear en un gel de dimensiones pequeñas de 8 X 7 cm de 1.5 mm de grosor. La calidad de los geles permitió analizar cambios a simple vista. Las flechas (1 a 4) en cada gel señalan cuatro proteínas que elegimos por haber presentado cambios muy aparentes con respecto al control y nos sirvieron como punto de referencia. Las cuatro proteínas seleccionados cambian en intensidad, algunas la aumentan y otras disminuyen tanto que puede llegar hasta la desaparición de la mancha. Por ejemplo la mancha 1 disminuyó de intensidad sólo en el tratamiento con Dex. En contraste la mancha 2 aumentó de intensidad en el tratamiento con Dex y con Dex/TNF. Así también observamos manchas que prácticamente no cambiaron en su intensidad con ninguno de los tratamientos (ejemplos manchas 5 y 6, figura 8). Así también tenemos una

proteína que es la actina, que nos sirvió como una proteína de referencia con valores de punto isoeléctrico y peso molecular conocido.



**Figura 8. Patrones bidimensionales de proteínas nucleares.** Las imágenes muestran regiones parciales de los geles. Separación por punto isoeléctrico (PI) y por peso molecular (PM) de 50  $\mu$ g de extractos nucleares de células MCF-7 obtenidos después de 20 min con los tratamientos indicados. Las flechas (de la 1<sup>a</sup> a la 4<sup>a</sup>) señalan cuatro manchas que cambiaron en intensidad con los cuatro tratamientos. Los geles fueron teñidos con el reactivo fluorescente “deep purple” (excitación 532 nm y emisión 610 nm), digitalizados con el equipo Typhoon 9400 GE.

---

### **III. Análisis de los patrones bidimensionales de proteínas nucleares asociados a la protección por dexametasona.**

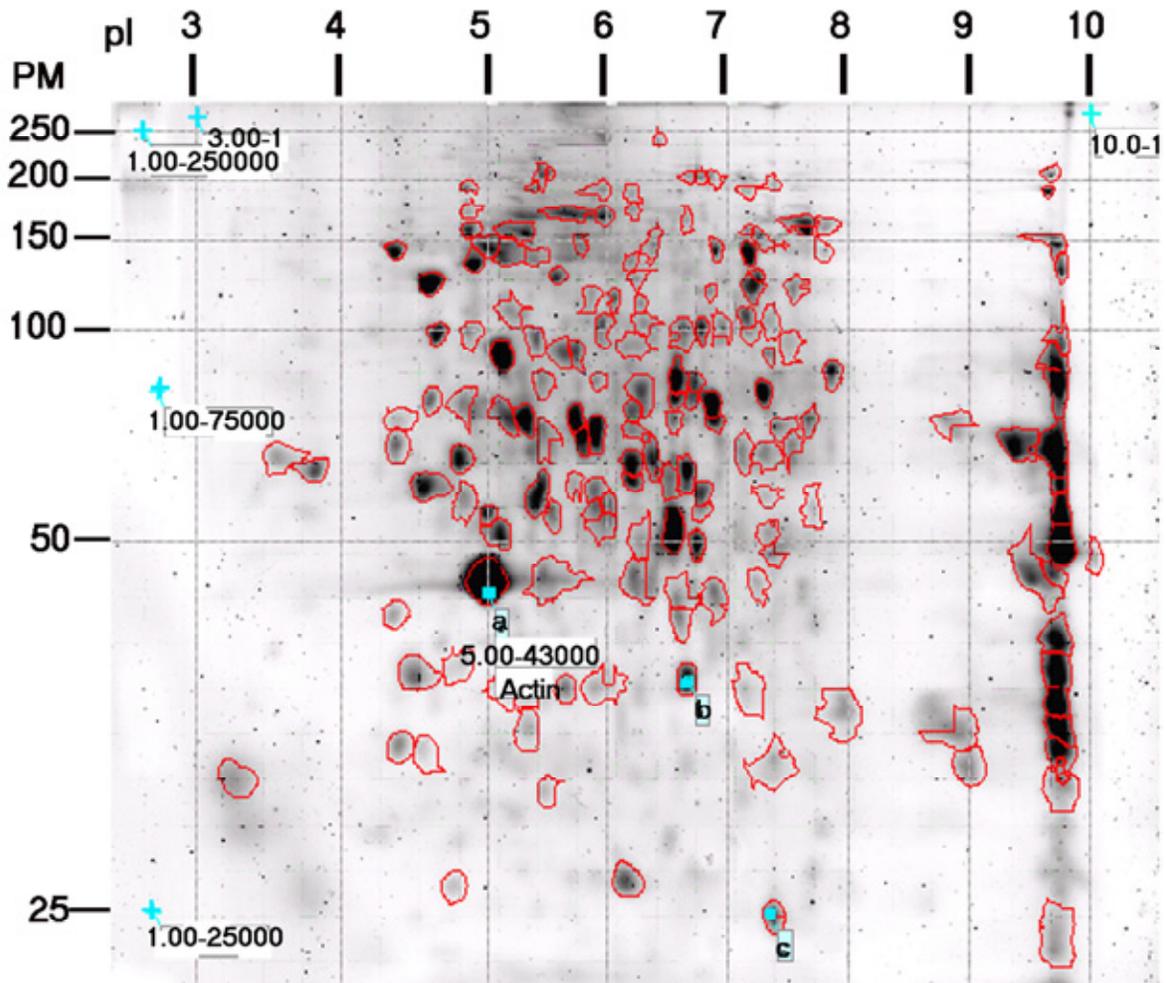
Para detectar y cuantificar en los geles los cambios obtenidos durante la separación bidimensional del perfil de proteínas nucleares de células tumorales MCF-7, utilizamos el programa para análisis que mide el número de bytes en la imagen de un área definida después de haber sido escaneada, Image Master 2D Platinum 6.0 (GE Health Care). Este programa registró el número de manchas totales de cada tratamiento, su posición relativa y la intensidad de cada una de ellas.

Las manchas que tuvieron menos de tres veces el promedio del ruido de fondo y las que tenían mucha señal contra el ruido de fondo en un área pequeña, fueron consideradas como artificios y descartadas. Los geles fueron escaneados en un equipo Typhoon 9400 GE. (GE Health Care) y con su programa la imagen digitalizada fue adquirida en el formato “.mel”. Las imágenes obtenidas de geles bidimensionales, presentan una distribución de manchas con variaciones de intensidad, tamaño y posición de acuerdo al tratamiento recibido.

Las proteínas están representadas por una escala de valores de “grises” que generan manchas representadas por píxeles, cada píxel está caracterizado por sus coordenadas X y Y, que representan la posición de la mancha en el plano cartesiano (gel), datos que posteriormente el programa utiliza para realizar cálculos estadísticos como regresión lineal etc. En una imagen tridimensional el eje Z representa la intensidad almacenada en bites que se emplean para analizar los cambios en intensidad. Para realizar el análisis bidimensional es necesario contar

al menos con tres geles reproducibles de cada tratamiento. Para obtener una buena comparación entre estos tres geles, es necesario hacer la calibración de cada uno de ellos, esto se logra estableciendo etiquetas del punto isoeléctrico utilizado durante la primera dimensión, en nuestro caso es pI 3 a pI 10, etiqueta [3.00 -1] en el extremo izquierdo superior del pozo preparativo del gel y [10.00 -1] en el extremo superior derecho del mismo pozo. Del patrón del peso molecular en Daltones utilizado durante la segunda dimensión (PM 20 a 300 KDa), etiqueta superior [-1 250 000] e inferior [-1 20 000]. Si además se conoce el pI/PM de alguna de las proteínas del gel, se etiqueta con su respectivo [pI PM] en nuestro caso conocemos la posición de la actina [5.00 43000]. Además se establecen dos o tres puntos mas, elegidos visualmente, debe ser una mancha que se encuentre aislada y en todos los geles a comparar, se etiqueta [a], [b] y [c]. Para la detección de manchas se utilizaron los parámetros: "smooth", "min area", "saliency", valores recomendados para proteínas (Smooth 1, Min Area 16, Saliency 200.000) que funcionan como filtros que ayudan a distinguir si una mancha posee las características de una proteína o las de un artefacto como por ejemplo polvo o una basura. La comparación de todos los geles de un mismo tratamiento se realizó contra un gel de referencia elegido por nosotros. La información acumulada de los tres geles permitió generar un gel maestro virtual para cada tratamiento. El programa permitió hacer las comparaciones entre los patrones de los diferentes tratamientos utilizando los geles maestros.

La imagen de la figura 9 corresponde a un gel control con etiquetas de calibración de pI, PM, Actina y puntos a, b, c. En el se reportó un total de 174 manchas de diferente tamaño, intensidad, forma y distribución. Las manchas encerradas en rojo



**Figura 9. Patrón bidimensional de proteínas nucleares de células tumorales MCF-7.** La imagen muestra un gel representativo en donde se realizó la separación por punto isoeléctrico (pI) y por peso molecular (PM) de proteínas nucleares (50  $\mu$ g), en células control después de 20 min de tratamiento con 5 ml de medio de cultivo RPMI y el vehículo (5  $\mu$ l de etanol). La tira con los anfolitos inmovilizados tuvo un rango de pI de 3 a 10, el gel de acrilamida fue al 10%. El gel fue teñido con el reactivo fluorescente "deep purple" y digitalizado con el equipo Typhoon 9400, GE.

son consideradas como proteínas en este análisis. En esta imagen se observa que la mayoría de las proteínas del núcleo de las células MCF-7 se encuentran distribuidas entre un punto isoeléctrico (pI) de 4.0 a 8.0 y un peso molecular (PM) entre 40 a 150 KDa. Un menor grupo de proteínas se enfocó en pI 10.0. Es de llamar la atención que este grupo se encuentra alineado en este pI. También se

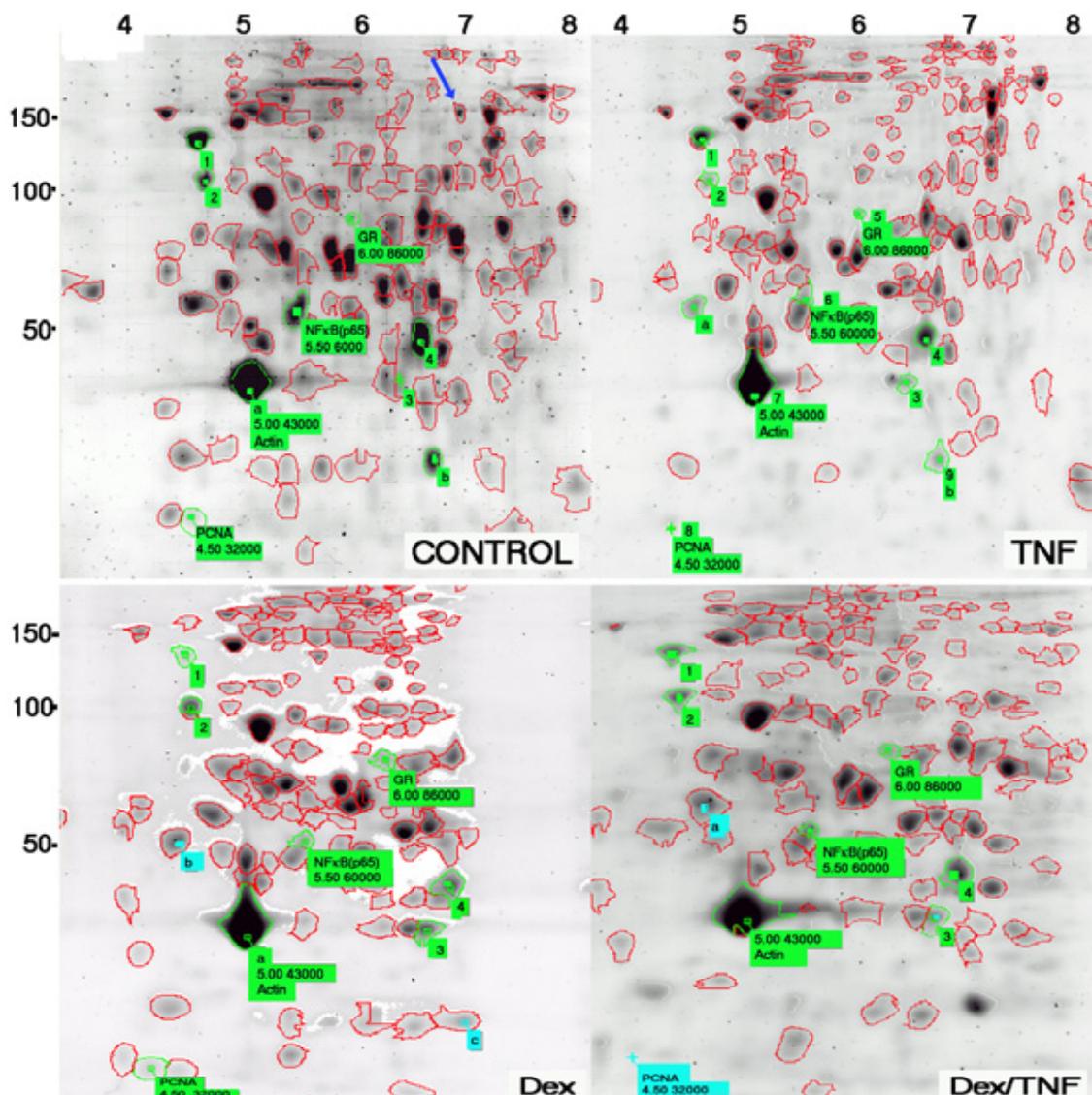
---

observa que una gran parte de las manchas son pequeñas y tenues. Es interesante observar que en el intervalo entre el pI más bajo 3.0 y 4.0 el programa solo identificó 3 manchas y algo similar ocurrió en el intervalo de 8.0 a 9.0 donde solo se identificaron 4 manchas.

