



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUIMICA

IDENTIFICACIÓN DE POSIBLES BIOMARCADORES  
EN CÁNCER DE MAMA MEDIANTE ANÁLISIS PROTEOMICO

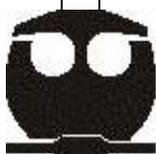
**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**QUÍMICO**

**PRESENTA:**

**ÁNGEL ALFONSO ALVARADO NUÑO**



MÉXICO. D. F.

2008



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesora: María Eugenia Torres Márquez

**VOCAL:** Profesor: Rogelio Rodríguez Sotres

**SECRETARIO:** Profesora: Nora Andrea Gutierrez Nájera

**1er. SUPLENTE:** Profesor: Luis Tonatihut Sanchez Linares

**2° SUPLENTE:** Profesora: Perla Deyanira Maldonado Jimenez

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:** Instituto Nacional de Medicina Genómica, periférico sur número 4124 Torre Zafiro 2, piso 6, Col. ExRancho de Anzaldo Delegación Alvaro Obregón México D.F.

**ASESOR DEL TEMA:** Dra. Nora Andrea Gutierrez Nájera

*Nora A. Gutierrez Nájera*

**SUSTENTANTE:** Angel Alfonso Alvarado Nuño



## **Reconocimientos**

A la doctora Nora Gutiérrez: Por su ayuda y comprensión durante todo el trabajo y trámites.

Al doctor Rogelio Rodríguez y a la doctora Ma. Eugenia Torres, por sus aportaciones para mejorar este trabajo.

A Hilda Ramos, Karla Calderón, José Luís Gallegos, Juan Pablo Reyes, Lyssia Castellanos, y todo el laboratorio de proteómica del INMEGEN:  
Por sus enseñanzas y apoyo a lo largo del trabajo experimental de la tesis.

## **Agradecimientos**

A mis padres y mi hermana:

Leticia Nuño Licon, José Alfonso Alvarado Hernandez y Sandra Gabriela Alvarado Nuño. Son mi familia más cercana gracias por su apoyo en el pasado ahora y siempre debido a ese apoyo es que ahora logro esto. Los quiero mucho a los tres.

A Thalía Huanosta Gutiérrez por haberme querido y por haberme dado una oportunidad única, siempre estarás en mi mente, eres una persona maravillosa.

A Carlos Velázquez Launizar por tu amistad apoyo y tiempo en todo tipo de momentos.

A Xavier Vertiz (cáncer) e Hilda Ramos por su amistad y apoyo.

A todos los amigos de la facultad por su amistad.

# Í N D I C E

<b>ABREVIATURAS</b>	8
<b>INTRODUCCIÓN</b>	
Planteamiento del problema.	9
<b>MARCO TEÓRICO</b>	
I. Antecedentes históricos del cáncer de mama.	10
II. Epidemiología del cáncer de seno.	12
III. Morfología del seno.	16
IV. Factores de riesgo:	
IV.1 La dieta.	18
IV.2 La edad.	18
IV.3 El factor genético.	19
IV.4 Factores demográficos.	20
IV.5 Factores menstruales.	20
IV.6 Tabaquismo.	21
IV.7 Radiaciones.	21
IV.8 Otros agentes cancerígenos.	21
V. Oncogénesis.	22
VI. Historia natural del cáncer de mama.	23
VII. Características morfológicas del cáncer de mama:	24
VII.1 Carcinoma ductal in situ.	28
VII.2 Carcinoma lobular in situ.	31
VII.3 Carcinoma invasivo.	33
VII.4 Carcinoma lobular invasivo.	35
VIII. Diagnóstico de cáncer de mama:	36
VIII.1 Mastografía.	36
VIII.2 Ultrasonido o sonografía.	37
VIII.3 Tomografía computarizada del seno (CT).	37
VIII.4 Resonancia nuclear magnética (RMN).	37
VIII.5 Escintigrafía.	38

VIII.6 Biopsia.	38
VIII.7 Evaluación de síntomas clínicos comunes.	38
IX. Factores pronóstico en cáncer de mama.	39
X. Tratamiento del cáncer de mama.	40
XI. Sistemas modelo para el estudio del cáncer de mama.	45
XII. La proteómica en el estudio de cáncer de mama.	47
Objetivo general.	51
Objetivos específicos.	51
Hipótesis.	51

## **DISEÑO EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍA**

I. Material biológico.	53
II. Ruptura celular.	55
III. Obtención de un extracto de proteínas:	57
III.1 Limpieza.	57
III.2 Obtención de un extracto de proteínas de microsomas y soluble de células.	58
IV. Cuantificación de la proteína.	58
V. Isoelectroenfoque.	60
VI. Preparación para la electroforesis en segunda dimensión.	64
VII. Electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE)	65
VIII. Tinción de los geles con azul de commassie y plata.	66
IX. Marcaje de proteínas por el método de electroforesis diferencial en gel (DIGE).	68
X. Obtención de imágenes y análisis de geles teñidos con tinción de azul de commassie.	71
XI. Obtención de imágenes y análisis de geles de proteínas marcadas con método DIGE.	71
XII. Picado y digestión de las manchas de proteínas seleccionadas de los geles.	71
XIII. Análisis por espectrometría de masas.	72

## ABREVIATURAS

MCF7: Línea de células humanas cancerosas de tejido de mama.

BRCA1: Abreviatura en inglés (breast cancer1) gen o proteína proveniente del gen de cáncer de seno1.

BRCA2: Abreviatura en inglés (breast cancer2) gen o proteína proveniente del gen de cáncer de seno 2.

p53: Gen o proteína proveniente del gen p53, la proteína codificada es de 53KDa, de ahí su nombre.

PTEN: Abreviatura en inglés (phosphatase and tensin homolog) homólogo de fosfatasa y tensina, gen o proteína proveniente de dicho gen.

CDIS: Carcinoma ductal in situ.

CLIS: Carcinoma lobular in situ.

CDI: Carcinoma ductal invasivo.

CLI: Carcinoma lobular invasivo.

HER-2: Abreviatura en inglés (human epidermal growth factor receptor 2) factor de crecimiento epidérmico humano receptor 2, gen o proteína proveniente de dicho gen.

RNM: Resonancia nuclear magnética.

TEP: Tomografía de electrón positrón.

RE: Receptor de estrógenos.

ATM: Abreviatura en inglés (ataxia telangiectasia mutated) gen mutado de ataxia telangiectasia.

FCE: Factor de crecimiento epidérmico.

Hs578t: Línea de células humanas cancerosas de tejido de mama.

Hs578Bst: Línea de células humanas sanas de tejido de mama.

PBS: Abreviatura en inglés (phosphate buffer saline) amortiguador salino de fosfatos.

CHAPS: Detergente zwitteriónico

DTT: Ditioneitol.

Amortiguador IPG: Amortiguador para permitir el mejor enfoque de las proteínas en primera y segunda dimensión (anfólitos).

ASB: Albúmina de suero de bovino.

IEF: Isoelectroenfoque.

SDS Abreviatura en ingles (sodium dodecyl sulfate) dodecil sulfato de sodio.

SDS-PAGE: Abreviatura en ingles (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio.

PSA: Persulfato de amonio.

TEMED: Abreviatura en ingles (tetramethylenediamine) tetrametiletildiamina.

2D: Segunda dimensión.

DIGE: Abreviatura en ingles (differential in gel electrophoresis) electroforesis fluorescente en gel diferencial.

DMF: Dietilformamida.

C33-A: Línea de células humanas cancerosas de tejido de la cerviz.

pI: Punto isoeléctrico.

## **INTRODUCCIÓN.**

### **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:**

La información acerca de proteínas potencialmente interesantes ha venido del análisis de expresión de genes donde los genes de interés fueron investigados para conocer su real traducción en proteínas. Esta aproximación permitió la identificación de un número de proteínas que ahora sirven como parámetros de pronóstico o como marcadores biológicos para enfermedad maligna. Sin embargo, no todos los genes son traducidos en proteínas y las alteraciones en la expresión de genes no necesariamente se reflejan en cambios en los niveles de proteínas<sup>21</sup>. Más allá, alteraciones estructurales, formación de complejos, enzimas proteolíticas, proteínas de unión y muchos otros mecanismos de regulación postraduccionales pueden modificar en gran medida la actividad y disponibilidad

de una proteína más allá del mero control de su expresión génica<sup>22</sup>. Nuevas tecnologías como electroforesis en dos dimensiones y espectrometría de masas ahora ofrecen una oportunidad de evaluar alteraciones del proteoma, previamente no detectadas en cáncer de mama<sup>23</sup>.

Se han realizado algunos estudios que involucran alteraciones en el proteoma en cáncer de mama que han demostrado que en líneas celulares de cáncer de mama como la MCF-7 se expresan varios genes cuyos productos codifican para proteínas membranales<sup>24</sup>. Más del 50% de las drogas usadas para tratamiento contra el cáncer son dirigidas contra proteínas membranales. En algunos estudios se han encontrado al menos 15 proteínas cuyos cambios en sus niveles las postulan como importantes en la resistencia al tratamiento con drogas de ciertos tipos de cáncer<sup>25</sup>. Las proteínas membranales son difíciles de estudiar debido a su hidrofobicidad lo cual las hace incompatibles con condiciones de enriquecimiento, fraccionamiento o digestión enzimática usadas regularmente en los métodos de purificación e identificación de proteínas. Sin embargo, se han abordado diferentes técnicas para superar este problema<sup>26</sup>.

## **MARCO TEÓRICO**

### **I. ANTECEDENTES HISTÓRICOS DEL CÁNCER DE MAMA.**

El seno humano, la glándula mamaria humana es un órgano cutáneo que produce una sustancia lechosa vital para el recién nacido. En el siglo XVIII, el seno se convirtió en base para la taxonomía. El médico sueco Carlous Linnaeus (1707-1778) acuñó el termino *mamíferos* para distinguir a los animales con senos de cualquier otra criatura.

Las enfermedades de los senos, particularmente el cáncer, no sólo atacan la salud y el bienestar de la mujer, también atacan la feminidad, maternidad y la identidad personal. A lo largo de la historia, el cáncer de seno ha amenazado a la mujer. Los tumores de seno fueron descritos por los egipcios 3000 años a. de J.C. Subsecuentemente, médicos griegos y romanos escribieron acerca del cáncer de seno y los registros de esta enfermedad continúan a través de la edad media hasta nuestros días.

La cirugía es el intento más viejo de tratar el cáncer de seno. Las operaciones han sido inventadas, descartadas, redescubiertas, cambiadas y abandonadas de nuevo, en lo que parece ser una moda interminable de los médicos por emplear la ciencia y la tecnología de sus tiempos.

El curso de los eventos en la historia del cáncer de seno nos permite identificar 4 períodos. En tiempos antiguos (aproximadamente del 3000 a. de

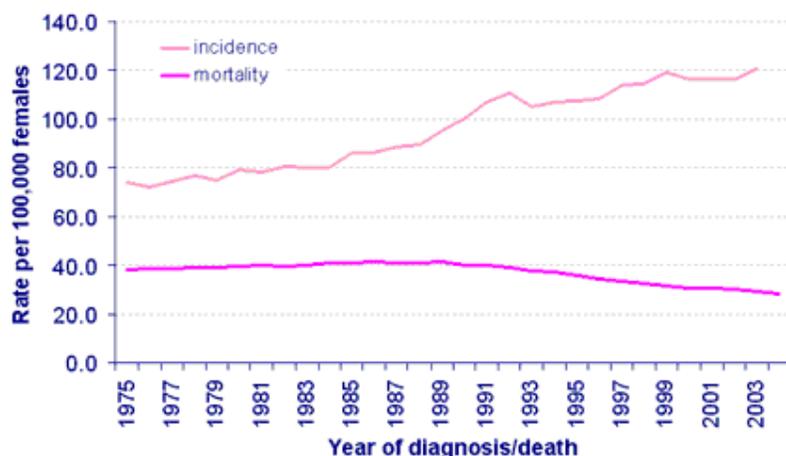
J.C. al 129-200 d. de J.C.) el tratamiento fue desaprobado porque la experiencia había enseñado que algunos tumores de seno eran agravados con la cirugía<sup>1</sup>, la experiencia de algunos médicos aconsejaba “es mejor no aplicar tratamiento alguno a los casos de cáncer oculto; si son tratados, los pacientes mueren rápido, pero si no son tratados ellos pueden vivir por un tiempo relativamente largo”.

Más tarde, el cáncer fue considerado como una enfermedad sistémica; la remoción quirúrgica podía dar alivio temporal, pero no se podía esperar que cure<sup>2</sup>. Este período fue de aproximadamente de 129-200 d. de J.C. al 1757 d. de J.C., siendo muy representativo de este período las teorías del médico Galeno acerca del exceso de bilis negra. El tercer período fue uno de los de mayor optimismo, basados en la creencia de que el cáncer de seno era una enfermedad local que podía ser curada con tratamiento local. Este período abarca aproximadamente de 1757 d. de J.C. al 1900 d. de J.C. En 1957, en Francia Henri Francois LeDran le dio avance a la teoría de que el cáncer en sus etapas tempranas empieza como una enfermedad local. Se disemina primero vía el sistema linfático a los nodos de la región y subsecuentemente entra a la circulación general<sup>3</sup>. Esta teoría ofrecía la posibilidad de que si la cirugía era hecha suficientemente temprano, posiblemente curaría el cáncer.

Finalmente, hoy en día se han establecido conceptos de cura basados en tratamientos locales y sistémicos. De acuerdo con el nuevo modelo, el cáncer de seno en la mayoría de los casos es una enfermedad sistémica en la cual las células tumorales se diseminan de un tumor primario mucho antes de que la enfermedad se diagnostique<sup>4</sup>, estas células circulan libremente a través de los sistemas linfático y sanguíneo y la micro metástasis (diseminación de células cancerosas) resultante a sitios distantes dificultan los intentos de curar solamente con terapia local. La terapia sistémica (quimioterapia, terapia hormonal) se utiliza para neutralizar y/o destruir la enfermedad a distancia y es necesaria para coadyuvar el tratamiento clínico. Este nuevo enfoque está integrado por un tratamiento multidisciplinario y recientemente tiene como objeto la prevención del cáncer de seno.

Hasta ahora la causa del cáncer de seno todavía no se conoce y los tratamientos distan mucho de ser perfectos, pero el desarrollo en este campo

parece que ha llevado a disminución en la incidencia de muertes por cáncer de seno, al menos en algunos países (Fig. 1).



**Figura 1.** Tasas de incidencia y mortalidad por edad en población europea debidas a cáncer de mama, GB, 1975-2004. Fuente:

<http://info.cancerresearchuk.org>

## II. EPIDEMIOLOGÍA DEL CANCER DE SENO.

Mundialmente, el cáncer líder en causar muertes de mujeres es el cáncer de seno (Tabla 1), siendo responsable por más de 300,000 muertes en 1990, de las cuales 174,100 ocurrieron en países desarrollados y 139,500 en países subdesarrollados.

Sitio del cáncer	No de casos (1000s)	% del total
Pecho	572	18
Cervix	466	15
Colon y recto	286	9
Estomago	261	8
Endometrio	149	5
Pulmón	147	5
Ovario	138	4
Boca y faringe	121	4
Esófago	108	4
Linfoma	98	3

*Tabla 1. Incidencia Global de Cánceres En Mujeres (1980).*

Fuente: ABC of Breast Cancer Epidemiology, Risk Factors, and Genetics, British Medical Journal 9sep00;321:624-

Los índices de mortalidad estimados en 1990 (por 100000 mujeres-año, edad ajustada, estándar mundial) varían más de 6 veces, internacionalmente hablando, de menos de 4.3 en China a 26.7 en Europa del Norte. Los índices también son bajos (menos de 15) en Japón, otras partes de Asia, África y Centroamérica, alrededor de 20 en Sudamérica y Sur Europa, y altos (más de 23) en Europa del Este y Norte América. De mediados de 1970 a mediados de 1980, los índices de mortalidad no cambiaron gran cosa en muchos de los países con altos índices, mientras se incrementaron en muchos de los países con bajos índices, resultando en un estrechamiento en las diferencias internacionales (figuras 2-A y 2\_B).

Los índices de incidencia (con edad ajustada, estándar mundial) son bajos en partes de China, Japón, India y Costa Rica (menos de 32); intermedios en Sudamérica, el Caribe, y Europa del Este; pero altos en Europa del Oeste, Canadá, y Norteamérica (Fig. 2-A y 2-B). Los índices en áreas urbanas generalmente exceden los índices en áreas rurales.

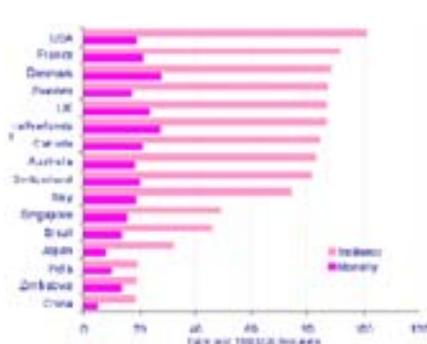


Figura 2-A: Edad estandarizada (mundial) índices de incidencia y mortalidad de cáncer de seno en algunos países, estimaciones del 2002.

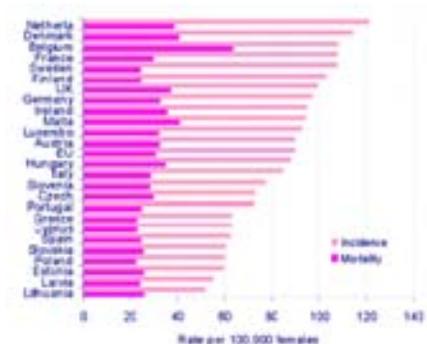


Figura 2-B: Edad estandarizada (europea) índices de incidencia y mortalidad de cáncer de seno en países europeos, estimaciones del 2000.

**Estudios con inmigrantes:** Las mujeres chinas que viven en Shanghai tienen 2/3 de riesgo de cáncer de seno comparadas con aquellas que viven en Hong Kong o Singapore, mientras que los índices en las poblaciones de mujeres Chinas que viven en Hawai y San Francisco son más del doble de altos. Similarmente las mujeres japonesas que viven en Hawai, San Francisco y Los Ángeles tienen índices del doble comparadas con aquellas que viven en Japón. Con respecto a Israel, mujeres que nacieron en África o Asia están en un menor riesgo comparadas con aquellas que nacieron en Israel, Europa, o Estado Unidos. El riesgo de cáncer de seno en emigrantes está fuertemente modificado a lo largo de las generaciones sucesivas<sup>42</sup>.

**Cáncer de mama en México:** México comienza a padecer enfermedades que caracterizan a los países desarrollados, entre las cuales está el cáncer de mama. El Cáncer en general se presenta actualmente como la segunda causa de muerte en nuestro país, donde mueren alrededor de 3500 mujeres y se presentan 10000 casos nuevos cada año. Aproximadamente, el 6% de las defunciones por cáncer corresponden al mamario, ocupando el sexto lugar dentro de las causas de muerte por cáncer, pero, el segundo lugar de muerte por cáncer en mujeres. Se considera hoy que para el año 2010 habrá una tasa de mortalidad de 13 por 100,000 mujeres adultas y cerca de 4500 defunciones por año por esta causa en México<sup>38</sup>.

La distribución regional de la mortalidad por cáncer de mama muestra diferencias entre norte y sur. La distribución que se ha obtenido permite distinguir cinco grupos (*Referencia: Instituto Nacional de Población*). El grupo 1, que comprende solamente al Distrito Federal, tiene las tasas de mortalidad por cáncer de mama más altas del país; en 1979 era de 8.6 y para 1994 se incrementó a 15.4 por 100000 mujeres. El grupo 2 compuesto por Jalisco, Estado de

**Cuadro II**  
**RAZÓN DE TASAS DE MORTALIDAD**  
**DE CÁNCER DE MAMA POR ENTIDAD FEDERATIVA**  
**EN LA REPÚBLICA MEXICANA, 1994**

Estado	RTM	IC 95%
Coahuila	1.62	(1.33, 1.96)
Sonora	1.52	(1.24, 1.82)
Nuevo León	1.50	(1.28, 1.75)
Distrito Federal	1.49	(1.35, 1.64)
Jalisco	1.34	(1.18, 1.53)
Chihuahua	1.31	(1.09, 1.59)
Nayarit	1.31	(0.95, 1.82)
Baja California	1.18	(0.93, 1.51)
Aguaascalientes	1.17	(0.82, 1.65)
Colima	1.11	(0.68, 1.81)
Tlaxcala	1.07	(0.86, 1.33)
Sinaloa	0.98	(0.77, 1.25)
Guanajuato	0.97	(0.81, 1.16)
Tlaxcala	0.93	(0.63, 1.40)
Estado de México	0.92	(0.81, 1.04)
Baja Calif. Sur	0.92	(0.48, 1.77)
Querétaro	0.90	(0.63, 1.29)
Durango	0.89	(0.65, 1.22)
Hidalgo	0.86	(0.66, 1.12)
Veracruz	0.78	(0.67, 0.92)
Tlaxcala	0.73	(0.51, 1.04)
San Luis Potosí	0.72	(0.34, 0.96)
Puebla	0.69	(0.37, 0.85)
Yucatán	0.67	(0.48, 0.94)
Morelos	0.67	(0.46, 0.95)
Zacatecas	0.66	(0.46, 0.96)
Michoacán	0.64	(0.51, 0.80)
Guerrero	0.60	(0.46, 0.79)
Quintana Roo	0.60	(0.30, 1.20)
Campeche	0.53	(0.27, 1.01)
Oaxaca	0.50	(0.38, 0.66)
Chiapas	0.49	(0.36, 0.66)

Población de referencia: República Mexicana  
 RTM= razón de tasas de mortalidad

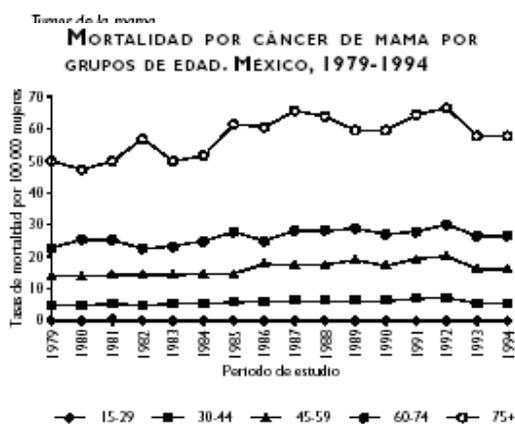
México, Nuevo León y Veracruz , le sigue en orden de importancia al Distrito Federal<sup>38</sup>.

**Cuadro1: Cortesía de López Ríos O y Col.**

**RAZÓN DE MORTALIDAD PROPORCIONAL POR CÁNCER DE MAMA EN LA REPÚBLICA MEXICANA 1970-1994**

Año	Total Defunciones	Tumor maligno
1970	485656	18411
1980	434379	26422
1990	422803	41161
1994	418908	48242

(1) Respecto al total de las defunciones  
(2) Respecto al total de los tumores



Fuente: Dirección General de Estadística e Informática, Secretaría de Salud

**Graf. 1:** Cortesía de: López Ríos O y Col.

Para 1979 los estados de este grupo presentaban tasas de dos a cuatro defunciones por 100000 mujeres y, en 1994, eran de cinco a ocho defunciones por 100000 mujeres.

Baja California, Coahuila, Chihuahua, Guanajuato, Michoacán, Sinaloa, Sonora y Tamaulipas compone el grupo 3, con tasas más bajas que en el grupo anterior (entre una y dos defunciones en 1979, que aumentaron a 2.5 - 4.5 en 1994).

El grupo 4 está formado por: Aguascalientes, Chiapas, Durango, Guerrero, Hidalgo, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Querétaro, San Luís Potosí, Tabasco, Yucatán y Zacatecas Sus tasas de incidencia se encuentran en niveles bajos; para 1994, no sobrepasan las 2 defunciones por 100000 mujeres.

Baja California Sur, Campeche, Colima, Quintana Roo y Tlaxcala conforman el grupo 5 y sus niveles son los más bajos (ver gráfica1, cuadro1, cuadro11).

Es importante considerar que la distribución regional que se observa para la mortalidad por cáncer de mama puede asociarse a la distribución regional del desarrollo socioeconómico: los estados del norte, donde las tasas son más importantes, son también aquellos donde imperan mejores condiciones socioeconómicas, que se traducen en mejores condiciones de vida. Por el contrario, en los del sur, menos desarrollados y donde prevalecen aún condiciones deficitarias de vida, las tasas de mortalidad por cáncer de mama son más bajas, predominando otras causas de muerte.

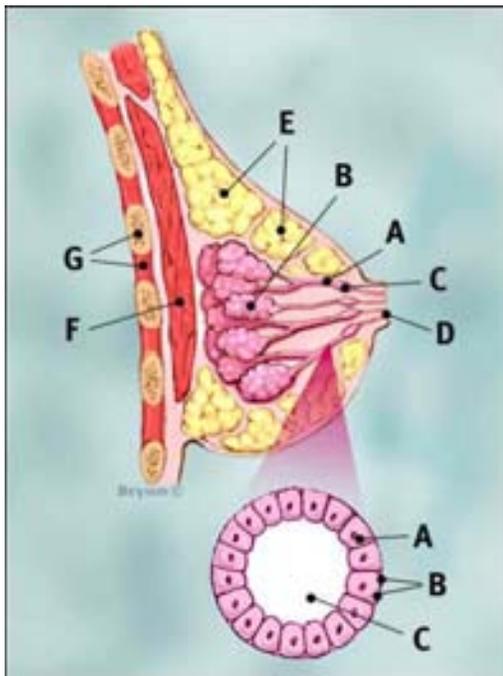
### **III. MORFOLOGÍA DEL SENO**

El seno es una masa de tejidos glandular, graso y fibroso, ubicado sobre los músculos pectorales de la pared del pecho y adherido a la misma por unos cordones fibrosos llamados ligamentos de Cooper. Una capa de tejido graso rodea las glándulas y se extiende a todo lo largo del seno. El tejido graso le da al seno una consistencia suave.

El tejido glandular del seno está constituido por los lóbulos (glándulas productoras de leche al final de los compartimentos) y los ductos (por donde pasa la leche). Durante la lactancia los bulbos al final de los lóbulos producen leche. Una vez que la leche se ha producido, viaja a través de los ductos para llegar al pezón.