Los geles de los tres tratamientos y el control fueron sometidos al análisis bidimensional, en la figura 10 se muestra la imagen teñida con “deep purple” de cuatro regiones de geles representativos de cada uno de los tratamientos. A diferencia de los geles de la figura 8, estas imágenes fueron generadas con los siguientes parámetros de filtrado: “smooth = 1,”min area = 16”, “saliency = 200.000”.

Las imágenes presentan manchas encirculadas en rojo y otras sin esta marca, el encirculado indica que éstas fueron asignadas como proteínas, las demás como artefactos o basura y no fueron consideradas en los análisis. Las etiquetas verdes señalan a un grupo de 9 manchas que seleccionamos, 4 de ellas corresponden a manchas desconocidas que presentaron cambios significativos en su intensidad (etiquetas chicas numeradas del 1 al 4).

Otro grupo de 4 manchas es el que de acuerdo a sus posiciones relativas de pI y PM, (datos obtenidos de una base de datos llamada EXPASY, al ingresar la secuencia de aminoácidos de cada proteína, obtenida en “Pub Med proteins”), corresponderían a GR (5), la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B (6), actina (7) y al Antígeno Nuclear de Proliferación Celular PCNA (8) y (etiquetas grandes con nombre, pI y PM), la novena mancha [b] (9), nos sirvió para realizar la calibración del gel (manchas señaladas en el gel de TNF).



**Figura 10. Análisis de los patrones bidimensionales de proteínas nucleares asociados a la protección por dexametasona.** Las imágenes muestran regiones parciales de los geles en los rangos de punto isoeléctrico (pI) de 4 a 8 y de peso molecular (PM) de 25 a 200. Se separaron 50  $\mu$ g de extractos nucleares de células MCF-7 obtenidos después de 20 min con los tratamientos indicados. **C:** control sin tratamiento; **TNF:** 10 ng/ml de TNF; **Dex:** con 10  $\mu$ M de dexametasona y **Dex/TNF:** células que recibieron simultáneamente ambos tratamientos. Los recuadros verdes corresponden a: NF- $\kappa$ B (p65) [5.5/60], receptor de glucocorticoides (GR) [6.0/86], Actina [5.0/43] y PCNA [4.5/32]. Los valores en corchetes corresponden a las coordenadas de [pI/PM]. Todas las manchas consideradas como proteínas en este análisis están encerradas en rojo o en verde. La diferencia entre estos dos colores es que las verdes están activadas para hacer algún análisis u observación y las rojas permanecen inactivadas. La flecha azul señala una proteína elegida por el valor de su volumen para separar dos poblaciones de proteínas: volumen menor a 10 077 y proteínas de volumen mayor a 10 077. (Imágenes que al ser amplificadas tantas veces pudieron perder su proporcionalidad con respecto a las imágenes reales).

Se observó una disminución general en la intensidad de las manchas en los geles de las células tratadas con Dex, TNF y DEX/TNF con respecto al gel control. La descripción detallada del análisis de las 8 manchas descritas se presenta mas adelante.

Como resultado del análisis y de la comparación de los geles maestros de cada tratamiento, se obtuvieron diferentes tipos de reportes del perfil de proteínas nucleares: reporte de la calibración del gel, reporte de cada una de las manchas obtenidas por gel, reporte estadístico del traslape de manchas detectadas, reporte del número de proteínas totales por gel, etc. En el reporte de cada una de las proteínas detectadas por el programa se obtuvieron diferentes valores como: **Mancha ID**: número de identificación de la proteína que asigna el programa; **X**: localización de la proteína en el eje X; **Y**: localización de la proteína en el eje Y; **pl**: punto isoeléctrico; **PM**: peso molecular; Intensidad: medida indirecta del numero de bytes en el píxel donde la señal es mayor; **Área**: número de píxeles que corresponden a la superficie de cada mancha; **Volumen**: valor absoluto del total de bytes en el área ocupada por la mancha, integral de todas las intensidades en el área analizada; **%Volumen**: volumen de una mancha con respecto al volumen de todas las manchas; **Saliencia**: medida de cómo sobresale una mancha de su entorno, las manchas con un valor de saliencia alto son proteínas etc. La tabla 1 muestra uno de los reportes obtenidos de 8 proteínas para cada tratamiento.

Tratamiento	Proteína	pl	PM	Área	Vol.
CONTROL	Actina	5.416	48846	11.9	320708
	p65	5.865	62075	2.85	12313.2
	GR	6.318	76869	1.02	4034.48
	PCNA	0	0	0	0
	1	4.968	92395	2.33	30312
	2	5.033	83731	1.79	7186.3
	3	6.739	50585	2.50	8567.27
	4	6.907	56254	3.59	32369.2
DEXAMETASONA	Actina	5.40	46073	12.6	366277
	p65	5.80	57394	2.1	7428
	GR	6.20	71313	1.1	1531
	PCNA	4.92	33785	4.2	8030
	1	4.97	88265	2.4	4584
	2	5.01	78268	2.0	24412
	3	6.65	46732	3.1	26925
	4	6.82	51623	4.7	35524

**Tabla 1. Reporte obtenido después del análisis de los geles aplicado a 8 proteínas seleccionadas:** Control; Dexametasona; TNF y ambos tratamientos Dex/TNF. **pl:** punto isoeléctrico; **PM:** peso molecular; **Área:** número de píxeles que corresponden a la superficie de cada mancha; **Vol:** valor absoluto del total de bytes en el área ocupada por la mancha, integral de todas las intensidades en el área analizada.

<b>TNF</b>	<b>Actina</b>	5.416	48846	11.9	320708
	<b>p65</b>	5.865	62075	2.85	12313.2
	<b>GR</b>	6.318	76869	1.02	4034.48
	<b>PCNA</b>	0	0	0	0
	<b>1</b>	4.968	92395	2.33	30312
	<b>2</b>	5.033	83731	1.79	7186.3
	<b>3</b>	6.739	50585	2.50	8567.27
	<b>4</b>	6.907	56254	3.59	32369.2
<b>DEX/TNF</b>	<b>Actina</b>	5.53	51768	13.2	212331
	<b>p65</b>	5.93	64020	1.4	6234
	<b>GR</b>	6.43	77475	1.6	3371
	<b>PCNA</b>	0	0	0	0
	<b>1</b>	5.06	97908	2.9	16904
	<b>2</b>	5.10	88102	3.0	16793
	<b>3</b>	6.72	52049	3.4	13424
	<b>4</b>	6.85	57920	4.8	31958

**Tabla 1.** Continuación

El reporte de gel mostró que el número de proteínas totales detectadas en cada uno de los tratamientos fueron: control 174, Dex 170, TNF 199 y DEX/TNF 181. El análisis visual nos permitió distinguir entre dos poblaciones de proteínas, una de mayor volumen y oscura y otra de menor volumen y tenue. De acuerdo al tratamiento recibido con respecto al control y con ayuda de los datos obtenidos a partir de los reportes, se cuantificó el número de manchas que pertenecen a estas

dos poblaciones. El límite del volumen entre estas dos poblaciones fue elegido arbitrariamente en el gel control, (el volumen de la proteína mas pequeña con mayor intensidad), volumen de 10.077 indicada con una flecha azul en la figura 10,  $pI = 7$ ,  $PM = 100.8$ , spot ID 115.

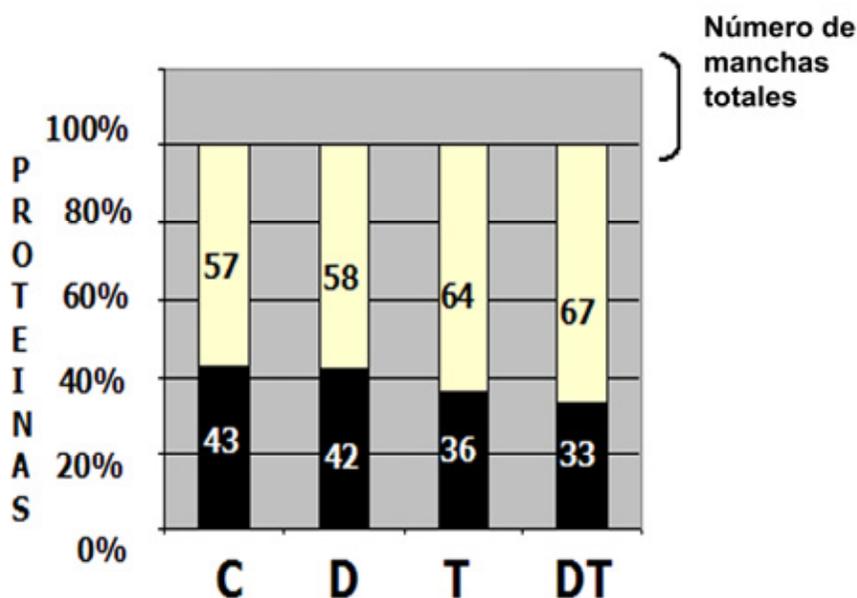
En la tabla 2 se muestra el porcentaje de las proteínas agrupadas bajo la condición descrita. La apreciación visual acerca de la disminución general en la intensidad de las manchas en los geles de las células tratadas con Dex, TNF y DEX/TNF con respecto al gel control, fue corroborada por medio de este análisis.

TRATAMIENTO	NUMERO DE PROTEINAS TOTALES POR TRATAMIENTO	NUMERO DE PROTEINAS CON MAYOR VOLUMEN	% PROTEINAS CON MAYOR VOLUMEN	NUMERO DE PROTEINAS CON MENOR VOLUMEN	% PROTEINAS CON MENOR VOLUMEN
CONTROL	174	74	43	100	57
DEXAMETASON A	170	98	52	72	48
TNF	199	71	36	128	64
DEX/TNF	181	60	33	121	67

**Tabla 2. Clasificación de las proteínas obtenidas de acuerdo a su volumen.** Reporte del número de manchas identificadas como posibles proteínas en cada gel: “proteínas con mayor volumen” (intervalo de volumen mayor a 10,077) y “proteínas con menor volumen” (intervalo de volumen menor a 10,077).

El histograma de la figura 11 muestra que en las células tratadas con dexametasona, el porcentaje de manchas negras disminuyó en un 2% con respecto al control, en las tratadas con TNF, la disminución fue de un 16% y en las tratadas con Dex / TNF el porcentaje de manchas negras disminuyó el 23%.

Estos % se obtuvieron tomando en cuenta como el 100% a las manchas oscuras o ténues del control y considerando a que porcentaje corresponde el de cada uno de los tratamientos con respecto al control.



**Figura 11. Distribución porcentual de proteínas de acuerdo a su volumen, descritas en la tabla 2. C:** control; **D:** dexametasona (10  $\mu$ M); **T:** TNF (10 ng/ml); **DT:** dexametasona (10  $\mu$ M) y TNF (10 ng/ml), tratadas durante 20 min. Valores graficados tomando como referencia un volumen de 10,077 para todos los tratamientos.

### III B. MANCHAS COMUNES Y COMPARACION DE TRATAMIENTOS

Para cuantificar los cambios obtenidos en el perfil de proteínas nucleares de acuerdo al tratamiento recibido, se comparó el control contra los tratamientos con Dex o con TNF o bien contra el doble tratamiento DEX/TNF (3). También, el doble tratamiento DEX/TNF se comparó contra Dex o TNF (2). El resultado de estas 5 comparaciones realizadas a través del programa se muestra en la tabla 3, donde

se listan las proteínas comunes (que están presentes en todos los tratamientos) en las condiciones comparadas. El número de manchas detectadas por gel fue variable, desde 170 hasta 199.

<b>Control vs</b>	<b>Número de proteínas control =174</b>	<b>Número de proteínas comunes</b>	<b>% de proteínas comunes</b>	<b>Número de proteínas del control <u>NO</u> comunes</b>
<b>DEX</b>	170	138	64	32
<b>TNF</b>	199	140	70	59
<b>DEX/TNF</b>	181	108	60	120
<b>DEX/TNF vs</b>	<b>Número de proteínas DEX/TNF=181</b>	<b>Número de proteínas comunes</b>	<b>% de proteínas comunes</b>	<b>Número de proteínas de DEX/TNF <u>NO</u> comunes</b>
<b>DEX</b>	170	84	52	86
<b>TNF</b>	199	129	78	138

**Tabla 3. Conjunto de proteínas que son comunes en todos los tratamientos.** Proteínas comunes al comparar el control contra los tres tratamientos (panel superior) y Dex/TNF contra Dex y TNF (panel inferior).

Cuando utilizamos al gel control como referencia el porcentaje de manchas comunes cambió dependiendo del tratamiento recibido. En TNF se obtuvo el menor número de manchas comunes (20%) y en DEX/TNF el mayor (60%), con respecto al control. Cuando hicimos la comparación de DEX/TNF contra Dex o contra TNF encontramos que el porcentaje del número de manchas comunes es alto. El menor número de proteínas detectadas por el programa está en Dex (170) y el mayor está en el TNF (199).

Es llamativo observar un gran número de proteínas que el programa considera como diferentes, al comparar controles contra dexametasona (primer renglón de la tabla 3), algo semejante se observa en las demás comparaciones. Al analizar la posición relativa de algunas de estas proteínas clasificadas como no comunes, encontramos que la mayoría de éstas sí son comunes, pero que si existen deformaciones en los geles entonces el programa erróneamente las podría catalogar como proteínas diferentes. Es por esto que gran parte del análisis debe hacerse y verificarse con ayuda del ojo humano para no caer en errores.