El seno está compuesto de:

- glándulas mamarias (lóbulos) que producen leche
- ductos que transportan leche de las Glándulas mamarias (lóbulos) al pezón
- areola (una región pigmentada de rosa y/o café que rodea al pezón)
- tejido conectivo (fibroso) que rodea los lóbulos y los ductos
- grasa



- A** Ductos
  - B** lóbulos
  - C** sección dilatada de un ducto para pasar leche
  - D** pezón
  - E** grasa
  - F** músculo *Pectoralis major*
  - G** pared del pecho
- Ampliación
- A** células del ducto
  - B** membrana
  - C** centro del ducto

**Figura 3.** Corte transversal del seno. Fuente:

<http://www.bccancer.bc.ca/HPI/Nursing/Education/breastcancer/diagnosis/bcbasics/htm>

#### **IV. FACTORES DE RIESGO**

**IV.1 LA DIETA.** La relación entre la dieta y el riesgo de cáncer de seno ha sido extensamente estudiada, con resultados poco convincentes. Existen estudios que apoyan la idea de que una dieta rica en grasas incrementa el riesgo de cáncer de seno. Así como el riesgo parece reducirse con una dieta rica en

fibra<sup>5</sup>. Los antioxidantes son objeto de estudio ya que podrían proveer una protección contra las especies de oxígeno muy reactivas que son causantes de daños en el ADN. La vitamina C ha sido de interés, no sólo por su efecto antioxidante sino porque también puede bloquear la formación de nitrosaminas carcinógenas<sup>5</sup>.

Se ha propuesto que el consumo de fitoestrógenos de los productos de soya puede tener un impacto benéfico, esto se apoya en el alto consumo de estos productos en países con bajo índice de casos de cáncer como Japón y China<sup>5</sup>.

**IV.2 LA EDAD.** El riesgo de contraer cáncer de seno se incrementa con la edad, (Fig.4) incrementándose al doble cada 10 años hasta la menopausia, donde la tendencia al incremento en el riesgo se reduce dramáticamente. Comparado con el cáncer de pulmón, la incidencia el cáncer de seno es más alta a edades menores, aunque es relativamente raro en adolescentes y mujeres veinte añeras, cuando ataca a estas edades suele ser más agresivo<sup>42</sup>.

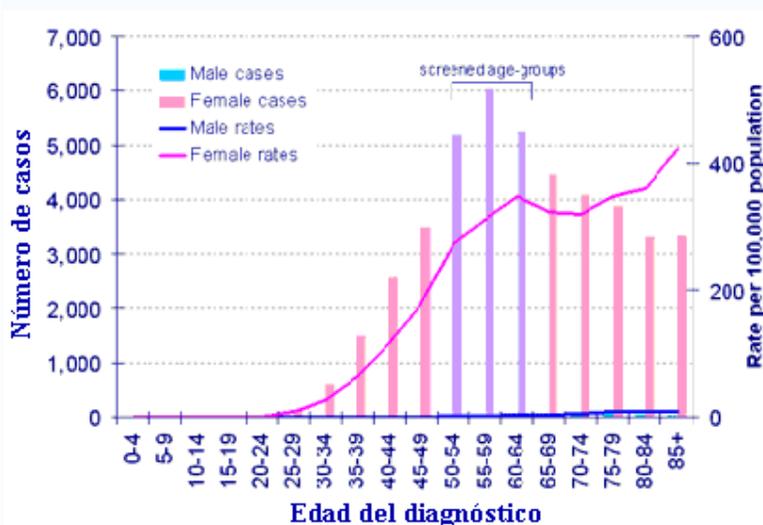
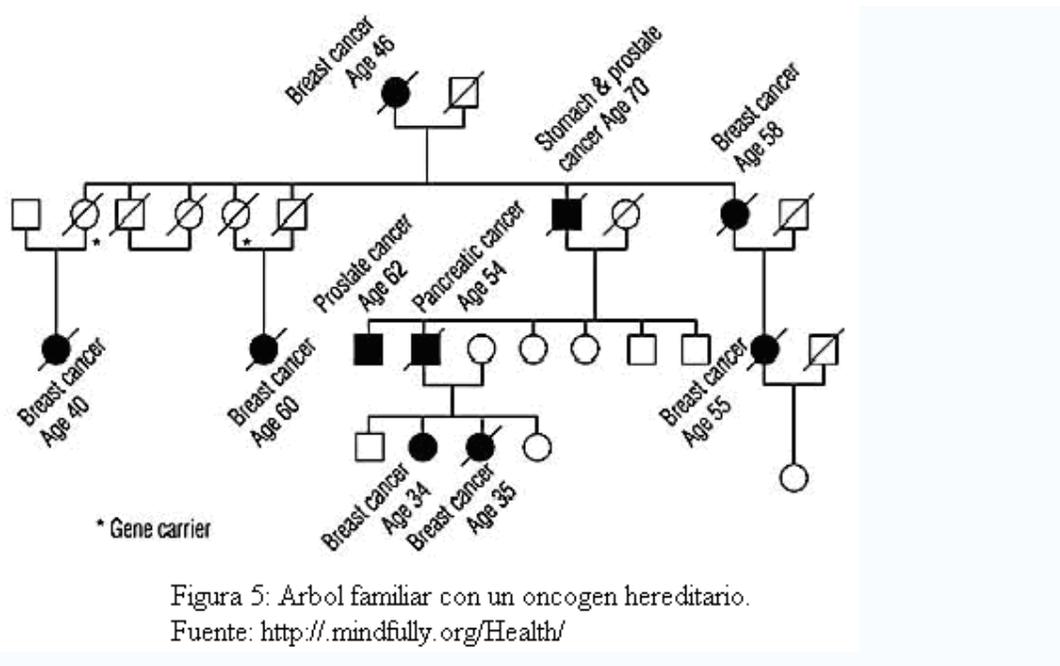


Figura 4: Número de nuevos casos e índices de incidencia por edad específica, de cáncer de pecho, por sexo. Fuente: <http://info.cancerresearch.uk.org>

**IV. 3 EL FACTOR GENÉTICO.** Más del 10% de los casos de cáncer de seno en los países occidentales son debido a la predisposición genética. Esta

susceptibilidad es generalmente heredada como un factor dominante autosomal<sup>6</sup>. Todavía no está bien conocido cuantos oncogenes de cáncer de seno existen, pero se han identificado BRCA1 y BRCA2 que están en una proporción sustancial en familias con un alto riesgo, aquellas con 4 o más parientes con esta enfermedad. Dichos genes son muy largos y lo que aumenta la probabilidad de que sufran mutaciones. Mutaciones heredadas en otros dos genes, p53 y PTEN, están asociadas con síndromes familiares que incluyen un alto riesgo de cáncer de seno pero ambos son raros. Existen seguramente otros genes (aún sin identificar) que incrementan el riesgo de padecer esta enfermedad. El riesgo de una mujer de desarrollar cáncer de seno es de dos o más veces, si se tiene un pariente en primer grado (madre, hermana, o hija) que halla desarrollado la enfermedad antes de los 50 años. Por ejemplo, una mujer la cual tiene una hermana que desarrolló la enfermedad a la edad de 30-39 años, tiene un riesgo acumulado de desarrollarla ella misma a la edad de 65 años, pero ese riesgo es de sólo 5% (cerca del riesgo de la población en general) si la hermana enfermó a la edad de 50-54 años. El riesgo se incrementa entre 4 y 6 veces si dos parientes en primer grado desarrollaron la enfermedad. Por ejemplo, una mujer con 2 parientes afectados, uno con la enfermedad antes de los 50 años, tiene un 25% de probabilidad de desarrollar la enfermedad a la edad de 65 años. (Fig. 5)



**IV.4 FACTORES DEMOGRÁFICOS**

El cáncer de seno generalmente está reconocido como una enfermedad que ocurre más frecuentemente en mujeres de alta clase social, medido por su nivel educativo o ingreso familiar<sup>7</sup>. Los estudios parecen indicar que estas asociaciones reflejan el efecto de la correlación entre factores del estilo de vida, como la avanzada edad del nacimiento del primer bebe<sup>8</sup>. Se ha encontrado que mujeres mayores de 40 que nunca se casaron tienen mayor riesgo de cáncer de mama que aquellas mujeres que estuvieron casadas alguna vez<sup>9</sup>. Igualmente, se ha encontrado que las monjas tienen en un riesgo más alto<sup>10</sup> que la mujer promedio. Existen referencias comunes al descubrimiento de que mujeres judías tienen un índice alto de cáncer de mama, pero vincular esto con variables como el nivel socioeconómico, no ha sido posible.

**IV.5 FACTORES MENSTRUALES**

Numerosos estudios han mostrado que mujeres que tuvieron a una edad temprana su primera menstruación (antes de los 12 años de edad), están en riesgo alto de cáncer de seno; esto es un 50% más de riesgo que aquellas mujeres que empezaron a la edad de 15 años o después<sup>11</sup>.

Se ha mostrado que mujeres que tuvieron su menopausia a edad avanzada están en un riesgo más elevado de cáncer de mama; el riesgo relativo es de aproximadamente el doble para aquellas mujeres con menopausia después de los 55 años comparadas con aquellas cuya menopausia ocurrió antes de los 45 años de edad<sup>12</sup>.

#### **IV.6 TABAQUISMO**

Los investigadores siguen estudiando los efectos del tabaquismo en relación con el cáncer, aunque no se ha encontrado claramente que el fumar altere el riesgo de contraer cáncer de mama. Recientemente, el interés se ha enfocado en como el fumar cigarro puede ser afectado por factores genéticos, en un estudio, el fumar aparentemente incrementa el riesgo en aquellos individuos en los que se encontró que son acetiladores lentos, esto último definido por el genotipo de la N-acetiltransferasa<sup>13</sup>, aunque posteriores estudios fallaron en confirmar esta asociación.

#### **IV.7 RADIACIONES**

A partir de estudios con mujeres expuestas a la bomba atómica en Japón y de observaciones de mujeres expuestas a tratamientos médicos que involucran repetidas exposiciones a radiaciones (radiografía fluoroscópica de pecho para tuberculosis, radioterapia para mastitis aguda postparto). Está bien establecido que las radiaciones ionizantes al pecho en dosis que van de moderadas a altas (entre 5 y 3 Gy) antes de 40 años, incrementa el riesgo de cáncer de mama y una dosis más alta implica un riesgo más alto<sup>14</sup>.

#### **IV.8 OTROS AGENTES CANCERÍGENOS**

Un posible papel etiológico de solventes orgánicos, óxidos metálicos y mezclas de ácidos se ha estudiado<sup>15</sup>, sin obtener todavía resultados claros.

### **V. ONCOGÉNESIS:**

En términos de patogénesis, la etiología básica del cáncer de mama todavía permanece oscura. Pero se sabe que es el resultado de un número de influencias genéticas, hormonales y químicas que actúan en el ADN de una célula.

El mantenimiento de una estructura epitelial, como las células de los ductos de la glándula mamaria, depende de la actividad prolífica de las células, las cuales tienen la habilidad de proliferar en una forma en la que algunas retienen la actividad prolífica, mientras que otras maduran en un estado terminal de alguna forma diferenciada. Las formadoras por definición, son las células madre. La actividad prolífica de células madre normales, está sujeta a un control por el medio; nutrientes y factores de crecimiento permiten la replicación, mientras las hormonas regulan la proliferación en un patrón cíclico temporal. El destino de estas células determinado por estos controles, puede ser uno de tres: (1) puede permanecer tal cual y servir para futuras necesidades; (2) se puede dividir en dos células hijas, una que es otra célula madre mientras la otra se diferencia; ó (3) puede formar dos células hijas con poca capacidad de diferenciación pero con alta actividad prolífica. Esta última opción es bastante rara, pero la posibilidad de que ocurra se incrementa con un daño en el ADN. Tal daño, podría ocurrir durante la mitosis o como resultado de la exposición a carcinógenos ambientales. Una vez que el genoma se afectó por uno o más de estos factores, existe un incremento en la posibilidad de alteraciones futuras. Dichas alteraciones son conocidas como progresión tumoral y la parte crítica de ésta es la adquisición de nuevas propiedades que favorecen el crecimiento del tumor y nuevas subclonas celulares pueden aparecer durante este proceso. Estas nuevas propiedades incluyen anormalidades cromosómicas más complejas, decremento en la dependencia de factores de crecimiento, la habilidad de crecer en ambientes nuevos, que le permite a algunas células formar micrometástasis y secretar de proteínas que afectan el metabolismo del huésped. Una de las características de la progresión tumoral es que las nuevas características de las células malignas se adquieren independientemente una de las otras, esto lleva a que la habilidad

de crecer en un tejido (por ejemplo en un nodo linfático) es independiente de su habilidad para establecer una colonia en otro tejido (por ejemplo hueso).

## **VI. HISTORIA NATURAL DEL CÁNCER DE MAMA:**

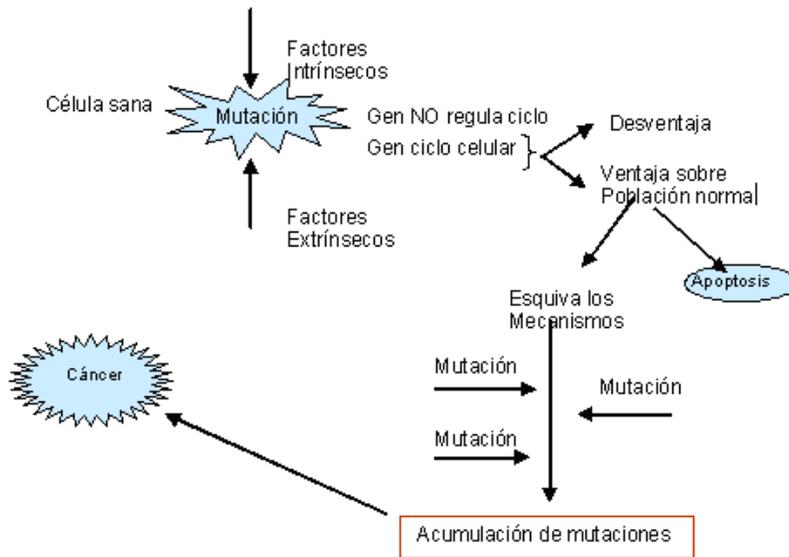
Aunque existen muchos datos epidemiológicos de cáncer de mama, para algunos investigadores estos datos no encajan bien juntos en un modelo racional para el desarrollo del cáncer de mama. Dichos modelos son incompletos o no explican algunos factores de riesgo.

El cáncer de mama es es la forma más común de cáncer en mujeres.

El cáncer lo entendemos como la proliferación incontrolada de células y la metástasis de éstas a otros tejidos, lo cual da como resultado final el inadecuado funcionamiento de la población normal de células.

Visto desde esta perspectiva, uno de los principales factores involucrados en la génesis del cáncer, es la alteración del ciclo celular, el cual en condiciones normales consta de mecanismos que le permiten a la célula controlar su división. Estos mecanismos dependen de señales tanto intracelulares como extracelulares que regulan procesos de transducción de señales, permitiendo de esta forma que una célula entre o no en un ciclo de división celular.

Las células cancerígenas sufren alteraciones en estos procesos de control, desencadenando una proliferación descontrolada independiente de los factores extrínsecos e intrínsecos. Estas alteraciones son el resultado de la suma de mutaciones, las cuales pueden desencadenar una señal de muerte celular programada (apoptosis) o una mejor adaptabilidad al medio, favoreciendo la supervivencia de la población celular de una misma clona (figura 6).



**Figura 6.** Fuente: [Juan Fernando Vera, MD.](#)

[www.abcmedicus.com/articulo/medicos/id/158/pagina/1/carcinogenesis.html](http://www.abcmedicus.com/articulo/medicos/id/158/pagina/1/carcinogenesis.html)

23

## VII. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DEL CÁNCER DE MAMA:

Una vez generadas las alteraciones suficientes para crear una célula cancerígena, ésta tiene la capacidad de generar una clona de células con las mismas alteraciones genéticas pero lo suficientemente heterogéneas, lo cual les permite ser resistentes a cualquier tipo de medida de control. Es esta heterogeneidad, dada por la velocidad de mutación, el número de individuos de la población y la velocidad de reproducción lo que le permite una ventaja selectiva sobre la población normal de células.

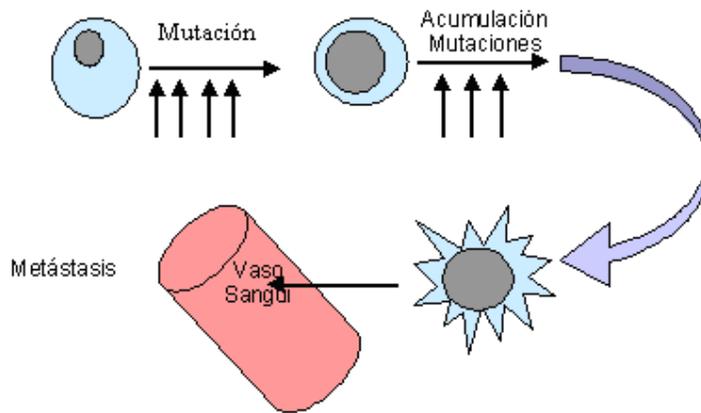
Otro factor molecular importante en la evolución de cáncer es que, dependiendo del tipo de clona y del grupo de genes alterados, el cáncer se comportará con mayor o menor agresividad. Siendo el ejemplo de esto los tumores benignos y malignos en donde la diferencia radica en la capacidad que tiene el tumor maligno de realizar metástasis.

Los tumores benignos se caracterizan por ser un grupo celular que a pesar de ser indiferenciadas se encuentran delimitadas por una membrana basal que hace las veces de cápsula; pero en algunas ocasiones estos tumores benignos evolucionan a malignos por la acumulación de mutaciones, las cuales le permiten desarrollar receptores de laminina para adosarse a la membrana basal y producir colagenasa IV, que le permite a la célula cancerígena destruir la membrana basal y pasar al torrente sanguíneo.

Pero, para que este fenómeno se pueda desarrollar es necesario que el tumor estimule mecanismos de angiogénesis para que de esta forma asegure su crecimiento y poder realizar metástasis. En la actualidad se consideran que son 6 los pasos en el desarrollo de angiogénesis:

1. Disolución de la membrana basal que rodea al vaso.
- 2.- Migración de células endoteliales del vaso hasta el tumor.
- 3- División celular de las células migratorias.
- 4- Elongación de los nuevos vasos inmaduros.
- 5- Formación de redes vasculares y canalización.
- 6- Maduración de los componentes de la membrana basal

Una vez que se ha realizado la angiogénesis y la célula cancerígena se ha capacitado para degradar su membrana basal está lista para pasar al torrente sanguíneo. Pero para que esta célula pueda vivir fuera de su tejido de origen debe desarrollar mutaciones que le permitan a la célula vivir sin las señales de supervivencia que normalmente envían las moléculas de adhesión del entorno a la célula y sin las cuales una célula normal no puede vivir. De esta forma, es posible que la célula cancerígena pueda viajar libremente y ser sembrada en otro entorno biológico diferente, fenómeno que se conoce como metástasis (ver figura7).



**Figura 7.** Evolución de una célula normal hasta convertirse en un tumor con metástasis (Fuente: Vera, JF. 2008, <http://www.abcmedicus.com/articulo/medicos/2/id/158/pagina/3/carcinogenesis/html>)

El primer punto de relevancia es el tamaño crítico al cual la angiogénesis debe ocurrir, esto tiene que ser aproximadamente a las 10,000 células porque es la esfera más grande de células que puede existir sin necrosis debido a la carencia de oxígeno y nutrientes. Dicha esfera debería de tener un diámetro aproximado de 0.3mm.

Mientras las células continúan acumulándose, el siguiente punto es el tamaño suficiente para aparecer en las mamografías, ya que según estudios ningún cáncer menor a 2.1mm es visible en mamografías.

El siguiente punto está basado en el número de células cancerosas que deben estar en el seno como para producir una masa palpable. Aproximadamente de  $1\text{cm}^3$ , el número es aproximadamente de  $2^{30}$  células. La masa promedio a la cual la mayoría de las cuales son descubiertas por una simple exploración personal es de  $2^{33}$  a  $2^{36}$ . Desde el punto de vista citocinético éste es un estado final de la enfermedad.

Por concepto el cáncer de mama se desarrolla vía un número de pasos. De un ducto epitelial normal progresa a una hiperplasia epitelial, después a una hiperplasia epitelial atípica, siguiéndole el carcinoma *in situ* no invasivo. El cáncer no invasivo, puede eventualmente, penetrar la membrana basal del

ducto para convertirse en un cáncer invasivo por medio del acceso a los vasos linfáticos y sanguíneos produciendo adenopatía y finalmente haciéndose evidente en partes distantes del cuerpo. Esta evolución no siempre es demostrable, pero con cada paso del proceso, usualmente se encuentran remanentes del paso previo. Una hiperplasia atípica frecuentemente se encuentra con cáncer no invasivo y, cáncer no invasivo, está presente con un 50-80% de cáncer invasivo, mientras el cáncer invasivo avanza, las posibilidades de supervivencia disminuyen.

Aunque estos pasos representaran el progreso natural de la enfermedad, esto sólo está implícito; una progresión ordenada de la enfermedad de un paciente en particular no necesariamente sigue estos pasos.

En 1954 la Unión Internacional Contra el Cáncer inicio un esfuerzo para perfeccionar una clasificación que pudiera aceptarse en todo el mundo, la cual está basada en la descripción de un tumor primario (T), los nodos linfáticos de la región (N), y la presencia o ausencia de una metástasis distante (M), TNM (ver figura 8).

Primary Tumor (T)		Pathologic (pN)†	
Definitions for classifying the primary tumor (T) are the same for clinical and for pathologic classification. If the measurement is made by physical examination, the examiner will use the major headings (T1, T2, or T3). If other measurements, such as mammographic or pathologic measurements, are used, the subsets of T1 can be used. Tumors should be measured to the nearest 0.1 cm increment.		N3b	Metastasis in ipsilateral internal mammary lymph node(s) and axillary lymph node(s)
		N3c	Metastasis in ipsilateral supraclavicular lymph node(s)
		<b>Pathologic (pN)†</b>	
		pNX	Regional lymph nodes cannot be assessed (e.g., previously removed, or not removed for pathologic study)
		pN0	No regional lymph node metastasis histologically, no additional examination for isolated tumor cells (ITC)
		Note: Isolated tumor cells (ITC) are defined as single tumor cells or small cell clusters not greater than 0.2 mm, usually detected only by immunohistochemical (IHC) or molecular methods but which may be verified on H&E stains, ITCs do not usually show evidence of malignant activity (e.g., proliferation or stromal reaction).	
TX	Primary tumor cannot be assessed	pN0(-)	No regional lymph node metastasis histologically, negative IHC
T0	No evidence of primary tumor	pN0(+)	No regional lymph node metastasis histologically, positive IHC, no IHC cluster greater than 0.2 mm
Tis	Carcinoma in situ	pN0(mol-)	No regional lymph node metastasis histologically, negative molecular findings (RT-PCR)
Tis (DCIS)	Ductal carcinoma in situ	pN0(mol+)	No regional lymph node metastasis histologically, positive molecular findings (RT-PCR)
Tis (LCIS)	Lobular carcinoma in situ	pN1	Metastasis in 1 to 3 axillary lymph nodes, and/or in internal mammary nodes with microscopic disease detected by sentinel lymph node dissection but not clinically apparent‡
Tis (Paget's)	Paget's disease of the nipple with no tumor	pN1mi	Micrometastasis (greater than 0.2 mm, none greater than 2.0 mm)
Note: Paget's disease associated with a tumor is classified according to the size of the tumor.		pN1a	Metastasis in 1 to 3 axillary lymph nodes
T1	Tumor 2 cm or less in greatest dimension	pN1b	Metastasis in internal mammary nodes with microscopic disease detected by sentinel lymph node dissection but not clinically apparent‡
T1mic	Microinvasion 0.1 cm or less in greatest dimension	pN1c	Metastasis in 1 to 3 axillary lymph nodes and in internal mammary lymph nodes with microscopic disease detected by sentinel lymph node dissection but not clinically apparent‡ (if associated with greater than 3 positive axillary lymph nodes, the internal mammary nodes are classified as pN3b to reflect increased tumor burden)
T1a	Tumor more than 0.1 cm but not more than 0.5 cm in greatest dimension	pN2	Metastasis in 4 to 9 axillary lymph nodes, or in clinically apparent* internal mammary lymph nodes in the absence of axillary lymph node metastasis
T1b	Tumor more than 0.5 cm but not more than 1 cm in greatest dimension	pN2a	Metastasis in 4 to 9 axillary lymph nodes (at least one tumor deposit greater than 2.0 mm)
T1c	Tumor more than 1 cm but not more than 2 cm in greatest dimension	pN2b	Metastasis in clinically apparent* internal mammary lymph nodes in the absence of axillary lymph node metastasis
T2	Tumor more than 2 cm but not more than 5 cm in greatest dimension	pN3	Metastasis in 10 or more axillary lymph nodes, or in infraclavicular lymph nodes, or in clinically apparent* ipsilateral internal mammary lymph nodes in the presence of 1 or more positive axillary lymph nodes; or in more than 3 axillary lymph nodes with clinically negative microscopic metastasis in internal mammary lymph nodes; or in ipsilateral supraclavicular lymph nodes
T3	Tumor more than 5 cm in greatest dimension	pN3a	Metastasis in 10 or more axillary lymph nodes (at least one tumor deposit greater than 2.0 mm), or metastasis to the infraclavicular lymph nodes
T4	Tumor of any size with direct extension to (a) chest wall or (b) skin, only as described below		
T4a	Extension to chest wall, not including pectoralis muscle		
T4b	Edema (including peau d'orange) or ulceration of the skin of the breast, or satellite skin nodules confined to the same breast		
T4c	Both T4a and T4b		
T4d	Inflammatory carcinoma		
Regional Lymph Nodes (N)			
Clinical			
NX	Regional lymph nodes cannot be assessed (e.g., previously removed)		
N0	No regional lymph node metastasis		
N1	Metastasis to movable ipsilateral axillary lymph node(s)		
N2	Metastases in ipsilateral axillary lymph nodes fixed or matted, or in clinically apparent* ipsilateral internal mammary nodes in the absence of clinically evident axillary lymph node metastasis		
N2a	Metastasis in ipsilateral axillary lymph nodes fixed to one another (matted) or to other structures		
N2b	Metastasis only in clinically apparent* ipsilateral internal mammary nodes and in the absence of clinically evident axillary lymph node metastasis		
N3	Metastasis in ipsilateral infraclavicular lymph node(s) with or without axillary lymph node involvement, or in clinically apparent* ipsilateral internal mammary lymph node(s) and in the presence of clinically evident axillary lymph node metastasis; or metastasis in ipsilateral supraclavicular lymph node(s) with or without axillary or internal mammary lymph node involvement		
N3a	Metastasis in ipsilateral infraclavicular lymph node(s)		

**Figura 8:** Clasificación TNM. Fuente: Cancer of the breast William L. D. y Spratt J. S. 2002 (referencia<sup>42</sup>).