#### **VI. COMPARACION BIDIMENSIONAL DEL NF- $\kappa$ B (p65) CONTRA EMSA E INMUNOENSAYOS TIPO WESTERN BLOT**

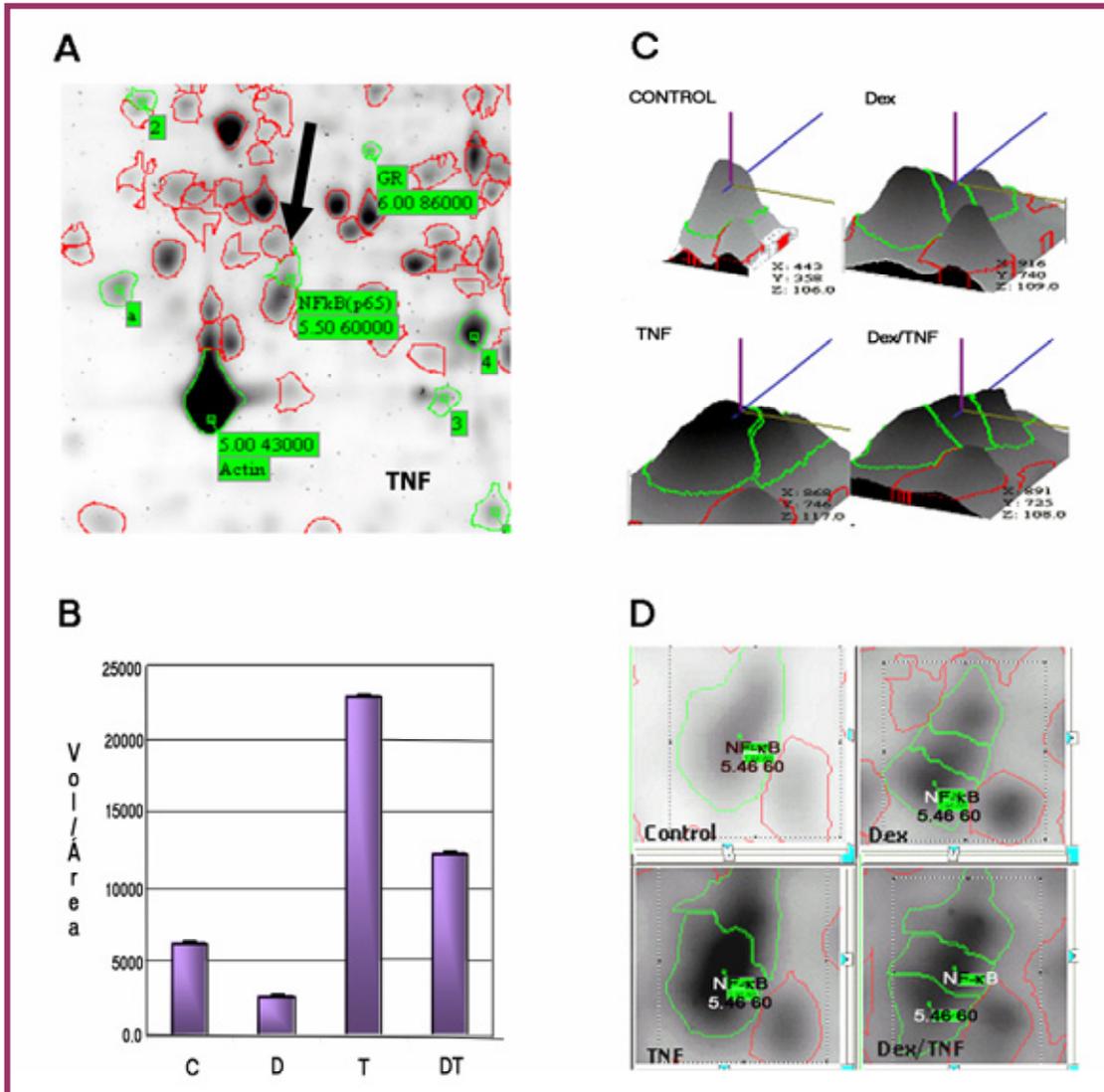
En la figura 12 A, se observa la imagen del análisis bidimensional de una mancha que de acuerdo al pI y PM (pI y PM = 5.46 60.0) reportado en las bases de datos (Espasy), podría corresponder a la subunidad p65 del NF- $\kappa$ B. De acuerdo a lo esperado, la figura 12 B muestra que el TNF indujo la translocación del NF- $\kappa$ B al núcleo. Con TNF la señal de la mancha correspondiente a p65 aumentó 3.7 veces con respecto al control y 9 veces con respecto al tratamiento con dexametasona, al combinar Dex y TNF, p65 aumentó el doble con respecto al control. Otra manera de examinar las variaciones de intensidad en el gel, es mediante la visualización de la imagen tridimensional (3D), (figura 12 C), de la región de interés en el gel. En tal vista tridimensional, el pI y el PM de la proteína están representados por los

ejes X y Y respectivamente (cabe mencionar que los ejes X y Y no son los valores de pl y PM de la proteína), mientras que la intensidad de la mancha en píxeles está representada en la tercera dimensión (eje Z). En la figura 12 D se observa la amplificación de la mancha que proponemos como p65, se observa que la intensidad de cada mancha en cada tratamiento es concordante con la altura de las barras del histograma (figura 13 B). En estas imágenes se observa que los contornos verdes de las manchas han aumentado de uno en el control, dos en TNF y tres en Dex y Dex/TNF. Consideramos que esas tres manchas corresponderían a tres isoformas de p65.

Con el propósito de corroborar la translocación del NF- $\kappa$ B al núcleo, hicimos un inmunoensayo tipo western blot (WB) en extractos citoplásmicos (para ver la expresión del I $\kappa$ B- $\alpha$ ) y un EMSA en extractos nucleares (para ver la translocación al núcleo de NF- $\kappa$ B). El WB reveló una banda de 35 KDa, correspondiente a I $\kappa$ B- $\alpha$  cuya degradación correlaciona con la translocación de NF- $\kappa$ B. Se observó que en células control y en células tratadas con dexametasona I $\kappa$ B- $\alpha$  no se degradó y permaneció en el citoplasma, probablemente unido a NF- $\kappa$ B, mientras que cuando fueron estimuladas con el TNF, el inhibidor se encontró en el citoplasma (figura 13 A).

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el EMSA para el NF- $\kappa$ B y su histograma (figuras 13 A y 13 C). En células tratadas con TNF con y sin dexametasona, se observó la formación de un complejo que aumentó 2.6 y 1.6 veces, respectivamente con respecto al control. Análisis previos de súper-retardo

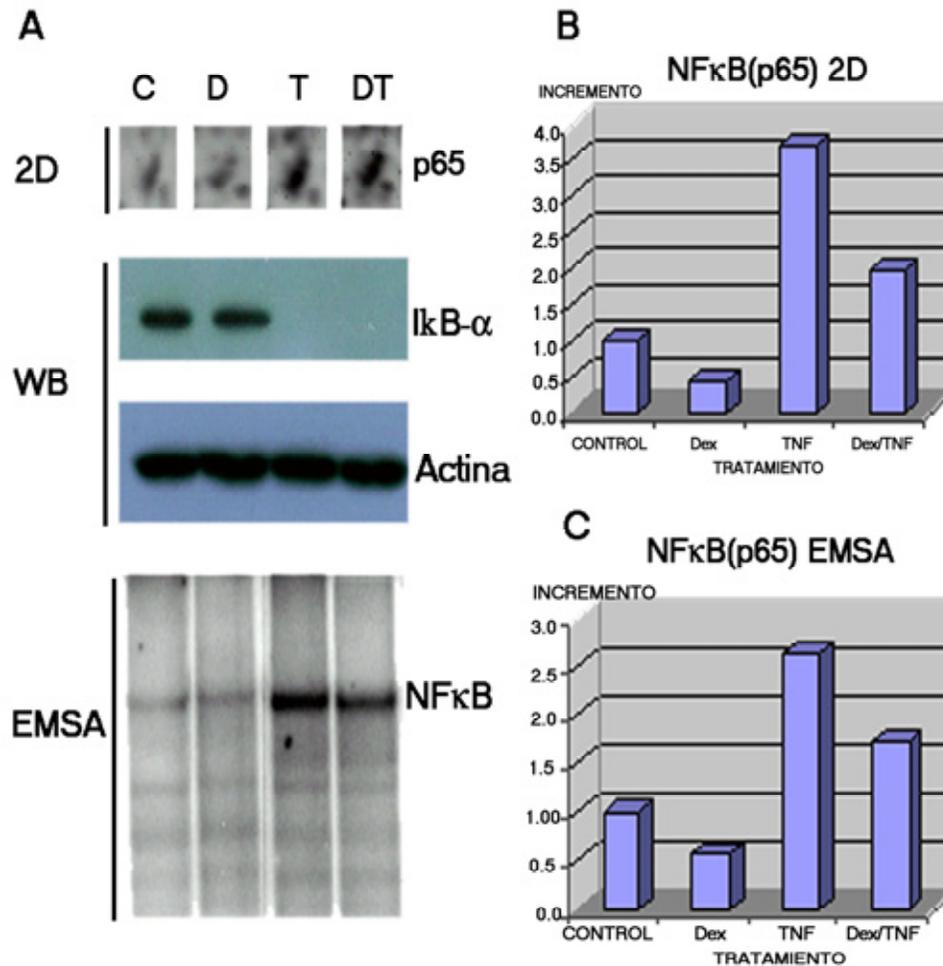
de NF- $\kappa$ B revelaron que el complejo que se forma en el EMSA contiene la subunidad p65 (Machuca C. 2006), La imagen bidimensional de la mancha que



**Figura 12. Expresión de la subunidad p65 del NF- $\kappa$ B.** A) Amplificación de la región del gel de las células tratadas con TNF. La flecha en A) indica la posición esperada para la subunidad p65 del NF- $\kappa$ B (pI: 5.46; PM: 60 KDa). B.) Histograma del índice volumen/área correspondiente a la región esperada de p65 normalizada con la relación volumen/área de actina del gel correspondiente. C) Imágenes tridimensionales de la mancha correspondiente a p65 en los cuatro tratamientos. D) Amplificación de la posición que corresponde a p65 en los diferentes tratamientos. Los contornos rojos (inactivados) y verdes (activados) en A, C y D representan el área de la mancha.

corresponde a p65 y su histograma (figuras 13 A y 13 B), mostró un aumento en el tratamiento con TNF de 3.7 veces y de 2 veces con Dex/TNF, respectivamente. Los histogramas muestran una muy buena correlación de la relación volumen/área obtenida con el análisis bidimensional y los cambios en la intensidad obtenidos en el EMSA.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el EMSA para el NF- $\kappa$ B y su histograma (figuras 13 A y 13 C). En células tratadas con TNF con y sin dexametasona, se observó la formación de un complejo que aumentó 2.6 y 1.6 veces, respectivamente con respecto al control. Análisis previos de súper-retardo de NF- $\kappa$ B revelaron que el complejo que se forma en el EMSA contiene la subunidad p65 (Machuca C. 2006), La imagen bidimensional de la mancha que corresponde a p65 y su histograma (figuras 13 A y 13 B), mostró un aumento en el tratamiento con TNF de 3.7 veces y de 2 veces con Dex/TNF, respectivamente. Los histogramas muestran una muy buena correlación de la relación volumen/área obtenida con el análisis bidimensional y los cambios en la intensidad obtenidos en el EMSA.