## VII.1. CARCINOMA DUCTAL IN SITU:

Más comúnmente conocido como CDIS, este cáncer es un grupo de lesiones heterogéneas en el cual presumiblemente células epiteliales malignas

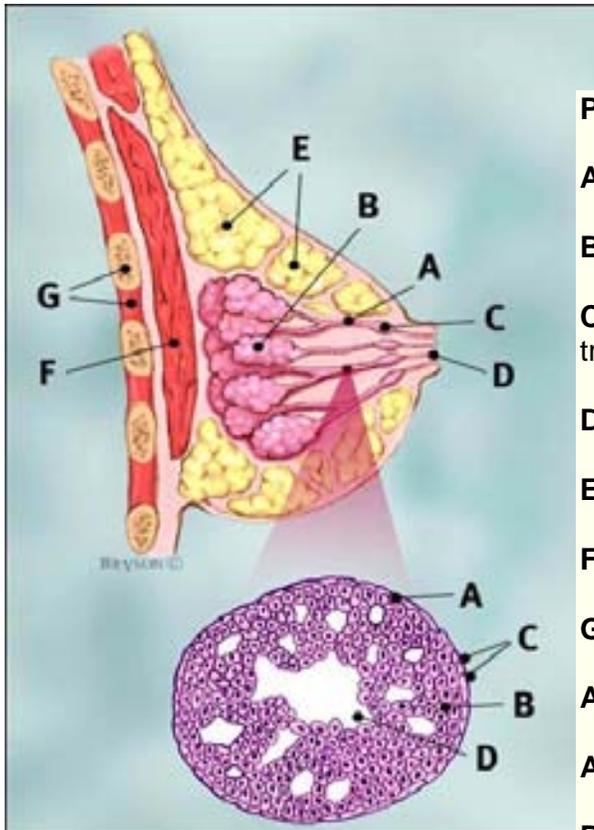
proliferan en el sistema de ductos, pero evidencia de invasión a través de la membrana basal, no es demostrable por microscopia de luz.

La lesión generalmente empieza con un tamaño de pequeño a moderado en los ductos. Es muy variable en cuanto a su apariencia biología y comportamiento. Es una enfermedad muy confusa y es común que los pacientes con dicha enfermedad pidan una segunda, tercera y cuarta opinión.

Hoy en día, esta enfermedad ocupa al menos del 15 al 20% de todos los nuevos casos diagnosticados de cáncer de mama. La pregunta central en estos casos es ¿Cuál o cuáles de estas lesiones se convertirán en una forma invasiva de cáncer y cuáles no?.

El concepto de carcinoma preinvasivo fue el primero que se acogió, después se usó el término *in situ* para describir el paso no invasivo del cáncer de mama. El reto de diferenciar entre lesiones atípicas altamente proliferativas y carcinoma *in situ* continua hasta hoy.

Aunque no es universalmente aceptada la clasificación histopatológica, la mayoría de los patólogos lo dividen en 5 subtipos ( papilar, micropapilar, cibriforme, sólido, y comedo). El comedo es frecuentemente asociado con un rango de proliferación más alto y un comportamiento clínicamente más agresivo.



**Figura 9.** Fuente:  
<http://www.bccancer.bc.ca/HPI/Nursing/Education/breastcancer/diagnos/s/bcbasics/htm>

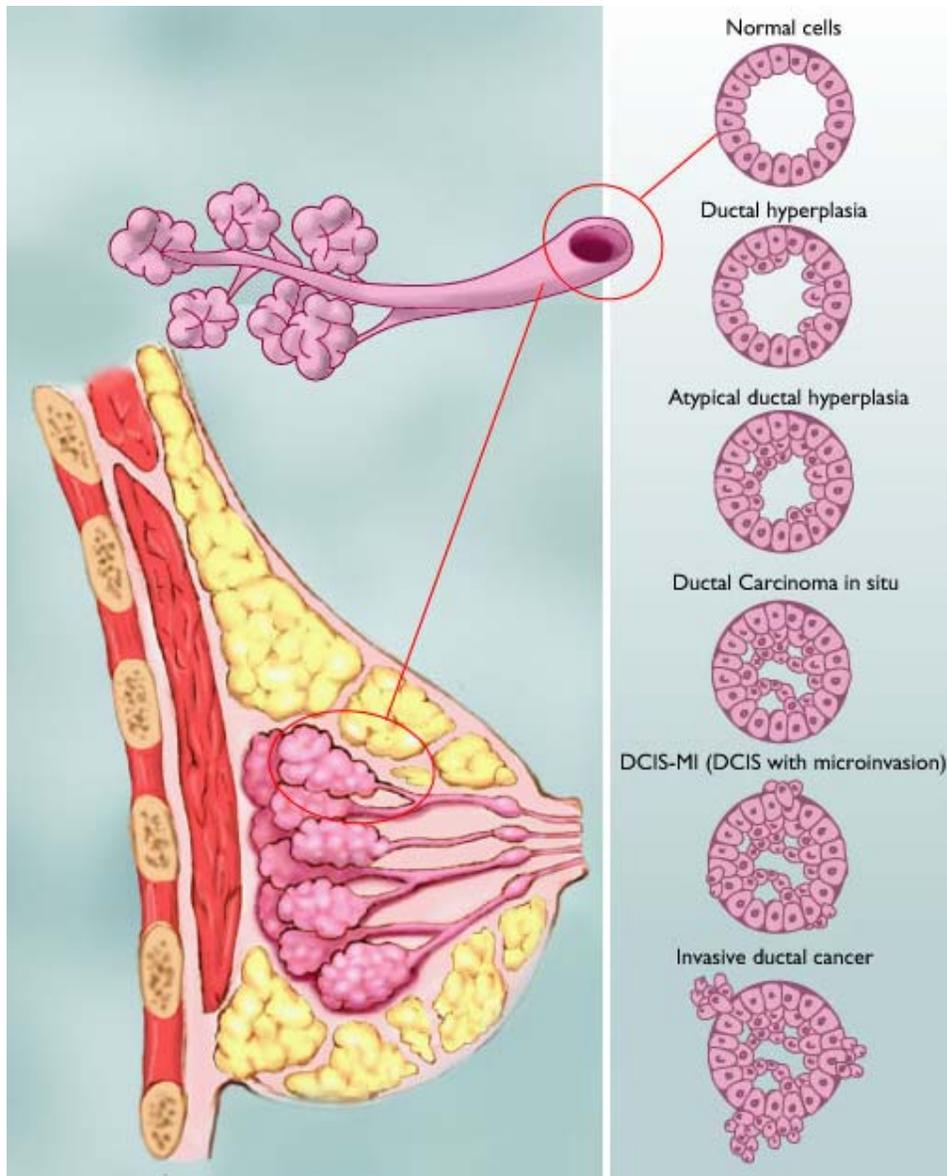
**Perfil del seno:**

- A ductos
- B lóbulos
- C sección dilatada de un ducto para transportar leche
- D pezón
- E grasa
- F músculo pectoralis mayor
- G pared del pecho

**Agrandamiento:**

- A células de ducto normales
- B células de ducto cancerosas
- C membrana basal
- D lumen (centro del ducto)

La aparición de microinvasión es difícil de cuantificar ya que no había una definición formal y universalmente aceptada. Pero la edición más reciente de La Junta del Comité Americano Sobre Cáncer, define microinvasión como uno o más focos de invasión, de los cuales ninguno debe ser mayor a 1mm de diámetro.



**Figura 10.** Progreso de lesiones precancerosas hasta cáncer invasivo. (Fuente: [http://www.bccancer.bc.ca.HPI/Nursing/Education/breastcancer/diagnosis/bcbasics/htm](http://www.bccancer.bc.ca/HPI/Nursing/Education/breastcancer/diagnosis/bcbasics/htm))

## VII.2 CARCINOMA LOBULAR IN SITU:

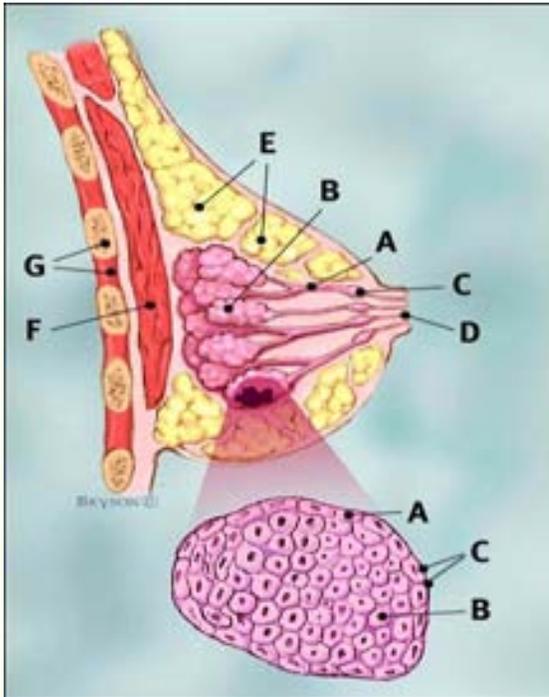
Carcinoma lobular in situ (CLIS) del seno. Esta es una lesión comúnmente identificada como algo incidental en las biopsias de seno y es causada por enfermedades quísticas u otras condiciones, causando anomalías mamográficas o masas palpables.

Este tipo de cáncer es mamográficamente silencioso por eso no se le asocia con fibrosis estromal y sólo en pocos casos se ven microcalcificaciones. Por estas mismas razones este cáncer no es visible en un examen general.

Histológicamente, los lóbulos involucrados aparecen con una proliferación de células distendidas con una falta de cohesión característica; por eso, aún cuando los lóbulos están completamente llenos, no parecen estar “bien empacados”. Esta propiedad es una importante pista que permite diferenciarlo de una hiperplasia benigna y del carcinoma ductal *in situ*. Las células neoplásicas tienen un escaso o moderado citoplasma rodeando un núcleo uniforme con un pequeño nucleolo. La mitosis es escasa o nula. Algo frecuente que se encuentra en biopsias de carcinoma lobular *in situ* es el fenómeno conocido como diseminación pagetoide, el cual consiste en la presencia de células malignas entre el epitelio y la membrana basal del ducto. El epitelio normal preexistente es frecuentemente adelgazado y atenuado por la presencia de las células carcinógenas, el mioepitelio puede o no ser visible. Esta diseminación pagetoide es frecuente en CLIS pero rara en CDIS y su presencia es invariablemente un signo de enfermedad maligna.

Es difícil establecer una incidencia de este cáncer debido a que es una lesión clínicamente silenciosa, pero algunos estudios han mostrado una incidencia de 0.5 al 5%. Con un factor de riesgo relativo de desarrollar cáncer invasivo de 9.0.

En conclusión parece que el CLIS representa un indicador de riesgo más que un precursor de cáncer invasivo.



**Figura 11.** Seno normal con carcinoma lobular *in situ* (LCIS) con un corte de sección de lóbulo ampliada. Fuente: <http://www.bccancer.bc.ca/HPI/Nursing/Education/breastcancer/diagnos/s/bcbasics/htm>

**Perfil del seno:**

- A** ductos
- B** lóbulos
- C** sección de un ducto transportador de leche
- D** pezón
- E** grasa
- F** músculo *pectoralis major*
- G** pared del pecho

**Ampliación:**

- A** células lobulares normales
- B** células lobulares cancerosas
- C** membrana vascular

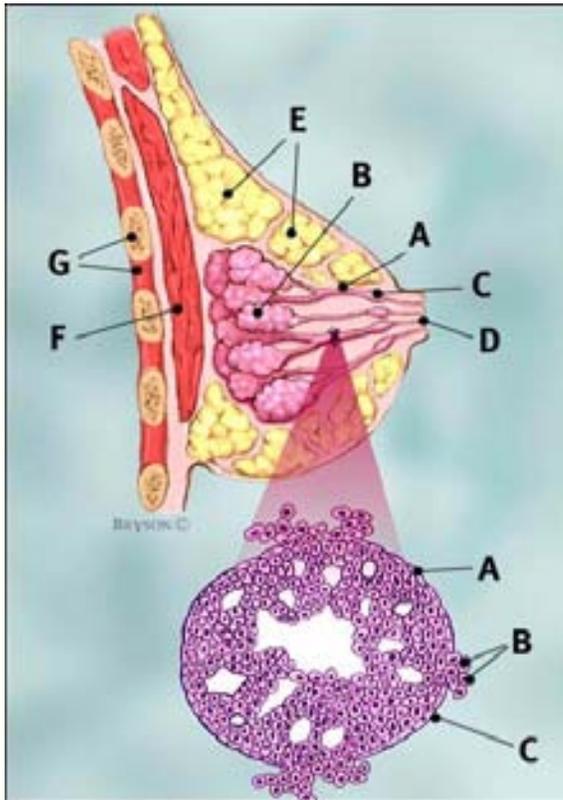
**VII.3 CARCINOMA INVASIVO** (A menos que se indique lo contrario se trata de carcinoma ductal invasivo):

De acuerdo con la definición, la clasificación histopatológica de los tumores malignos más comunes en el seno está hecha por exclusión. Entonces el carcinoma ductal invasivo (CDI), a menos que se especifique otro, es un carcinoma invasivo que no cae en las otras categorías de carcinomas de seno.