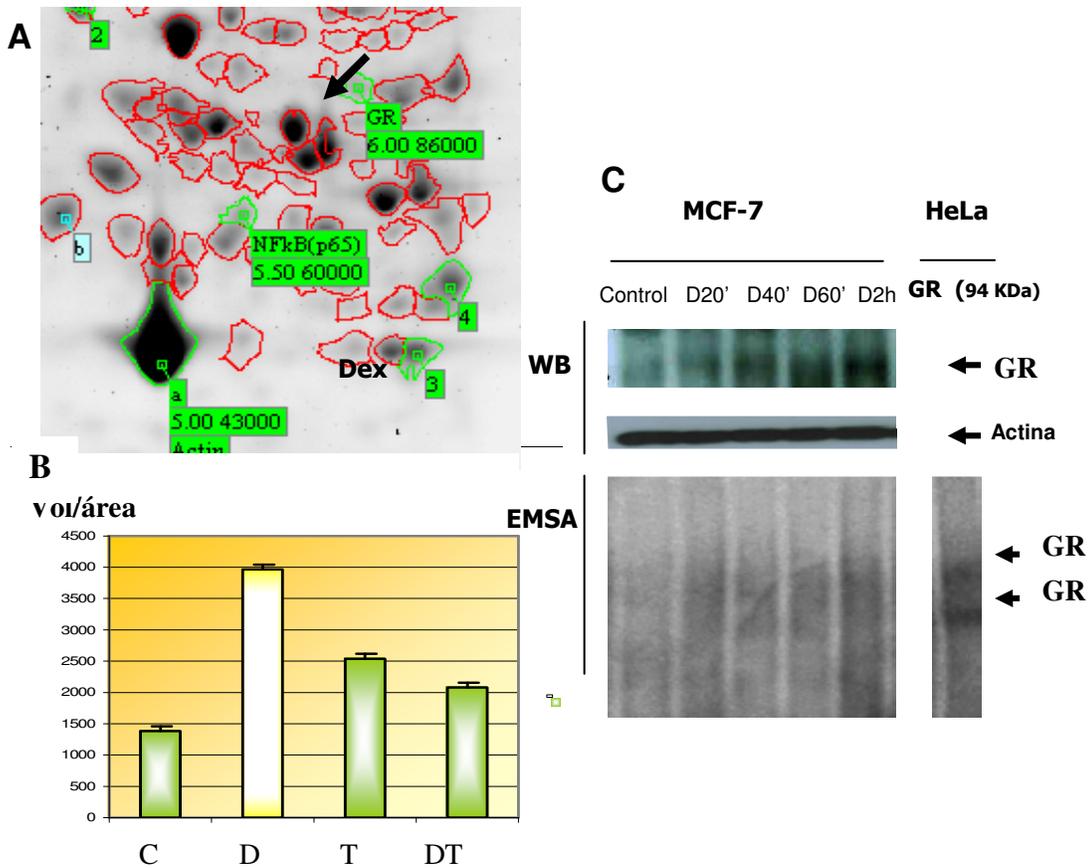
**Figura 13. Translocación de la subunidad p65 del NF-κB en el núcleo y del IκBα en el citoplasma.** A) Amplificación de la posición esperada para la subunidad p65 de NF-κB de acuerdo al tratamiento recibido (2D). Inmunoensayo tipo western blot de IκB-α en extractos citoplásmicos (WB). Inmunoensayo tipo western blot de actina como control de cargado para IκB-α. Imagen representativa de un ensayo de retardo de movilidad electroforética (EMSA) utilizando 20 μg de extractos nucleares de células estimuladas con su respectivo tratamiento durante 20 min. B) Histograma de la relación volumen/área correspondiente a la región esperada en 2D de p65 normalizada con el índice volumen/área de actina del gel correspondiente. C) Histograma de la señal correspondiente a NF-κB en extractos nucleares de células tratadas por 20 min, a partir de datos del EMSA en A. eje X = tratamiento, eje Y = veces de aumento en la intensidad de la banda.

---

#### **IV. COMPARACION BIDIMENSIONAL DEL RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES CONTRA EMSA E INMUNOENSAYO TIPO WESTERN BLOT**

En la figura 14 A se observa la imagen de una mancha que de acuerdo a su  $pI$  y  $pM$  ( $pI$  y  $pM = 6.0 - 85.7$ ), podría corresponder al GR (Receptor de Glucocorticoides). De acuerdo a lo esperado, la señal del posible GR aumentó 2.9 veces cuando se le da tratamiento con dexametasona (figura 14 B). En los demás tratamientos se mostró menor aumento, con respecto al control, el TNF aumentó 1.8 veces y con Dex/TNF aumentó 1.5 veces.

El inmunoensayo tipo western blot (WB) muestra una banda de 94 KDa (figura 14 C), muestra un incremento gradual en el contenido de GR desde los 20 min hasta las 2 h después del tratamiento con dexametasona. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el ensayo de retardo de la movilidad electroforética (EMSA) para GR (figura 14 C), en donde se muestra la formación de dos complejos que también aumentan de manera gradual. Como control positivo de la expresión del GR se utilizó la línea de cáncer cérvico uterino humano HeLa. El EMSA mostró la existencia de dos complejos correspondientes al GR.



**Figura 14. Expresión del Receptor de glucocorticoides.** **A)** Amplificación de la región del gel de las células tratadas con dexametasona (Dex). La flecha indica la posición esperada para el receptor de glucocorticoides (GR) (pI: 6.0; PM 86 KDa). **B)** Histograma de la relación volumen/área correspondiente a la región esperada del GR normalizada con la relación volumen/área de actina del gel correspondiente. **C)** Identificación del GR en extractos nucleares de células tratadas con dexametasona durante D20', D40', D60' min o por D2 h. El panel superior muestra un inmunoensayo tipo western blot (WB), con 20  $\mu$ g de extracto nuclear, el primer carril es el control. El panel intermedio muestra el inmunoensayo tipo western blot contra actina como control de cargado. El panel inferior muestra un ensayo de retardo de movilidad electroforética (EMSA) con 20  $\mu$ g de extractos nucleares. El carril de la derecha corresponde un ensayo de EMSA con extractos nucleares de células HeLa como control positivo para el GR.

### III. Análisis de proteínas seleccionadas

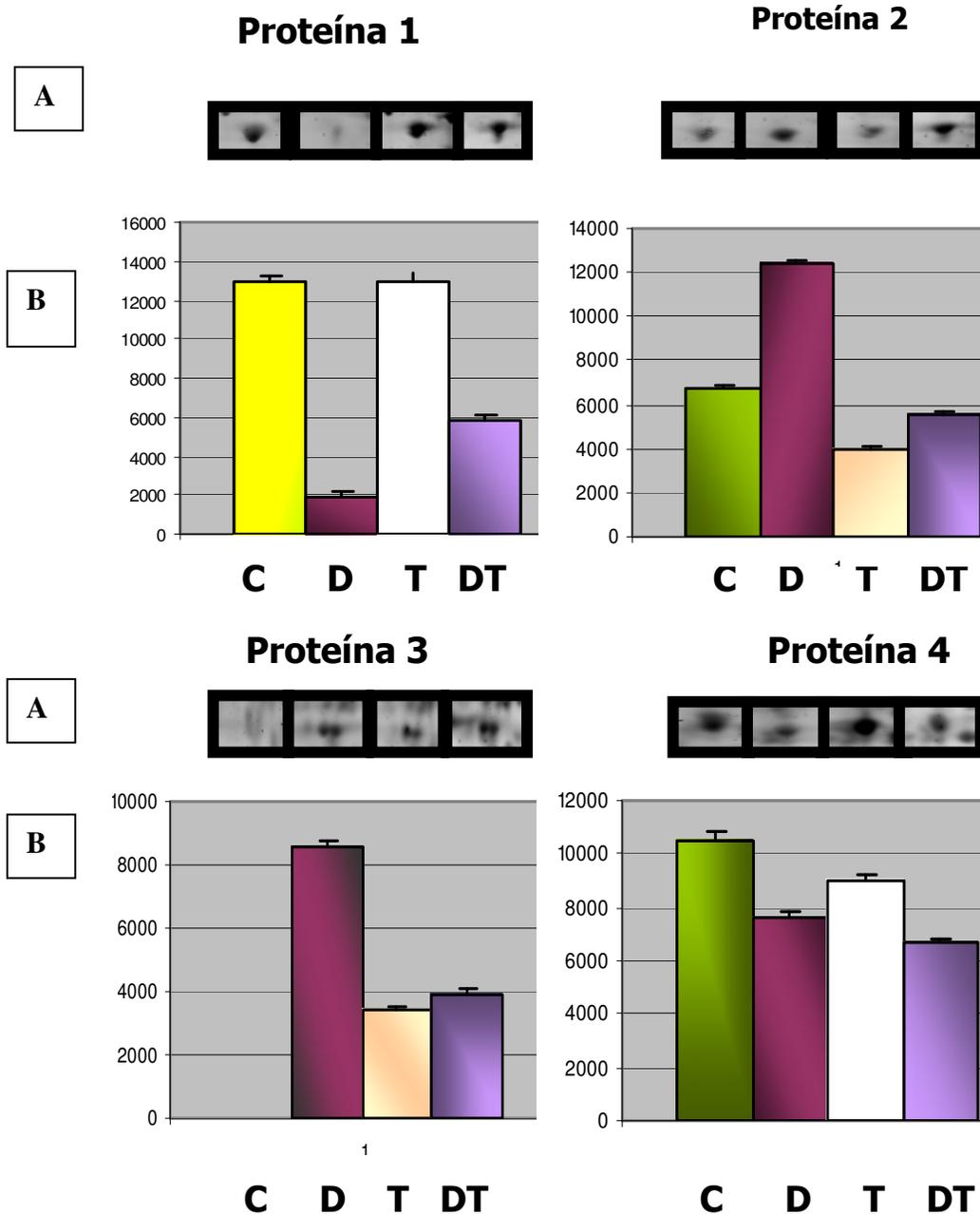
Con el fin de mostrar otros ejemplos de los cambios observados en el perfil de proteínas nucleares, elegimos un grupo de cuatro proteínas en las que se observaron cambios notables. Con los datos obtenidos a partir del análisis con el programa 2D Platinum obtuvimos el índice volumen / área.

Los cambios obtenidos de las 4 proteínas seleccionadas, se muestran las figuras 15 A y 15 B. En 15 A se observa la imagen bidimensional correspondiente a la proteína seleccionada. De acuerdo al tratamiento recibido se observa mayor o menor intensidad y tamaño. En 15 B se graficó el índice volumen / área de cada mancha y se muestra de cada una de las manchas manera cuantitativa el aumento o disminución de cada una de esta proteínas elegidas de acuerdo a cada tratamiento. En los histogramas 15 B se observa como la altura de cada barra generalmente corresponde a la intensidad que se observa en la imagen bidimensional de cada mancha en cada tratamiento.

La corrección del índice volumen/área no siempre resuelve esta discordancia como se observa en el tratamiento Dex/TNF de la misma proteína 4. El resto de los análisis se realizaron tomando en cuenta el índice volumen/área.

La figura 16 muestra los cambios obtenidos del análisis bidimensional cuando tomamos en cuenta el índice volumen/área de cada mancha de acuerdo al tratamiento recibido.

La proteína 1 mostró la mayor disminución (6.5 veces) ante el tratamiento con Dex y de 2 veces con Dex/TNF. La proteína 3, que no está presente en el control, ante el tratamiento con Dex, mostró el mayor aumento (9 veces). La proteína 4 mostró pequeños cambios que consideramos no significativos. Y la proteína 2 aumentó y disminuyó dependiendo el tratamiento.

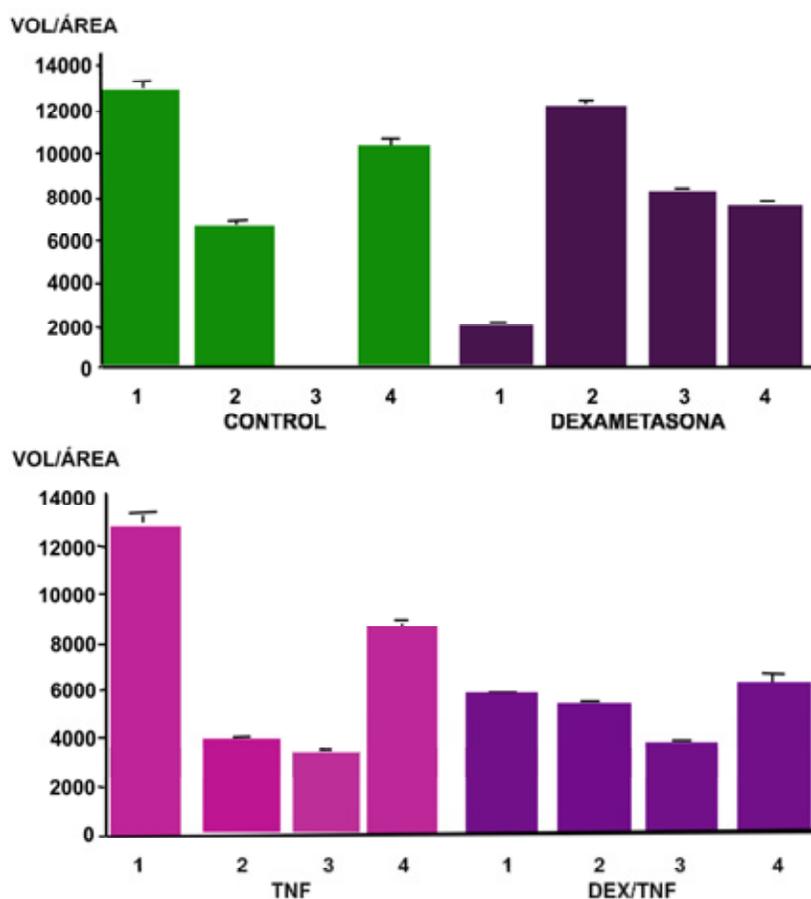


**Figura 15. Análisis de los cambios de expresión de las cuatro manchas seleccionadas en la figura 8 después de 20 min de tratamiento.** La parte superior A) de cada panel muestra la imagen representativa de cada una de las 4 proteínas después de la separación bidimensional. Los histogramas: B) superior y C) inferior muestran el análisis de volumen y de la relación volumen/área respectivamente para cada uno de los cuatro tratamientos. En todos los histogramas superiores B) cada mancha está normalizada contra el volumen de actina del mismo gel. En los histogramas inferiores C) la relación volumen/área de cada mancha está normalizada contra la relación volumen/área de actina del mismo gel.

**C:** control; **D:** dexametasona (10 µM); **T:** TNF (10 ng/ml); **DT:** dexametasona (10 µM) y TNF (10 ng/ml), tratamiento durante 20 min.

PROTEÍNA	DEX	TNF	DEX/TNF
1	∇ 6.50 ±0.90	No cambió	∇ 2.20 ±0.60
2	↗ 1.70 ±0.40	∇ 1.70 ±0.40	∇ 1.40 ±0.60
3	↗ 9.00 ±1.20	↗ 3.00 ±0.60	↗ 4.00 ±1.00
4	∇ 0.20 ±0.04	∇ 0.40 ±0.07	↗ 0.20 ±0.09

**Tabla 4. Disminución y/o aumento en el índice volumen/área de las proteínas 1, 2, 3 y 4 con respecto al control.** Número de veces del aumento (↗), la disminución (∇) del índice volumen/área de las proteínas. DS = desviación estándar, número de muestras n = 3.



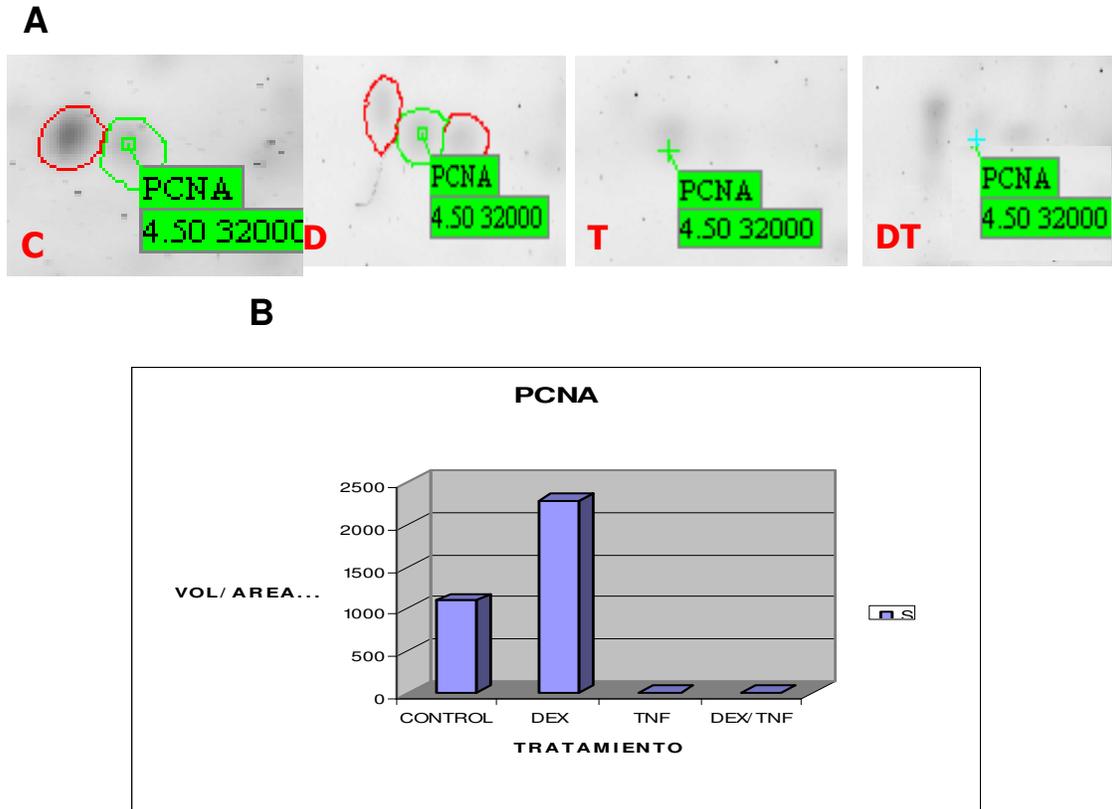
**Figura 16. Histogramas del índice volumen/área de cada tratamiento en la proteína 1, 2, 3 y 4.** En los cuatro histogramas se observa el comportamiento de las cuatro proteínas de acuerdo al tratamiento recibido.

## II. Análisis bidimensional de PCNA

El PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular,  $pI = 4.57$  y  $PM = 32$  KDa), es una proteína nuclear que se expresa durante la fase S del ciclo celular. Es un componente esencial para la replicación y reparación del ADN (Stanislav et al, 2003). Al trimerizarse forma el anillo que soporta a la ADN polimerasa y al complejo de duplicación. Su abundancia durante la fase S lo ha convertido en un marcador de proliferación celular (Malkas, 2006 and Schultz-Norton, 2007).

En la figura 17 se muestra el histograma de los resultados del índice volumen/área de la mancha que de acuerdo a sus coordenadas (Espasy) de  $pI$  y  $PM$ , corresponden al antígeno de proliferación celular PCNA. Se observa que en las células sin tratamiento y en las tratadas con Dex, se encuentra presente en el núcleo.

Con el tratamiento con Dex aumentó, pero cuando fueron tratadas con TNF o con Dex/TNF el programa de análisis ya no detectó la mancha y por eso no se ve encirculada en color verde. Dado que este cambio ocurre solo después de 20 min de tratamiento, puede proponerse que la disminución en la intensidad se deba a una disminución en la afinidad de PCNA por las estructuras nucleares.



**Figura 17. Expresión del Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA).**

**A)** Amplificación de la región de las imágenes 2D correspondientes a la posición esperada para el PCNA (pI 4.57, PM 32 KDa) para los cuatro tratamientos: C: células control; D: dexametasona, T: TNF y DT: dexametasona más TNF. El histograma **B)** representa los valores de índice volumen/área de la región esperada para PCNA de acuerdo al tratamiento recibido. Este valor está normalizado con el índice volumen/área de la actina del gel correspondiente. Los círculos verdes corresponden a la posible posición del PCNA, los círculos rojos corresponden a otras proteínas identificadas por el programa, los círculos y etiquetas verdes representan a PCNA

---

## DISCUSION DE LOS RESULTADOS

Las células MCF-7, clasificadas receptor de estrógenos positivo, han sido utilizadas en nuestro laboratorio, como un modelo *in Vitro* para estudios sobre el cáncer de mama (Machuca et al, 2006; Mendoza et al, 2005). Se ha mostrado que en estas células, existe un efecto apoptótico producido por el TNF y un efecto antiapoptótico mediado por dexametasona. Las citocinas llevan a cabo sus actividades biológicas a través de receptores específicos, cuyo patrón de expresión y afinidad por moléculas de señalización son distintos; así cuando los receptores se activan, la respuesta celular será el resultado de un equilibrio entre las vías encendidas. Un claro ejemplo de esto es el TNF que enciende simultáneamente una vía apoptótica a través de una cascada de caspasas y una vía anti-apoptótica a través de la activación del NF- $\kappa$ B (Hirano-Fukada, 2001). Aún cuando una citocina (TNF) o un receptor (GR), puede activar las mismas vías de transducción, cada célula puede responder a la estimulación de manera diferente, dependiendo de su activación previa por otros moduladores ya sea por la diferencia en los niveles de expresión o por un estado de activación inducido por otras moléculas que pudieran afectar la vía de una manera negativa o positiva (Estrada, 2003)

Con estos antecedentes lo que mostramos con nuestro trabajo fue el cambio producido por estos efectos en el perfil de proteínas nucleares, que ocurrió en tan sólo 20 min después del tratamiento aplicado. Sabemos que existe una ventana de tiempo dentro de la cual las células MCF-7 presentan características de muerte

cuando son tratadas con TNF, y existe daño al ADN (Ventura; 2006), lo que provoca cambios en la estructura celular y así, cambios en su morfología. Estos cambios morfológicos ocurren entre lapsos de 48 y 96 h y son posteriores a la modificación del perfil de proteínas nucleares, pues los factores de transcripción se translocan desde los primeros 20 min de activación, (NF- $\kappa$ B y el GR).

### **Cambios morfológicos y muerte celular**

Los cambios en la morfología de las células MCF-7 tratadas con TNF, mostraron una reestructuración del citoesqueleto de actina y la existencia de daño celular asociado a la muerte (Alberts, 2004). Cuando el tratamiento con TNF se prolongó hasta las 96 h las células se observaron muy dañadas, ya no se observaron figuras mitóticas, debido a una combinación entre la inhibición por contacto, los efectos antiproliferativos del TNF y la falta de nutrientes, lo que indicó que el daño producido por TNF encendió una vía apoptótica irreversible (Ventura, 2006; Gómez, 2004).

Mientras que el estímulo con Dex sólo produjo leves cambios en la morfología que no representaron daño celular, no hay presencia de espículas, hay menos figuras mitóticas que indican una menor proliferación. Ya se sabía que la Dex y el TNF detienen la proliferación celular (Gómez 2004; Anderson, 1999). La interferencia de la Dex en la proliferación en células MCF-7 ha sido ampliamente reportada, aunque el efecto antiproliferativo de glucocorticoides sintéticos o naturales, está relacionado a la protección contra la citotoxicidad de TNF (Webster, 1990 y Hundertmark, 1997). Las células tratadas con ambos tratamientos Dex/TNF

---

mostraron una protección real por Dex, ya que no presentaron alteraciones en la morfología que sugirieran muerte celular. La sobrevivencia celular, determinada mediante cursos de viabilidad con la tinción de cristal violeta, mostró una gran tasa de muerte en la que solo una mínima población de células sobrevivió ante el efecto apoptótico del TNF mientras que el tratamiento con Dex / TNF y Dex con respecto a las células control no mostró cambios cualitativos aparentes en la viabilidad, lo que confirmó la protección antiapoptótica conferida por Dex tiene un efecto protector de casi el 100%.

### **Obtención de Perfiles Nucleares Bidimensionales**

El efecto protector antiapoptótico que confiere la dexametasona activa una cascada de señalización en la que se activa el receptor de glucocorticoides y requiere de la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B. La translocación de ambos factores de transcripción al núcleo es necesaria para estimular la transcripción de genes de sobrevivencia como IAPs y BCl<sub>2</sub> etc.

El análisis bidimensional dio como resultado un grupo seleccionado de proteínas básicas principalmente que se encontraban unidas al núcleo mediante uniones electrostáticas, por lo que esperábamos una representación de proteínas en rangos de pI mayores a 7.0. A pesar de esto, se obtuvo una buena representación de proteínas con pI de 4 a 8.0, con pesos moleculares de 40 a 150 KDa. Se observó que el mayor número de las 200 proteínas obtenidas están representadas por manchas tenues y pequeñas. Considerando que el receptor de glucocorticoides y la subunidad p65 del factor de transcripción NF- $\kappa$ B caen dentro

de esta región, es muy probable que otras subunidades de distintos factores de transcripción también se encuentren ahí. Es importante considerar que esta información se generó a partir de pequeñas cantidades de proteínas de extractos nucleares (50  $\mu$ g) derivadas de  $1.5 \times 10^6$  de células que se resolvieron en minigeles de (7X8 cm y 1.5 mm de grosor). Esto nos da una pauta para continuar utilizando esta herramienta práctica y útil para analizar bajo estas condiciones, a otras subunidades de factores de transcripción.

Con tan solo 20 min de estímulo con Dex y/o TNF hubo un cambio en el perfil de proteínas nucleares, el cual se manifiesta en el contenido relativo de proteínas que observamos. Tal vez no se deba a la degradación de proteínas, ni síntesis *de novo*, sino solo una redistribución de proteínas que se encontraban en otro compartimento celular y que ante el estímulo recibido se translocaron al núcleo, o proteínas que se encontraban en el núcleo y que ante el estímulo salieron de él.

Es interesante observar que existe un grupo de proteínas muy ácidas que se encuentra alineado en el área de pI 10. Las de bajo peso molecular y alto punto isoeléctrico podrían ser histonas (pI = 11, PM = 6-30 KDa) (Shechter D., et al, 2007). Cabe mencionar que estas proteínas convencionalmente, no se separan por punto isoeléctrico, de hecho, los geles bidimensionales empleados para visualizar histonas, emplean otra metodología con urea ácida y tritón (TAU) (Hake S. B. et al, 2006). Las manchas obtenidas entre 50 y 200 KDa en la banda de pI 10, podrían corresponder a otras proteínas estructurales. Una mínima cantidad de manchas se obtuvieron en la zona de pI = 8 a 9, podría ser que en este rango de pI no se detecten proteínas debido a un defecto físico en la tira de pI inmovilizado