A grosso modo el CDI es usualmente un tumor sólido, pero áreas pseudoquísticas pueden estar presentes como consecuencia de la necrosis. El tamaño del tumor varía de unos pocos milímetros a varios centímetros. La dureza y el color también son variables, pero, frecuentemente, es de

consistencia de firme a dura con un color gris blanquecino. Los márgenes son irregulares en la mayoría de los casos, cuando invade la piel de las capas superiores se pigmenta, lo cual puede conducir a un error en el diagnóstico.

Histológicamente CDI está compuesto de elementos con una cantidad variable de citoplasma arreglados en nidos cordones y estructuras glandulares. El grado de los carcinomas mamarios consiste en una evaluación de la diferenciación comparando las propiedades de las estructuras y núcleos del tumor con aquellas en la glándula mamaria normal. Uno de los sistemas más ampliamente usados está basado en evaluación de hiper cromasia y pleomorfismo nuclear, formación tubular e índice amitótico.



**Perfil del seno:**

- A** ductos
- B** lóbulos
- C** sección de un ducto transportador de leche
- D** pezón
- E** grasa
- F** músculo pectoralis mayor
- G** pared del pecho

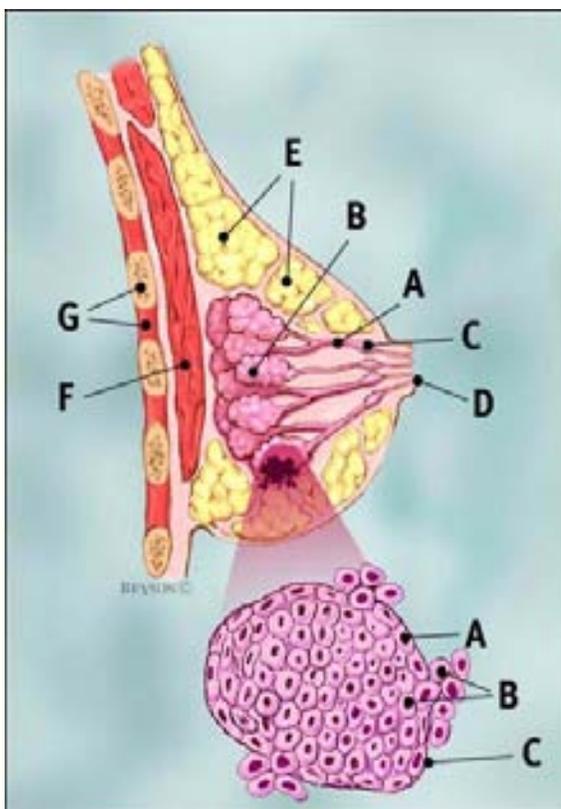
**Ampliación:**

- A** células de ducto normales
- B** células de ducto cancerosas rompiendo la membrana basal.
- C** membrana basal

**Figura 12:** El cacinoma ductal invasivo. Fuente: [http://www.bccancer.bc.ca.HPI/Nursing/Education/breastcancer/diagnosis/bcbasics/htm](http://www.bccancer.bc.ca/HPI/Nursing/Education/breastcancer/diagnosis/bcbasics/htm)

## VII.4 CARCINOMA LOBULAR INVASIVO:

CLI es un tumor compuesto de células uniformes creciendo típicamente en un patrón de una sola fila y, frecuentemente, arregladas concéntricamente alrededor de los ductos residuales. La incidencia de este cáncer es del 1 al 20%. Es un tumor de consistencia firme a dura. Microscópicamente está compuesto por células que tienen bordes nítidos y escasa cohesión, las células crecen en un patrón difuso formando pequeños cordones compuestos de una fila de células. En su forma clásica la células neoplásicas de este cáncer son uniformes, con pequeñas cantidades de citoplasma y un núcleo uniforme<sup>42</sup>.



**Figura 13:** El carcinoma lobular invasivo. Fuente: <http://www.bccancer.bc.ca.HPI/Nursing/Education/breastcancer/diagnos/s/bcbasics/htm>

### Perfil del seno:

- A** ductos
- B** lóbulos
- C** sección de un ducto transportador de leche
- D** pezón
- E** grasa
- F** músculo pectoralis mayor
- G** pared del pecho

### Ampliación:

- A** células lobulares normales
- B** células lobulares cancerosas
- C** membrana basal

## **VIII. DIAGNÓSTICO DE CÁNCER DE MAMA:**

No existe un método que diagnostique bien (diagnóstico eficiente, temprano, rápido, barato, y al alcance del grueso de la población), de hecho ni siquiera que diagnostique sin falla (es decir, que no de ciertos porcentajes de falsos positivos y falsos negativos), esto en parte debido a que no se conocen bien las causas del cáncer de mama. Aun así se tienen varios métodos de diagnóstico (referencia el libro).

Los pacientes que se presentan con cáncer de mama localmente avanzado generalmente tienen una enfermedad que es más o menos obvia, con masas fácilmente palpables en el seno y/o la axila; sin embargo, estudios de imagen pueden ser útiles en diagnosticar el estado del tumor. A parte de que proveen una línea base para suponer en cual será la respuesta del tumor a varias maniobras terapéuticas<sup>42</sup>.

En general, podría describirse un sistema de diagnóstico como sigue: Biopsia de aguja al núcleo para el estudio histológico y el estado de los receptores de estrógenos, progesterona y el estado de expresión del gen HER-2, así como de otros marcadores como la resistencia apoptótica y proliferativa. La mastografía/ultrasonido del seno (resonancia magnética nuclear [RMN] y tomografía de electrón positron [TEP] pueden ser útiles). Rayos-x del seno o tomografía computarizada del hueso del pecho, así como del abdomen. Estudios de química sanguínea, cuenta completa de sangre, etc....<sup>42</sup>.

Los métodos usados para detectar el cáncer en sus etapas tempranas son la mamografía, y el auto examen de seno.

### **VIII.1 MASTOGRAFÍA**

El papel de esta técnica es evaluar a mujeres que no presentan síntomas para así poder detectar cáncer de seno en un tamaño todavía pequeño y en una etapa todavía más temprana a la que presentan los que se encuentran con el auto examen del seno. Las mastografías son indicadas para

mujeres que han sufrido tratamientos quirúrgicos en el seno como reducción o aumento. El resultado de una mastografía es un mamograma que es una radiografía del tejido suave del seno. Los mamogramas no son indicados para mujeres menores a 20 años, porque sus senos son sensibles a los cambios mutagénicos que causan las radiaciones ionizantes, y porque la probabilidad de encontrar información útil es nula, debido a la densidad radiográfica de sus senos. Es útil para detectar lesiones ocultas, existen dos tipos principales de mastografías, las de exploración y las de diagnóstico<sup>42</sup>.

### **VIII.2 ULTRASONIDO O SONOGRAFÍA:**

El uso de las ondas de sonido para obtener una imagen del seno a evolucionado rápidamente, con el desarrollo de transductores de alta frecuencia es ahora una parte importante del diagnóstico junto con el auto examen y la mastografía. El ultrasonido es capaz de distinguir entre masas sólidas y quistes. El examen es no invasivo y no implica exposición a radiaciones, es posible detectar lesiones de sólo unos pocos milímetros de diámetro, pero también es posible confundir cáncer con fibroadenomas. Es malo para detectar microcalcificaciones, consume tiempo y no se puede estar seguro de estar examinando el seno entero<sup>42</sup>.

**VIII.3 TOMOGRAFÍA COMPUTARIZADA DEL SENO (CT):** Esta técnica puede detectar cánceres que no son detectables por otras técnicas y es útil en la clasificación y evaluación de la lesión en situaciones especiales. Tumores del tamaño de 2mm de diámetro se pueden detectar con esta técnica. Pero tiene sus limitaciones como la exposición a la radiación en esta técnica es muy alta e incluye radiación innecesaria a otras partes del tórax, se necesita un medio de contraste intravenoso para incrementar los resultados, las microcalcificaciones no se pueden ver, y es una técnica cara<sup>42</sup>.

**VIII.4 RESONANCIA NUCLEAR MAGNÉTICA (RNM):** Con esta técnica los quistes son fácilmente distinguibles de tumores sólidos, y masas del tamaño de 2mm se pueden detectar, frecuentemente se puede distinguir entre cáncer y

lesiones benignas, puede detectar cánceres ocultos en senos de alta densidad, pero las microcalcificaciones no se pueden ver bien y las características morfológicas de los tumores no se pueden distinguir fácilmente de las lesiones benignas sin la ayuda intravenosa, no puede distinguir entre malignidad cicatrices inmaduras, es tecnología de punta no fácilmente adquirible y cara<sup>42</sup>.

**VIII.5 ESCINTIGRAFÍA:** Obtener imágenes del seno mediante un radio farmacéutico ha tenido una amplia investigación <sup>99</sup>Tc sestamibi es un catión lipofílico ampliamente usado, el agente es administrado vía intravenosa y con una cámara gama se obtienen imágenes planas. Se cree que el mecanismo está relacionado con un incremento en los potenciales de membrana mitocondrial, el potencial de esta técnica está en detectar cáncer oculto, aunque todavía no se conoce por completo el potencial de esta técnica<sup>42</sup>.

**VIII.6 BIOPSIA:** Pretende la remoción del tejido vivo para diagnóstico histológico. El diagnóstico histológico se basa en la estructura y características celulares de los tejidos. La precisión de la biopsia depende en obtener una muestra representativa del tejido. Un error de muestreo termina en un diagnóstico incorrecto y el cáncer no siempre puede ser excluido, a menos, que todo el tejido patológico se remueva y examine. Existen 3 técnicas de biopsia para obtener tejido para evaluación histológica, biopsia de piel, biopsia percutánea de aguja al núcleo y biopsia de cirugía abierta. Todas se realizan bajo anestesia local, aunque algunas veces es necesario anestesia general<sup>42</sup>.

**VIII.7 EVALUACIÓN DE SÍNTOMAS CLÍNICOS COMUNES:** Cualquier masa palpable o nódulo dominante encontrado en una exploración física debe tener un diagnóstico definitivo.

Lactancia inapropiada requiere una evaluación endocrina o farmacéutica. Cambios cutáneos en el pezón como dermatitis, ulceración, o goteo en la superficie con o sin otras anomalías en el auto examen o en las mastografías, lleva practicar una biopsia en la piel anormal.

Edema con tonos rojizos en la piel del seno podría representar carcinoma inflamatorio.

El diagnóstico temprano es más evidente por el tamaño y estado del tumor que por la duración de los síntomas. El intervalo de los síntomas no siempre correlaciona bien con el diagnóstico. Los síntomas se presentan tarde en la historia natural del cáncer de mama, y el intervalo de los síntomas en el desarrollo de la enfermedad es una pequeña parte de todo el curso de la enfermedad.

## **IX. FACTORES PRONÓSTICO EN CÁNCER DE MAMA:**

Genes como BRCA1 y BRCA2 se están investigando a través de estudios genealógicos en familias (dichos genes se consideran biomarcadores). Estos genes de susceptibilidad son considerados “polimórficos” porque secuencias particulares de ADN varían entre individuos, y cada variante tiene una frecuencia de al menos 1% en la población. Debido a que la exposición ambiental, que causa la mayoría de los cánceres, debe ser metabolizada y porque este metabolismo está bajo control genético, polimorfismos en genes metabólicos críticos podría explicar porque algunas mujeres desarrollan cáncer de seno cuando se exponen a agentes ambientales particulares, como terapia de reemplazo hormonal o anticonceptivos orales. Aunque la lista de genes polimórficos candidatos para cáncer de seno continua creciendo, los estudios hasta la fecha clasifican los polimorfismos en dos grupos principales: genes hormona-esteroide metabolizadores o genes carcinogeno metabolizadores. Polimorfismos en el gen del receptor de estrógenos(ER) o genes esteroide hormona-metabolizadores podrían afectar en el tejido la disponibilidad relativa de estrógenos y otros esteroides que afectan la proliferación celular o daño en el ADN en el seno<sup>16</sup>. Los estudios sobre polimorfismos son cuestionables en su plausibilidad, la importancia funcional de la mayoría de ellos todavía no ha sido determinada, estos estudios requieren de cantidades grandes de muestras y deben estar diseñados para evitar variaciones en las frecuencias polimórficas debido a la estratificación de la población<sup>17</sup>.

Conceptualmente el cáncer de mama se desarrolla a través de un número de etapas; progresa de epitelio de seno normal a hiperplasia benigna, a carcinoma *in situ*, a carcinoma invasivo, se piensa que la hiperplasia atípica ductal y el CLIS son precursores de riesgo<sup>18</sup>, los datos obtenidos indican que no todos los CDIS u otros carcinomas *in situ* progresan a carcinomas invasivos y no todos los carcinomas invasivos se detectan con evidencia de carcinoma *in situ*<sup>19</sup>. Estas y nuevas aproximaciones podrían ayudar a identificar marcadores moleculares y otros factores que podrían ser usados para distinguir lesiones de cáncer de seno que permanecerán como benignas (y, por lo tanto, sólo bajo observación) de aquellas malignas que requieran intervención.

Los factores críticos para descifrar la biología de la enfermedad son un repaso de la histopatología del tumor, el estado (en el caso de metástasis los sitios y el volumen) del tumor, el tiempo de la enfermedad, el estado de los receptores esteroidales y otros factores de pronóstico.

Aunque el cáncer de mama es uno de los más estudiados epidemiológicamente hablando, todavía mucho permanece desconocido y, a pesar del gran número de factores de riesgo, sólo el 55% de los casos puede ser explicado por estos factores. Afortunadamente, más estudios epidemiológicos están integrando la evaluación de estos factores con marcadores bioquímicos, los cuales podrían ayudar al entendimiento de los mecanismos biológicos. Se tiene la esperanza de que este conocimiento lleve a entender las causas de la enfermedad y a un mejor tratamiento preventivo.

## **X. TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE MAMA:**

La terapia de radiación a sido usada para el tratamiento del cáncer de seno por cerca de un siglo. Poco después del descubrimiento de los rayos-x por Roentgen en 1895 y el radio por Curie en 1898, los investigadores empezaron a usar radiación para el tratamiento del cáncer de seno local recurrente y avanzado<sup>20</sup>.

La radiación es usada para tratar todas las etapas del cáncer de seno. La radiación del seno después de la terapia de conservación del seno para el estado temprano invasivo y el carcinoma ductal *in situ*, constituye la mayor parte del tratamiento del cáncer de seno en la mayoría de las prácticas de radiación oncológicas.

El uso de la radiación después de la mastectomía es controversial pero nuevos datos indican beneficios clínicos. Para el cáncer de seno localmente avanzado, una terapia multimodal (necesaria para el manejo) frecuentemente incluye radiación en combinación con quimioterapia y cirugía. El inicio de la radiación podría retardarse en aquellos casos donde primero se dió quimioterapia.

Para mujeres con un cáncer más avanzado que requiere mastectomía, ha habido considerable controversia con respecto al grado de beneficio derivado de la terapia de radiación después de la cirugía.

Por último, la radiación paliativa puede proveer alivio que se necesita cuando la enfermedad en metástasis causa dolor o disfunción.

La terapia de conservación del seno, una vez controversial, ha demostrado que es una alternativa a la mastectomía, para el tratamiento de etapas tempranas de cáncer de seno.

El papel de la cirugía en el tratamiento del cáncer de seno ha sido muy discutido, pocos de los pacientes se curan sólo con cirugía, la falla de la intervención quirúrgica para controlar los tumores locales y distantes, lleva al uso de la terapia de radiación como el tratamiento local inicial. Posteriormente, la cirugía se convirtió en una parte esencial de una terapia con un enfoque multimodal.

Muchos investigadores apuestan por la cirugía auxiliada por la disección de los nodos linfáticos de la axila seguida de quimioterapia.

Aunque muchos pacientes han sido tratados con mastectomía, la terapia de conservación del seno está en uso creciente en el subgrupo de pacientes que responden bien a la quimioterapia.

La habilidad de atacar al cáncer de seno primario con quimioterapia ha sido demostrada en muchos estudios<sup>29</sup>. Los principios esenciales de la quimioterapia han cambiado muy poco desde el desarrollo de los principios activos. Asumiendo que la mayoría de los agentes quimioterapéuticos trabajan por una cinética de primer orden, esto es eliminando una fracción fija en vez de un número fijo de células con cada tratamiento, el éxito del tratamiento entonces depende del balance entre la masa inicial del tumor, fracción de células eliminadas por ciclo (eficacia del fármaco) y el crecimiento de nuevas células tumorales entre tratamientos. Si la resistencia es parcial en vez de completa, incrementando la dosis de fármaco, tal vez se incremente el porcentaje de células muertas, por lo tanto, los resultados clínicos. La terapia en combinación rápidamente fue aceptada como una solución potencial al problema de la resistencia a los fármacos. Asumiendo que la resistencia al tratamiento es fármaco específica y que diferentes células en el mismo tumor pueden tener diferentes patrones de resistencia, el uso de terapia combinada debería incrementar la fracción de células muertas por tratamiento.

Aunque el tratamiento está comúnmente basado en un número de fármacos relativamente pequeño, estos fármacos pueden ser usados en un número infinito de combinaciones e iteraciones.

Como la quimioterapia tiene toxicidad, el arte de la medicina involucra el balance entre riesgo y beneficio para los pacientes individuales. Aunque no se aplican reglas inflexibles, existe un grupo de pacientes que probablemente no se beneficiaría con esto. Los factores que deben tomarse en cuenta para la selección de pacientes que recibirán esta terapia incluyen patología, edad, las opciones del médico y las preferencias del paciente.

Quimioterapia basada en antraciclinas tiene barreras potenciales para no usarse ya que causan la común caída del cabello, y la cardiomiopatía congestiva no tan común.

Múltiples agentes quimioterapéuticos han sido usados con éxito en el tratamiento del cáncer de seno.

a)Antibióticos antitumorales: doxorubicina es la antraciclina más ampliamente usada en los Estados Unidos. Aunque el mecanismo de acción completo todavía es tema de controversia, la intercalación con el ADN y la inhibición de la topoisomerasa II parecen ser críticos. Epirubicina (4-epioxorubicina) es un derivado l-arabino semisintético de la doxorubicina en el cual la amino azúcar daunosamina es remplazada con acosamina.

El Mitomicin-C es un antibiótico antitumoral con actividad alquilante resultando en cadenas de ADN cruzadas y en la formación de un aducto.

Antimetabolitos: El 5-FU es uno de los primeros agentes activos disponibles para el tratamiento del cáncer de seno. El Methotrexato es frecuentemente usado en combinación con otros fármacos. La gencitabina (2,2-difluorodesoxicidina) es un análogo nucleótido con actividad antitumoral específica del ciclo celular. El mecanismo de acción incluye inhibición de la ribonucleótido reductasa y competencia con la desoxicidina para la incorporación en el ADN como base fraudulenta.

b)Inhibidores de microtúbulos (taxanos): Los alcaloides de la vinca forman una familia de fármacos derivados de la planta periwinkle que inhiben la síntesis de microtubulos, vinblastina, vincritina, paclitaxel, y dosetaxel inhiben a la tubulina que es la proteína que forma los microtúbulos, aparte son antiangiogénicos en modelos *in vivo* e *in Vitro*, inhibiendo la proliferación endotelial a niveles significativamente por debajo de los requeridos para la muerte de las células tumorales.

c)Agentes alquilantes: Fueron los primeros agentes usados en el tratamiento contra el cáncer de seno en metástasis, agregan grupos alquilo a grupos químicamente nucleofilicos y ricos en electrones, formando aductos con el ADN que alteran su estructura y función, la actividad de estos agentes alquilantes es dependiente del ciclo celular, pero no específica del ciclo celular.

d)Compuestos de platino: cisplatino y carboplatino, funcionan como agentes alquilantes, formando aductos con el ADN que alteran su estructura y función.

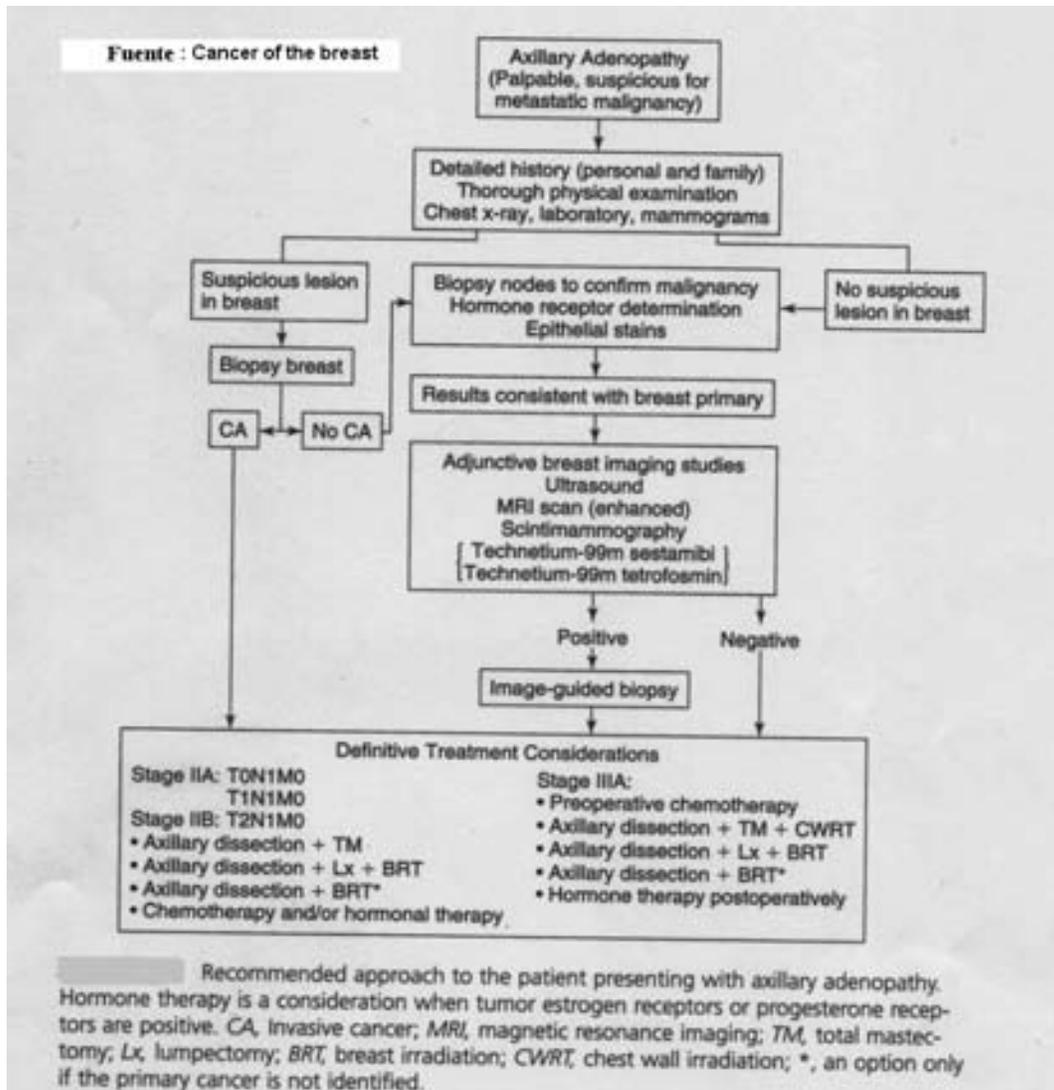
La terapia combinada frecuentemente involucra tres o más fármacos y, generalmente, resulta en una respuesta que está en un rango del 30 al 60%.

e)Terapia quimihormonal: Para pacientes con cáncer en metástasis con receptor de estrógenos positivo, es un tratamiento viable.

El desarrollo y funcionamiento normal de la glándula mamaria depende de la acción coordinada de varias hormonas: prolactina, estrógenos, progesterona, corticoesteroides, insulina, hormona del crecimiento y hormona tiroidea. El crecimiento de los ductos es provocado por los estrógenos. El desarrollo lóbulo alveolar es provocado por prolactina y progesterona; la lactancia por prolactina. Por mucho, las hormonas más importantes involucradas en la fisiología mamaria y, presumiblemente, en la patología mamaria, son el estrógeno y la prolactina. El estrógeno es un mitógeno mamario potente, de hecho, todas las formas de tratamiento endócrino para el cáncer de seno están dirigidas hacia la inhibición o interfieren con la actividad del estrógeno. Esta terapia está avanzando con la introducción de nuevos moduladores de receptores de estrógenos más selectivos, como faslodex, toremifen y raloxifen.

Se puede observar un tratamiento general recomendado a seguir (Figura 14):

.



**Figura 14:** Propuesta recomendada para el paciente que presenta adenopatía axilar (tomada de la referencia<sup>42</sup> ).

## **XI. SISTEMAS MODELO PARA EL ESTUDIO DEL CÁNCER DE MAMA:**

Hoy en día existen modelos de investigación con los que se pueden hacer aproximaciones para el estudio de cáncer de mama, por ejemplo para estudiar los tumores inducidos por carcinógenos. Entre los varios modelos que se han desarrollado podemos mencionar los tumores inducidos por metilnitrosourea (MNU) y dimetilbenz(a)antraceno (DMBA) en ratas, que son hormono-respondedores y expresan receptores de estrógenos. En ratones tanto el MNU como el DMBA inducen carcinomas mamarios en animales tratados con progestágenos aunque los tumores inducidos no son hormono-respondedores.

Estudios de tumores asociados a virus oncogénicos. Las cepas endocriadas de ratones como C3H, poseen alta incidencia de tumores mamarios, debido esencialmente a la presencia del retrovirus MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus). El poliomavirus se ha utilizado para el desarrollo de carcinomas mamarios ductales en ratones adultos inmunosuprimidos o en neonatos normales.

Se han usado implantes tumorales humanos en animales de laboratorio. Para estos estudios se utilizan ratones atípicos o "nude" (nu/nu), para prevenir el rechazo de los tejidos tumorales humanos o de líneas celulares derivadas de tumores. Las condiciones de cría y cuidado de estos animales son extremadamente costosos.

También, se usan ratones genéticamente modificados. La investigación con animales transgénicos o knock-out (organismos con una supresión específica de un gen) permite una integración completa del órgano en estudio y sus distintos tipos celulares con el status hormonal y fisiológico del animal. Podemos citar, entre otros, a ratones modificados en los oncogenes c-myc, v-Ha-ras, c-neu, wnt-1, los genes supresores de tumores p53, BRCA 1 y BRCA 2, y genes de la maquinaria celular como el gen de la ciclina D1. Para lograr especificidad tisular, algunos genes se encuentran bajo el control del promotor

de MMTV. Es un excelente modelo *in vivo*, pero en muchos casos surgen tumores en otros tejidos, no se desarrollaron tumores de mama, o los tumores generados resultaron morfológicamente distintos a los tumores de mama humanos.