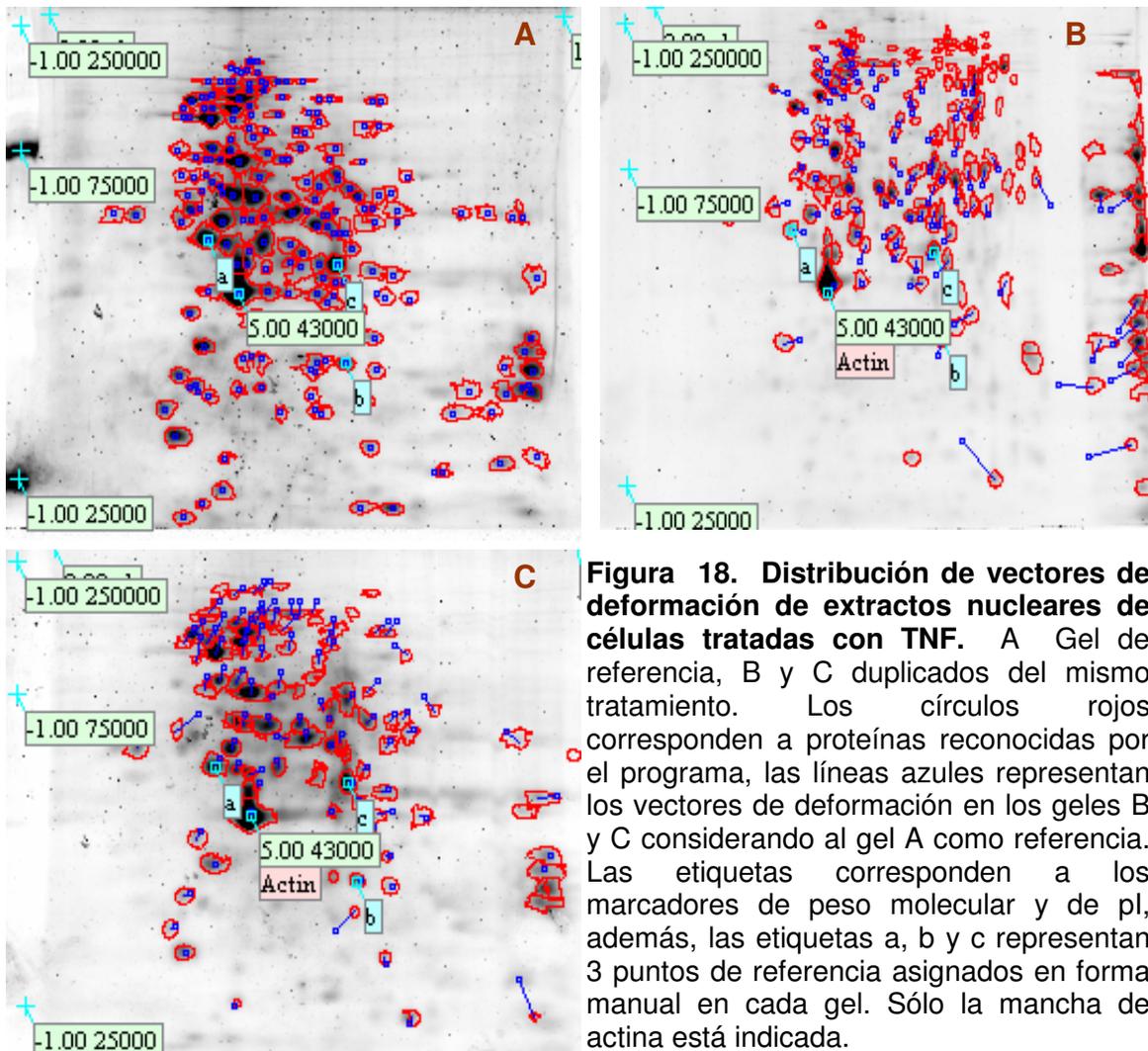
---

porque sean muy pocas las proteínas nucleares que se podrían separar dentro de este pequeño rango de pI.

### **Análisis de los Patrones Bidimensionales de Proteínas Nucleares Asociados a la Protección por Dexametasona.**

El análisis de tres geles calibrados en pI y peso molecular por cada tratamiento, generó un gel maestro con el que se pudo determinar el número de manchas, sus coordenadas y diferencias en intensidad. Una limitante de las herramientas básicas del programa es que no corrige las deformaciones de los geles, debidas a las diferencias físicas de cada gel, la manipulación de los geles y variaciones en el enfoque debida a pequeñas irregularidades en la manufactura de las tiras. Esto provocó que en algunos casos el traslape de manchas de los geles realizados por triplicado no fuera reproducible, a pesar de haber seguido las recomendaciones de la empresa que lo vende. Para documentar la severidad de estas deformaciones e irregularidades se muestra la figura 18. En los 3 geles se observan las manchas en circuladas en rojo; en los geles B y C cada mancha tiene además en azul su centro y su vector de deformación. Si estos vectores tienen la misma dirección, aunque no tengan la misma longitud, teóricamente la deformación podría ser compensada automáticamente. A) corresponde al gel de referencia, debido a eso, no presenta vectores de deformación. Estos mapas revelan que las irregularidades están distribuidas en forma heterogénea, mientras que la vecindad de la subunidad p65 del NF- $\kappa$ B presenta muy pocas deformaciones (pI 5.50, 60 000), la vecindad del GR (pI 6.00, 86000), presenta deformaciones con vectores en direcciones

opuestas, dificultando la identificación automática de las manchas. Las deformaciones más grandes se presentan en las orillas de los gels, ya que esta zona se encuentra alejada de las manchas a, b, c (figura 18), que fueron elegidas como referencias para la calibración del gel, por estar bien definidas y por localizarse en todos los gels. Para lograr obtener resultados reproducibles en toda el área del gel se recomienda hacer la calibración por pequeñas zonas de interés.



---

Sin el análisis por espectrometría de masas, desconocemos que proteínas están presentes en los extractos nucleares analizados, por tratarse de extractos nucleares suponemos que deben estar presentes proteínas estructurales de la cromatina, proteínas asociadas a la transcripción y al procesamiento de RNAs, así como proteínas de la maquinaria de remodelación de la cromatina y factores de transcripción. Asumimos que las proteínas estructurales así como la maquinaria de transcripción deben estar en mayor abundancia que los factores de transcripción y la maquinaria de remodelación con la que interactúa. Con esta idea en mente decidimos clasificar dos subpoblaciones de las manchas obtenidas (tabla 2): i) Las que se ven a simple vista por su tamaño e intensidad (manchas negras con un volumen mayor a 10,000) y ii) las pequeñas y de menor intensidad (manchas grises con volumen menor de 10,000). Llama la atención que hubo cambios significativos en las manchas de estas dos poblaciones en tan solo 20 min de tratamiento, que probablemente resultan más de cambios en la distribución nuclear y citoplásmica que a cambios en la síntesis de novo y degradación de proteínas.

Las manchas negras disminuyeron en todos los tratamientos: con respecto al control Dex disminuyó el 2 %, TNF el 16 % y Dex/TNF el 23 %. Por el contrario, la población de manchas grises aumentó: con respecto al control el tratamiento con Dex aumentó el 2%, TNF 12% y Dex/TNF 18%. Consideramos que el incremento del 18% de la población de manchas grises obtenido en el tratamiento con Dex/TNF, se debe a la movilización de los factores de transcripción ante el estímulo del doble tratamiento, que generalmente se encuentran en pequeñas concentraciones. Para eliminar errores de cargado de proteína todos los análisis

de cada gel fueron normalizados contra la actina de su propio gel, de esta forma todos los resultados fueron comparables.

### **Número total de manchas**

El número total de manchas en los geles de todos los tratamientos varió entre 174 y 199 manchas (tabla 2). Esta variación probablemente se debió a los límites de detección que le asignamos al programa para diferenciar entre una mancha y un artefacto. Pudo deberse a la variación en el índice volumen / área de cada una de las manchas obtenidas después del tratamiento recibido. Sí el valor de estos parámetros resultó ser tan pequeño que la mancha quedó excluida de los límites de detección de manchas significativas, entonces el número de manchas totales disminuyó en el gel. Además de esas diferencias hay cambios en la transcripción, entrada y salida de proteínas al núcleo.

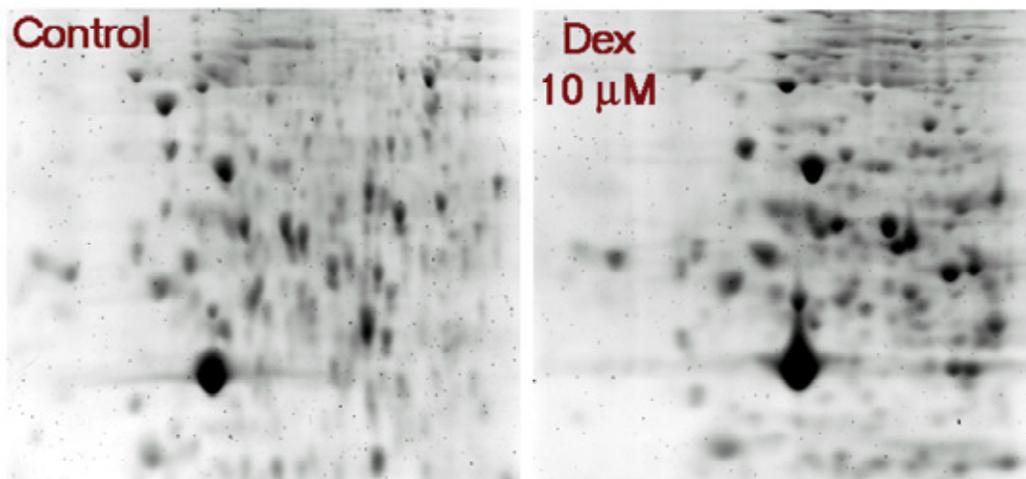
Es importante mencionar que trabajamos con el sistema bidimensional de tiras de pl inmobilizado mas pequeño que existe a la fecha (7 cm), pero que para nuestros fines prácticos es de gran utilidad, ya que es este sistema realizamos rápidos y prácticos ensayos en los que se pueden hacer las pruebas necesarias para llegar a un resultado importante. Mas adelante pretendemos escalar a tiras de mayor tamaño y de pl mas reducido, en donde podremos identificar con mayor resolución proteínas de nuestro interés y llevarlas hasta su identificación total por espectrometría de masas.

**Manchas comunes y comparación de tratamientos**

Existen diferentes causas por las que la separación de proteínas en un geles puede resultar diferente. Algunas causas son: variaciones en la consistencia durante la gelificación del gel, variaciones en el voltaje y en la velocidad del corrimiento de la segunda dimensión, variabilidad en la colocación de la tira ya enfocada sobre el gel para la segunda dimensión, correr la segunda dimensión en diferentes cámaras de electroforesis etc. A pesar de contar un un gel maestro para cada tratamiento, al hacer el traslape de los geles para obtener las diferencias en la expresión de proteínas, el programa no diferenció entre las proteínas comunes de las no comunes. Consideró como diferentes, proteínas que no lo eran. La tabla 3 muestra el número de proteínas que son comunes en los distintos tratamientos. Esta tabla se hizo con ayuda del ojo humano.

Al comparar el control y Dex / TNF contra los demás tratamientos, se observa que el tratamiento con TNF es el que muestra una mayor número de proteínas comunes. Lo que nos indica que el perfil de proteínas se modifica más con TNF, menos con Dex/TNF y mucho menos con Dex.

Ya que el TNF estimula en células tumorales, vías de sobrevivencia y muerte, probablemente estimula la translocación de proteínas del citoplasma al núcleo y del núcleo al citoplasma, en cambio cuando estimulamos al mismo tiempo con ambos tratamientos, TNF / DEX, es probable que la dexametasona no permita que la translocación de proteínas sea de la misma magnitud que cuando sólo se estimuló con TNF y por eso los cambios son menores.



**Figura 19. Análisis visual. Una comparación entre Control y Dexametasona.**

Las imágenes muestran regiones parciales de los geles obtenidos de la separación bidimensional (por punto isoeléctrico y peso molecular) de 50  $\mu\text{g}$  de extractos nucleares de células MCF-7 después de 20 min del tratamiento indicado.

Los resultados del análisis tomando como referencia el tratamiento de DEX/TNF contra lo Dex y TNF, mostraron que el 19% y el 26% respectivamente son proteínas no comunes.

Para obtener mayor reproducibilidad en los geles, será necesario elegir más puntos de referencia al calibrar el gel y si es necesario, trazar pequeñas regiones para hacer el análisis de las proteínas de nuestro interés.

### **Comparación Bidimensional de la Subunidad p65 de NF- $\kappa$ B Contra EMSA e Inmunoensayos Tipo Western-Blot.**

Se sabe que existe una vía clásica de activación del NF- $\kappa$ B, que involucra a la cinasa IKK y a los inhibidores I $\kappa$ B. Se han reportado además algunas vías alternas para dicha activación. El TNF activa al NF- $\kappa$ B a través de la vía clásica y lo hace mediante la fosforilación del inhibidor I $\kappa$ B $\alpha$  por su cinasa IKK $\beta$  (Perkins, 2006;

Karin-Lin, 2002). Al determinar en los geles bidimensionales, los cambios en el perfil de proteínas nucleares por la activación del NF- $\kappa$ B durante los diferentes tratamientos en el análisis bidimensional, localizamos una proteína que por sus coordenadas de pI y PM (Espasy), podría corresponder a la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B. Después del análisis se observó que ante el tratamiento con TNF y Dex/TNF, la translocación de esta subunidad p65 aumentó de 4 y 2 veces respectivamente. El análisis tridimensional de esta proteína mostró cambios en la intensidad de la mancha y en el índice volumen/área de acuerdo al tratamiento recibido. En el tratamiento con TNF y con Dex / TNF el programa detectó dos y tres manchas respectivamente, en vez de solo una, observada en el control. Esto indicó que la expresión de esta proteína se incrementó debido al tratamiento con TNF.

Por otro lado para identificar al NF- $\kappa$ B de manera indirecta, localizamos a su inhibidor I $\kappa$ B- $\alpha$  en el citoplasma, mediante inmunoensayos tipo western blot. Los resultados muestran que la translocación del NF- $\kappa$ B al núcleo se llevó a cabo cuando las células fueron tratadas con TNF y con Dex/TNF (ausencia de I $\kappa$ B $\alpha$  en el citoplasma). En cambio las células control y las tratadas con Dex no mostraron activación del NF- $\kappa$ B, lo cual indicó que el NF- $\kappa$ B estaba unido a su inhibidor I $\kappa$ B $\alpha$  en el citoplasma.

La translocación del NF- $\kappa$ B al núcleo, también se corroboró mediante ensayos de retardo (EMSA), durante la estimulación con TNF y con Dex/TNF se mostró la presencia de NF- $\kappa$ B en el núcleo dentro de los primeros 20 min. Se obtuvo una menor translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo con Dex/TNF que con TNF, ésto indicó

---

que la protección de la Dex por razones desconocidas impidió la activación del NF- $\kappa$ B, evitando su translocación al núcleo (Machuca, 2006).

Los resultados mostraron que en ambos ensayos (2D y EMSA) p65 tuvo la misma tendencia en su comportamiento, a pesar que los principios de cada método son diferentes. En el EMSA se detectaron los complejos proteína-ADN que se formaron cuando se incubó extractos nucleares de células estimuladas con una sonda marcada con fósforo radiactivo. La electroforesis bidimensional mostró que la proteína que detectamos se encuentra en el núcleo, como factor de transcripción activado. El proceso para la obtención de núcleos no interfirió con las interacciones proteína-ADN de nuestro interés.

Algunas veces la separación bidimensional de algunas proteínas se vio alterada en su pI y PM y esto provocó que una proteína no se encontrara en las coordenadas esperadas.

Las modificaciones postraduccionales (PMT) en la estructura de las proteínas, juegan un papel muy importante en la actividad reguladora de las proteínas. La identificación del tipo de modificación (glicosilación, fosforilación, ácido ciálico, acetilación, etc.) y su localización proveen de una gran información para entender la función y regulación de una proteína en una vía de señalización en un proceso celular (Krishna RG, 1993 and Heng Zhu, 2003). Se han descrito más de 200 de estas modificaciones postraduccionales y métodos para su identificación (Griffin TJ, 2001).

En nuestro caso, estas modificaciones postraduccionales son importantes ya que tanto el PM como el pI de la proteína se vio afectado por estas modificaciones.

Las glicosilaciones pueden variar el PM, la adición de ácido ciálico adiciona carga negativa y puede variar el pI, mientras que las fosforilaciones le adicionan carga negativa y varían ambos el PM y el pI de la proteína. Nosotros pensamos que la modificación postraduccionaL mas común para NF- $\kappa$ B sería la fosforilación ya que para la activación de una vía de transducción las fosforilaciones juegan un papel muy importante (Perkins, 2006).

En la figura 12 C y 12 D, observamos que la proteína que elegimos como la subunidad p65 del NF- $\kappa$ B, está formada por tres manchas juntas. Se sabe que para la activación de NF- $\kappa$ B se necesita de la fosforilación de proteínas. Los sitios potenciales de fosforilación para la subunidad p65 están en 22 SER, en 6 THR y en 5 TYR (NetPhos) dentro de su secuencia de 550 aminoácidos, lo que produjo cambios en el peso molecular y variación en el pI de la subunidad p65. El aumento a tres manchas de p65 en los tratamientos con Dex y Dex /TNF pudo deberse a las modificaciones postraduccionales de esta proteína después de su activación.

Hemos podido validar el análisis bidimensional con este factor de transcripción ya muy estudiado por nuestro grupo de trabajo. El análisis bidimensional de la mancha que elegimos como NF- $\kappa$ B muestra que el índice volumen / área tiene el mismo comportamiento que cuando al NF- $\kappa$ B lo analizamos mediante el EMSA.

---

### **Comparación Bidimensional del Receptor de Glucocorticoides en Ensayos EMSA e Inmunoensayos Tipo WESTERN-BLOT.**

Un hallazgo importante fue el hecho de que la activación del GR (2 h) en células MCF-7 fue diferente a la activación del NF- $\kappa$ B (en solo 20 min). El estímulo GR fue en aumento con el tiempo a los 20 min fue menor y a las 2 h fue mayor.

El probable GR también fue localizado en los geles bidimensionales mediante coordenadas de pI y PM (Expasy). Analizamos su comportamiento bidimensional de acuerdo al índice área/volumen obtenido de la mancha y se observó un aumento significativo de casi tres veces en el tratamiento con Dex. Los tratamientos con TNF y Dex/TNF mostraron resultados poco congruentes pues esperábamos mayor aumento en el tratamiento con Dex/TNF que con TNF. El pico de máxima activación de GR no lo obtuvimos a los 20 min, tales resultados pudimos observarlos en el EMSA y en el inmunoensayo tipo Western blot en donde se observó que el GR aumentó de acuerdo a como aumentó el tratamiento con Dex. Se observó mayor expresión de GR a las 2 h que a los 20 min.

Estudios hechos para determinar al GR por medio de EMSAS (Garlatti, et al,1994) muestran que el EMSA no es de los mejores ensayos para su identificación. Aún en las células HeLa, a pesar de ser consideradas como un control positivo para GR, no se obtiene claramente su identificación como lo muestra un EMSA para el NF- $\kappa$ B.

### **Análisis de Cuatro Proteínas Seleccionadas**

El análisis de dos poblaciones de proteínas, las de mayor y menor volumen e intensidad, nos permitió mostrar en el mayor de los casos que las proteínas de mayor intensidad son proteínas constitutivas de la célula, como la actina, el PCNA, la CDK2, etc, que se encuentran en mayor concentración. La población de menor intensidad puede corresponder a factores de transcripción que se están reacomodando en el núcleo, que entran y salen de él y que se encuentran en muy bajas concentraciones tan solo por lapsos pequeños, pero que con estas pequeñas concentraciones son capaces de encender o apagar la transcripción de genes (Estrada, 2003).

La selección de cuatro proteínas representativas de los cambios más aparentes, sirvieron para mostrar como la expresión de proteínas lleva consigo la activación o represión de otras proteínas que están implicadas en la respuesta celular.

### **Análisis Bidimensional de PCNA**

Al preparar los extractos nucleares y romper el núcleo mediante una solución amortiguadora hipotónica, posteriormente mediante las cargas positivas y negativas de una solución amortiguadora hipertónica se despegaron solo las proteínas que se encontraban unidas débilmente a estructuras nucleares. La cromatina, las láminas nucleares, las histonas, etc que se encontraban unidas fuertemente, se quedaron unidas a las estructuras nucleares y no las vimos durante la separación bidimensional (Alberts, 2002).

Los cambios que observamos en el núcleo fueron de las proteínas que con alta fuerza iónica pudimos despegar del núcleo. Las que se encontraban unidas

---

débilmente seguramente se dializaron durante la preparación de los extractos nucleares y no se pudieron observar. Mediante coordenadas de bases de datos (Espasy) localizamos una proteína que corresponde al PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular).

Se ha detectado una sobre-expresión de PCNA en células tumorales MCF-7 que en células normales no se detecta, lo que refleja un estado de proliferación en células de cáncer de mama (Vercoutter-Edouart et al, 2001).

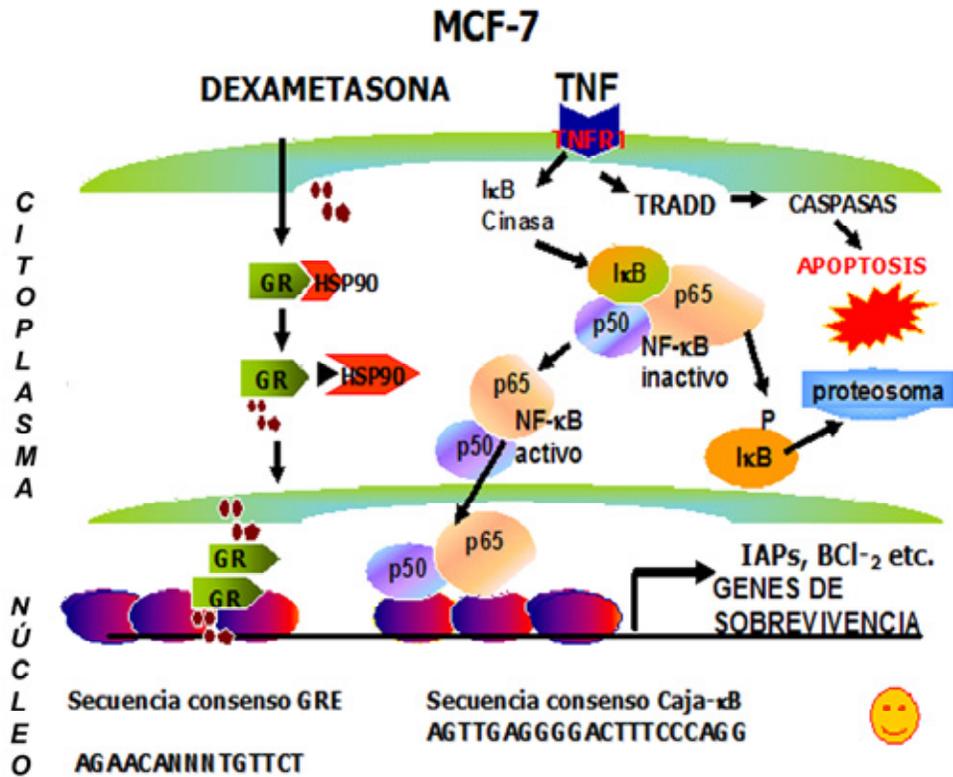
Nuestros resultados sólo mostraron un aumento en la expresión de PCNA de dos veces, durante el tratamiento con Dex con respecto al control, y con TNF o con Dex/TNF, el PCNA disminuyó de tal forma que ya no se detectó como proteína. Dado que este cambio ocurrió solo después de 20 min de tratamiento, no pudimos observar un efecto en la proliferación en este lapso, podemos proponer que la disminución en la intensidad se debió a una disminución en la afinidad de esta proteína por las estructuras nucleares, provocada posiblemente por el TNF en ambos tratamientos.

La elección de proteínas de peso molecular y punto isoeléctrico conocido mediante bases de datos, fue útil para la ubicación de proteínas nuevas y desconocidas. Aunque es muy importante tomar en cuenta que para una certera identificación de proteínas existen otros métodos que van desde el uso de anticuerpos hasta la espectrometría de masas y sus diferentes combinaciones en tandem y otras técnicas como HPLC (cromatografía líquida de alta presión) etc, (Mas, 2007; Somiari, 2005).

## CONCLUSIONES

- El mecanismo por el cual la dexametasona protege de la muerte inducida por el TNF se asocia a cambios en el perfil de proteínas nucleares, estos cambios incluyen a la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B y al receptor de glucocorticoides.
  
- El efecto apoptótico del TNF en células MCF-7 y el efecto anti-apoptótico por dexametasona produjeron cambios en el perfil de proteínas nucleares, en tan sólo 20 min de tratamiento.
  
- El análisis bidimensional de la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B y la comparación con otras técnicas (EMSA e inmunoensayo tipo western blot), permitieron la validación del método de análisis bidimensional de pequeñas cantidades de proteínas nucleares (50  $\mu$ g) analizadas en minigeles de 7 x 8 cm y 1.5 mm de espesor.
  
- Mediante el análisis digital y con la información de bases de datos de pI y PM, se localizaron algunas proteínas constitutivas del núcleo que sirvieron como referencia para la localización de nuestros factores de transcripción en estudio.

- Utilizando el análisis bidimensional, se analizaron algunas de las proteínas del perfil de proteínas que cambió y se cuantificaron estas diferencias. La variación en la expresión de las proteínas esta en función del tratamiento recibido.
  
- El análisis bidimensional de proteínas nucleares, nos permitió observar un universo de proteínas que cambió de acuerdo al tratamiento recibido. Mientras que el EMSA y el inmunoensayo tipo western blot solo permite la detección de unas cuantas proteínas mediante la utilización de secuencias blanco o mediante la utilización de anticuerpos específicos.
  
- La activación del receptor de glucocorticoides es diferente a la activación del NF- $\kappa$ B. Mediante ensayos de EMSA se corroboró que mientras que NF- $\kappa$ B se transloca al núcleo con un máximo a los 20 min; el GR comienza desde los 20 min y en mayor cantidad cuando se estimuló por 2 h con dexametasona.



**Figura 20. Señalización activada por TNF y Dexametasona en células MCF-7.** El TNF activa dos vías de señalización, una de muerte por apoptosis a través de la vía de las caspasas. Otra de sobrevivencia a través de la activación en el citoplasma del NF-κB y la degradación de su inhibidor IκBα, lo que permite la translocación al núcleo del NF-κB activo (subunidades p50/p65), la unión a su sitio consenso en la caja κB en el ADN y con esto, la transcripción de genes de sobrevivencia. Por otra parte la Dexametasona confiere un efecto anti-apoptótico mediante la activación de su receptor de glucocorticoides (GR), al unirse a la Dex, GR se activa, se transloca al núcleo y dimerizado se une a su sitio consenso GRE en el ADN para la transcripción de genes de sobrevivencia

---

**BIBLIOGRAFÍA**

- **Aggarwal** BB. (2004). Nuclear factor- $\kappa$ B: The enemy within. *Cancer Cell* 6:203-208.
- **Alberts** B, Jonson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (2002). *Molecular biology of the cell*. 4<sup>a</sup> ed. Ediciones Garland, Nueva York.
- **Almawi** WY, Melemedjian OK. (2002). Molecular mechanisms of glucocorticoid antiproliferative effects: antagonism of transcription factor activity by glucocorticoid receptor. *J Leukoc Biol* 71: 9-15.
- **Almawi** WY, Melemedjian OK. (2002) Negative regulation of NF- $\kappa$ B activation and function by glucocorticoids. *J. Mol. Endocrinol.* 28: 69-78.
- **Antwrep** DJV, Martin Sj, Kafri T green DR, Verma I. (1996). Suppression of TNF induced apoptosis by NF- $\kappa$ B: *Science* 274: 787-789.
- **Anderson** B., Watson D. and Colditz I. (1999). The effect of dexamethasone on some immunological parameters in cattle. *Vet Res Commun* 23:339-413.
- **Ausubel** M., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, G., Smith, A., Struhl, K. (2002). *Short protocols in molecular biology*. Vol. 2. Edit. Wiley. 1-29.
- **Bailly-Maitre** B, de Sousa G, Zucchini N, Gugenheim J, Boulukos KE and Rahmani R. (2002). Spontaneous apoptosis in primary cultures in human and rat hepatocytes: molecular mechanisms and regulation by dexamethasone. *Cell Death Differ* 9: 945-955.
- **Beg** AA and Baltimore D. (1996). An essential role of NF- $\kappa$ B in preventing TNF induced cell death. *Science* 274: 782-784.
- **Bowie** AG, Zhan J. y Marshall WL. (2004). Viral appropriation of apoptotic and NF-kappa B signaling pathways. *J Cell Biochem* 91: 1099-1108.
- **Cashio** P, Lee TV. y Bergman A. (2005). Genetic control of programmed cell death. *Seminars in Cell and Dev Biol* 16: 225-235.

- 
- **Chambers** AF, Groom AC, MacDonald IC. (2002). Dissemination and Growth of Cancer Cells in Metastatic Sites. *Nature* 2: 563-572.
  - **Chen** F, Castranova V, Shi X. (2001). New insights into the role of Nuclear Factor- $\kappa$ B in cell growth regulation. *Am J Pathol* 159: 387- 397.
  - **Collingwood** TN, Urnov FD, Wolffe AP. (1999). Nuclear receptors: coactivators, corepressors and chromatin remodeling in the control of transcription. *Journal of Molecular Endocrinology* 23: 255-275.
  - **Daniel** NN. y Korsmeyer SJ. (2004). Cell Death: Critical Control Points. *Cell* 116: 205-219.
  - **Distelhorst** CW. (2002). Recent insights into the mechanisms of glucocorticosteroid-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 9: 6-19.
  - **Dumitrescu** RG and Cotarla I. (2005). Understanding breast cancer risk-where do we stand in 2005? *J Cell Mol Med* 9: 208-221.
  - **Estrada** BA. (2003). Activación dependiente de NF- $\kappa$ B de células endoteliales humanas tratadas con productos solubles derivados de linfomas humanos. Tesis doctoral, UNAM, 133 pp.
  - **Falfán** VR. (2002). Factor de Necrosis Tumoral: actividad biológica en neuropatías intersticiales. *Rev Ins Nal Enf Resp Mex* 15: 48-53.
  - **Fidler** IJ. (1990). Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eighth G.H.A. Clowes memorial award lecture. *Cancer Res.* 50: 6130-6138.
  - **Garlatti** Michelle, Daheshia Massoud, Slater Emily, Bouguet Jaqueline, Hanoune Jacques, Beato Miguel and Borouki Robert. (1994). A Functional Glucocorticoid-Responsive Unit Composed Of Two Overlapping Inactive Receptor-Binding Sites. Evidence for Formation of a Receptor Tetramer. *Molecular and Cellular Biology* 14: 8007-8017.
  - **Giannetti** L, Consolo U, Magnoni C y Muzio L. (2004). Apoptosis: Escaping strategies in human skin cancer. *Oncol Rep* Feb 11: 401-405.
  - **Goldsby** RA, Kindt TJ, Osborne BA, Kuby J. (2004). *Inmunología* 5ª ed. McGraw Hill Interamericana. México D. F., 357-379.
  - **Gómez** E. (2004). Correlación entre el estrés oxidativo inducido por el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y sus efectos citostático y citotóxico en células L929. Tesis doctoral, UNAM, 128pp.

- **Greenstein S**, Ghias K, Krett NL and Rosend ST. (2002). Mechanisms of glucocorticoid-mediated apoptosis in hematologic malignances. *Clin Cancer Res* 8: 1681-1694.
- **Griffin TJ**, Aebersold, R. (2001). *J Biol Chem* 276: 45497-45500.
- **Hake**, S.B. (2006). Expression patterns and post-translational modifications associated with mammalian histone H variants. *J Biol Chem* 281: 559-568.
- **Harper N**, Farrow SN, Kaptein A, Cohen GM. and Macfarlane Marion. (2001). Modulation of Tumor Necrosis Factor Apoptosis Inducing Ligand-induced NF- $\kappa$ B Activation by Inhibition of Apical Caspases. *J Biol Chem* 276: 34743-34752.
- **Harri Jr.**, Mc Lippman, Veronesi U., Willet W. (1992). Breast cancer N England *J Med* 327: 319-328.
- **Heng Z**, Metin B. and Snyder M. (2003). *Proteomics Annu Rev Biochem* 72: 283-812.
- **Hirano T**, Fukada T. (2001). IL-6 Ligand and receptor family in cytokine reference. A compendium of cytokines and other mediators of host defense. Oppenheim J. J. Feldman M. Eds. Academic Press U.S.A. 523-535.
- **INEGI**. Base de datos de defunciones INEGI/Secretaría de Salud. (2006). Dirección General de Información en Salud.
- **Informe Nacional de Salud** de la SEED/DGE, Secretaria de Salud. (2001).
- **Jemal A.**, Siegel R., Ward E., Murray T., Xu J., Smigal C. and Thun MJ. (2006). Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin* 56: 106-130.
- **Karin M**, Lin A. (2002). NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol*, 3:221-227.
- **Kornbluth S** y White K. (2005). Apoptosis in *Drosophila*: neither fish nor fowl (nor man, nor worm). *J Cell Sci*. 118:1779-87.
- **Krishna RG**, Wold F. (1993). *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 67: 265-298.

- 
- **Lewin Benjamin** (2000). Genes VII. Oxford University Press.
  
  - **Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser M., Scott M.P., Zipursky S.L., and Darnell S. (2004) Molecular Cell Biology. Freeman and Company. New York, USA.**
  
  - **Loeb KR. y Loeb LA. (2000).** Significance of Multiple Mutations in Cancer. *Carcinogenesis* 21: 379-385.
  
  - **Lomas D., Chamba A. and Stockley R. (1991).** The effect of in vitro and in vivo dexamethasone on human neutrophil function. *Agent Actions* 33: 279-285.
  
  - **López BLN, Zentella DA, Reyes TG. (2004).** Molecular Mechanisms involved in pathogenesis of septic shock. *Arch Med Re* 35: 465-479.
  
  - **Lu H, Ouyang W, Huang C. (2006).** Inflammation, a Key Event in Cancer Development. *Mol Cancer Res* 4: 221-233.
  
  - **Machuca C., Mendoza-Milla C., Córdova E., Mejía S., Covarrubias L., Ventura J. and Zentella A. (2006).** Dexamethasone protection from TNF-alpha-induced cell death in MCF-7 cells requires NF-kappa B and is independent from AKT. *BMC Cell Biology* 7:9.
  
  - **Malkas LH, Herbert BS, Abdel-Aziz W, Dobrolecki LE, Liu y, Agarwal B, Hoelz D, Badve S, Schnaper L, Arnold RJ, Mechref Y, Novotny MV, Loherer P, Goulet RJ, and Hickey RJ. (2006).** A cancer-associated PCNA expressed in breast cancer has implications as a potential biomarker. *PNAS* 103: 19472-19477.
  
  - **Mas OJ. (2007).** Diagnóstico Molecular en Medicina. 2ª edición. El Manual Moderno, México.
  
  - **Mendoza- Milla C, Machuca RC, Córdova AE, Estrada BA, Toledo-Cuevas EM, Martínez ME and Zentella ZD. (2005).** NF-κB activation but not PI3K/Akt is required for dexamethasone dependent protection against TNF-α toxicity in L929 cells. *FEBS Letters* 579:3947-3952.
  
  - **Messmer UK., Pereda-Fernández C., Manderscheid M. and Pfeillschifter J. (2001).** Dexamethasone Inhibits TNF-induced Apoptosis and IAP Protein Downregulation in MCF-7 Cells. *British Journal of Pharmacology* 133: 467-476.

- 
- **Métivier R**, Reid G, Gannon F. (2006). Transcription in four dimensions: nuclear receptor-directed initiation of gene expression. *European Molecular Biology Organization* 7: 161-167.
  
  - **Moran TJ.**, Gray S., Milkos CA. and Conzen SD. (2000). The glucocorticoid receptor mediates a survival signal in human mammary epithelial cells. *Cancer Res* 60: 867-872.
  
  - **O' Farrell D.** (1975). High Resolution Two Dimensional Electrophoresis of Proteins. *J Biol Chem* 250:4007-4021.
  
  - **O' Farrell P. Z.** and Goodman, H.M. (1976). Resolution of simian virus 40 proteins in whole cell extracts by two-dimensional electrophoresis: heterogeneity of the  
● major capsid protein. *Cell* 9: 289-298.
  
  - **Pagliacci MC**, Fumi G, Migliorati G, Grignani F, Riccardi C and Nicoletti I. (1993). Cytostatic and cytotoxic effects of tumor necrosis factor alpha on MCF-7 human breast tumor cells are differently inhibited by glucocorticoid hormones. *Lymphokine Citokine Res* 12: 439-447.
  
  - **Parkin DM**, Bray FI, Devesa SS. (2001). Cancer burden in a year 2000. The Global Picture. *Eur J Cancer* 37 suppl 8: S4-S66.
  
  - **Pepin M-C** and Barden N. (1991). Decreased glucocorticoid receptor activity following glucocorticoid receptor antisense RNA gene fragment transfection. *Molecular and Cellular Biology* 1647-1653.
  
  - **Perkins ND.** (2000). The Rel/NF-kappa B family: friends and foe. *Trends Biochem Sci* 25: 434 - 440.
  
  - **Perkins ND** and Gilmore TD. (2006). Good cop, bad cop: the different faces of NF-kB *Cell Death and differentiation* 13: 759-772.
  
  - **Rochette-Egly C.** (2005). Dynamic combinatorial networks in nuclear receptor-mediated transcription. *The Journal of Biological Chemistry* 280: 32565-32568.
  
  - **Ruoslahti E.** (1996). How Cancer Spreads. *Scientific American* 72-77.
  
  - **Sasson R.**, Shinder V., Dantes A. and Amsterdam A. (2003). Activation of multiple signal transduction pathways by glucocorticoids: protection of ovarian follicular cells against apoptosis. *BBRC* 311: 1047-1053.

- 
- **Schafer** Z. y Kornbluth S. (2006). The Apoptosome: Physiological, Developmental, and Pathological Modes of Regulation. *Developmental Cell* 10: 549-561.
  
  - **Schultz-Norton** J. R. and Gabisi B. A. (2007). Interaction of estrogen receptor  $\alpha$  with proliferating cell nuclear antigen. *Nucleic Acids Research* 35: 5028-5038.
  
  - **Shechter** David, Dorrman Holger L., Allis David c. Hake Sandra B. (2007). Extraction, purification and analysis of histones. *Nature protocols* 2: 1445-1457.
  
  - **Sheinman** Robert I., Gualberto Antonio, M. Jewell Christine, Cidlowski John A. and Baldwin Albert S., Jr. (1995). Characterization of mechanisms involved in Transrepression of NF- $\kappa$ B by activated glucocorticoid receptors. *Molecular and Cellular Biology* 943-953.
  
  - **Somiari** R.I., Somiari, S., Russell, S. and Shriver, C.D. (2005). Proteomics of breast carcinoma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 815, 215-225.
  
  - **Soule** HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan MA. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 57:1409-1413.
  
  - **Stanislav** NN, Hoyun L. (2003). Observation of multiple isoforms and specific proteolysis patterns of proliferating cell nuclear antigen in the context of cell cycle compartments and sample preparations. *Proteomics* 3: 930-936.
  
  - **Van Horsen** R, Ten Hagen TML, Eggermont AMM. (2006). TNF- $\alpha$  in Cancer Treatment: Molecular Insights, Antitumor Effects, and Clinical Utility. *Oncologist* 11: 397-408.
  
  - **Ventura** GJL. (2006). La inhibición de la proliferación asociada a estrés oxidativo y el daño al ADN antecede a la muerte celular mediada por el factor de necrosis tumoral alfa. Tesis maestría, UNAM, 110 pp.
  
  - **Vercoutter-Edouart** AN, Czeszak X, Crépin M, Lemoine J, Boilly B, Le Bourhis X, Peyrat JP and Hondermarck H. (2001). Proteomic detection of changes in protean synthesis induced by fibroblast growth factor-2 in MCF-7 human breast cancer cells. *Experimental Cell Research* 262: 59-68.

- **Viatour** P., Merville MP., Bours V. and Cahriot A. (2005). Phosphorylation of NF-kappa B and I-kappa B proteins implications in cancer and inflammation. Trends Biochem Sci 30: 43-52.
  
- **Vidal** C. (2003). Protocolo de cáncer de mama. Departamento de Oncología Servicio de Ginecología Oncológica. Hospital J. R. Vidal Corrientes.
  
- **Weiss** L. (2000). Some Cell Interactions. Cancer Metast Rev 19: 235-255.
  
- **Yamamoto** Y. and Gaynor RB. (2004). I-kappa B kinases: key regulators of the NF-kappa B pathway. Trends Biochem Sci 29: 72-79.
  
- **Yan** N. y Shi Y. (2005). Mechanisms of apoptosis through structural biology. Annu Rev Cell Dev Biol 21: 35- 56.
  
- **Yokota** J. (2000). Tumor Progression and metastasis. Carcinogenesis 21: 497-503.
  
- **Yoshimura** A. (2006). Signal transduction of inflammatory cytokines and tumor development. Cancer Sci 97: 439-447.
  
  
- Citas electrónicas
  
- [http://www.expasy.org/cgi-bin/pi\\_tool](http://www.expasy.org/cgi-bin/pi_tool).
  
- **Jiménez Ruiz Rodrigo. Cáncer demama.**
  
- <http://www.percano.com.mx/prescripciónmédica/2001/mayo/cáncer-mama.htrn>.
  
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=5689767>.