Para un estudio más práctico se utilizan líneas celulares. Las líneas celulares son valiosos modelos a la hora de analizar ciertos aspectos de la biología celular del cáncer de mama. Sin embargo, células transformadas aisladas creciendo en un frasco de cultivo están sometidas a estímulos distintos a los de células *in vivo*. Esto debe ser tenido en cuenta a la hora de la interpretación de los resultados y al extraer conclusiones. Carecen, entre otros factores, de una verdadera interacción epitelio, estroma y matriz, estructura tisular, respuesta inmune del huésped, exposición a hormonas y a factores ambientales, etc.; y, por lo tanto, pueden diferir del tumor que les dio origen. No obstante, la homogeneidad, reproducibilidad y manipulación de las condiciones de cultivo hacen de las líneas celulares buenas herramientas de investigación.

Desde que Lasfargues desarrollara la primera línea celular humana de cáncer de mama en 1958, se han establecido muchas líneas celulares. Una de las líneas celulares de cáncer de mama que se utilizará en este estudio es la MCF-7, desarrollada en 1973 a partir de un derrame pleural de un carcinoma de mama humano<sup>39</sup>. Además de la MCF-7, existen otras líneas celulares utilizadas.

Un problema vinculado a la investigación con las líneas celulares humanas inoculadas en ratones inmunosuprimidos es que no desarrollan metástasis, a diferencia de los xenotransplantes de tumores humanos. Se han establecido pocas líneas celulares de ratón, la mayoría de las cuales no expresan receptor a estrógenos y receptor a progesterona. Entre ellas, podemos citar a la línea BALB/c-MC y MG1361.

## **XII. LA PROTEÓMICA EN EL ESTUDIO DE CÁNCER DE MAMA:**

La culminación de la secuencia del proyecto genoma humano, así como las nuevas tecnologías disponibles en los campos de la genómica, la Proteómica, y la genómica funcional, prometen tener un mayor impacto clínico en la práctica, mientras se desarrollan se acercan a cambiar la forma en que las enfermedades se diagnosticarán, monitorearán y tratarán en un futuro cercano. Nos movemos cada vez más del estudio de moléculas individuales al análisis de sistemas biológicos complejos. Uno de los principales retos es como podemos aplicar mejor las nuevas tecnologías para que tengan un impacto clínico relevante en un marco clínico y patológico bien definido.

El análisis de expresión de genes se ha convertido en una herramienta prometedora en la predicción clínica del curso de una enfermedad maligna y su respuesta a la terapia antineoplásica, pero sorprendentemente muy poco se conoce acerca del patrón de expresión proteico de tumores humanos. Los recientes avances en el análisis proteómico permiten identificar las proteínas de interés por su patrón de expresión y/o modificación en electroforesis de dos dimensiones.

Tras la apabullante presencia de la genética en la vanguardia de la medicina, la proteómica, es decir, los productos de los genes, recupera ahora el protagonismo perdido. Sus servicios empiezan a ser muy valiosos en diversas áreas, como en la anatomía patológica. La proteómica estudia las proteínas producidas por genes, ya que estas intervienen activamente en el metabolismo celular, y ya que las técnicas empleadas en esta área permiten extraer todas (o por lo menos gran parte) de las proteínas de un determinado tejido en una muestra concreta fundamentalmente en fluidos, será en el futuro de gran utilidad en el abordaje del cáncer. La oncoproteómica, es decir, el estudio de proteínas y sus interacciones en la célula cancerosa mediante el uso de tecnologías de la proteómica. El patólogo podrá identificar todas las proteínas y comparar las muestras, por ejemplo, de orina de un paciente con un cáncer de vejiga y de otro que no presenta ese tumor. Ello permitirá localizar proteínas que están presentes en una muestra y no en otra.

Por ejemplo, las células que se encuentran en la parte terminal del ducto, entre el ducto y el lóbulo, son sensibles a hormonas<sup>28</sup>. La interfaz entre

el sistema de ductos de la glándula mamaria y el origen de los lóbulos contiene las células madre que originan lóbulos lactantes. Estas células responden al estrógeno y a la progesterona, los cuales mandan señales inhibitorias del crecimiento durante los ciclos menstruales pero mandan señales que estimulan el crecimiento y la proliferación durante el embarazo. Estas células madre están predispuestas a la enfermedad (es decir a convertirse en cancerosas). Antes de la pubertad, estas células (las células madre que originan lóbulos lactantes) están quiescentes, por lo tanto, no hay peligro de formar tumor alguno. Cuando estas mismas células se exponen a los estímulos hormonales de la pubertad, su ADN se duplica para permitir la proliferación celular; sin embargo, el control de la duplicación del ADN no es correcta porque el gen mutado es defectuoso.

Esto puede explicar las múltiples lesiones primarias en mujeres que heredan un gen mutado. Dicha situación se alcanza por alteraciones en protooncogenes y en genes supresores de tumores que, probablemente, fueron heredados (mutaciones de una línea germinal), aunque se pueden dar en un paciente que no los heredó, como consecuencia de mutaciones somáticas ó de accidentes mutagénicos durante la meiosis de la línea celular germinal.

Dos clases de susceptibilidades genéticas heredables deben ser consideradas en la etiología del cáncer de seno. La primera es una clase de alteraciones genéticas que confieren un grado de riesgo relativamente bajo de cáncer de seno, aunque estas mutaciones están presentes en gran parte de la población.

La segunda clase incluye genes que confieren un alto grado de riesgo de cáncer de seno, pero dichas variantes en estos genes son raras en el general de la población<sup>30</sup>. Estos genes incluyen BRCA1 y BRCA2 (breast-cancer1y2), p53, PTEN, ATM (ataxia telangectasia), y Rad51. Todos estos genes codifican para una proteína, aunque la función exacta de la mayoría de estas proteínas todavía tiene que establecerse completamente, se sabe que la asociación de las proteínas BRCA1 y BRCA2 con la proteína Rad51 enlaza estas proteínas con el control y la estabilidad genómica, porque Rad51 se requiere para la

recombinación mitótica y meiotica, y para reparar las rupturas en la doble hélice del ADN<sup>31,32</sup>.

El gen p53 codifica para una proteína de 53KDa (en 393 aminoácidos) que puede ser dividida estructural y funcionalmente en 4 dominios<sup>35</sup>. Estos son, activación transcripcional, represión transcripcional, y dominios de enlace al ADN y el ARN, esta proteína se activa cuando el ADN se daña, después de una exposición a radiación o luz ultravioleta, o por daño químico, la activación de p53 da como resultado supresión de crecimiento a través de detener el ciclo celular o inducir la apoptosis<sup>36</sup>.

La familia de factores de crecimiento epidérmico (FCE) está compuesta de los factores de crecimiento y sus receptores, estos son un grupo de cuatro tirosincinasas transmembranales. Los FCE estimulan el progreso del ciclo celular en dirección del crecimiento de las células del epitelio del seno<sup>33,34</sup>.

Hasta ahora , uno de los parámetros que sirve como biomarcador terapéutico (para decidir que tratamiento aplicar) para cáncer de seno es si el tumor resulta positivo (RE+) o negativo (RE-) para el receptor de estrógenos, o bien, positivo (RP+) o negativo (RP-) para el receptor de progesterona. Cerca del 50% de los tumores de seno RE+ son también RP+. Estos tumores doblemente positivos a receptores hormonales, tienen cerca de un 75% de respuesta a terapias endocrinas, mientras menos de un tercio de los tumores RE+RP- responden a estas terapias. La proteína antiapoptotica Bcl-2 está más comúnmente expresada en células humanas cancerosas del seno con RE+.

Por todo lo anterior se están abordando técnicas de investigación que utilizan la proteómica como medio para la búsqueda de nuevos biomarcadores que permitan un diagnóstico más temprano y preciso de la enfermedad, así como para encontrar posibles blancos susceptibles para ser atacados con medicamentos, y encontrar posibles proteínas asociadas con la resistencia a medicamentos<sup>40,41</sup>.

## **OBJETIVO GENERAL**

Realizar un estudio de los perfiles de expresión de proteínas en líneas celulares de cáncer con el fin de encontrar proteínas que pudieran ser consideradas biomarcadores de cáncer de mama.

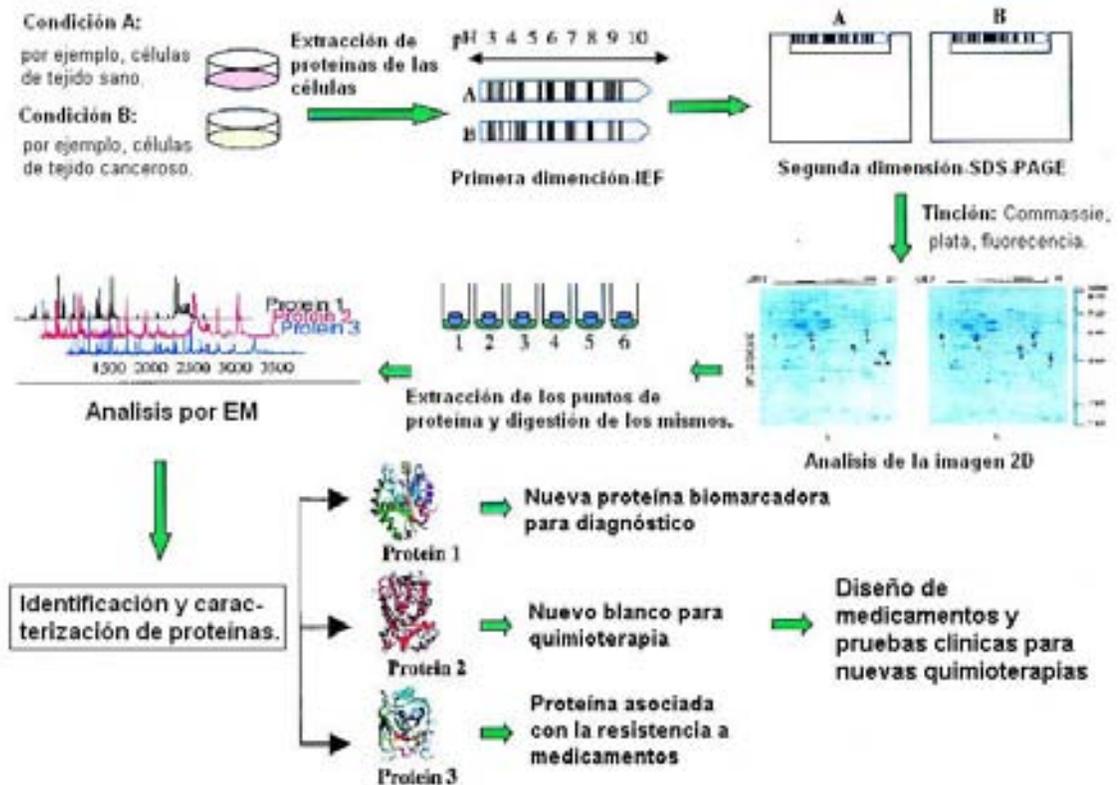
## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a) Establecer un protocolo para la extracción de proteínas totales y membranales en líneas celulares de cáncer de mama.
- b) Establecer un protocolo para la separación de proteínas totales y membranales en líneas celulares de cáncer de mama.
- c) Obtener el perfil proteico de muestras de proteínas totales y membranales en líneas celulares de cáncer de mama.
- d) Identificar por análisis de espectrometría de masas las proteínas seleccionadas.

## **HIPÓTESIS**

Ya que las líneas celulares derivadas de tumores humanos han sido utilizadas como modelos para el estudio de cáncer de mama, el análisis de su proteoma membranal y total, a partir de células en cultivo permitirá detectar proteínas que aún no han sido identificadas, o cuya expresión en estos cultivos sea novedosa, de manera que podrían servir como marcadores biológicos de cáncer de mama.

**DIAGRAMA DEL PROCESO COMPLETO QUE SE UTILIZA EN ESTE TRABAJO**



Wu W, Hu W, Kavanagh J. Proteomics in cancer research. *Int. Gynecol Cancer* 2002;12:409-423.

Figura 15: Estrategia experimental para el abordaje en proteómica para la investigación en cáncer.

**DISEÑO EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍA**

**I. MATERIAL BIOLÓGICO.**

Las células MCF-7 son descendientes de una cepa primaria de tejido de glándula mamaria, tejido de epitelio de una mujer caucásica de 69 años de edad la cual murió por un adenocarcinoma, y que expresó el receptor de estrógenos (Figura 16).

Las células MCF-7 crecieron en un medio mínimo esencial el cual contiene 2 mM de l-glutamina, 1.5 g/l de bicarbonato de sodio, 0.1mM de aminoácidos no esenciales, 1mM de piruvato de sodio y 10% de suero fetal bovino. Las incubamos a 37°C y al 5% de CO<sub>2</sub>, cada tercer día se realiza un cambio de medio. Para despegarlas de la caja de petri y propagarlas procedimos así cuando la caja tuvo una confluencia de 90%: Se lava con PBS, posteriormente se utiliza tripsina.



**Figura 16.** Microfotografía de células MCF-7 en una caja de cultivo. Microscopio invertido marca Zeiss modelo Axiovert 40 CFL. Aumento 10x y 20x.

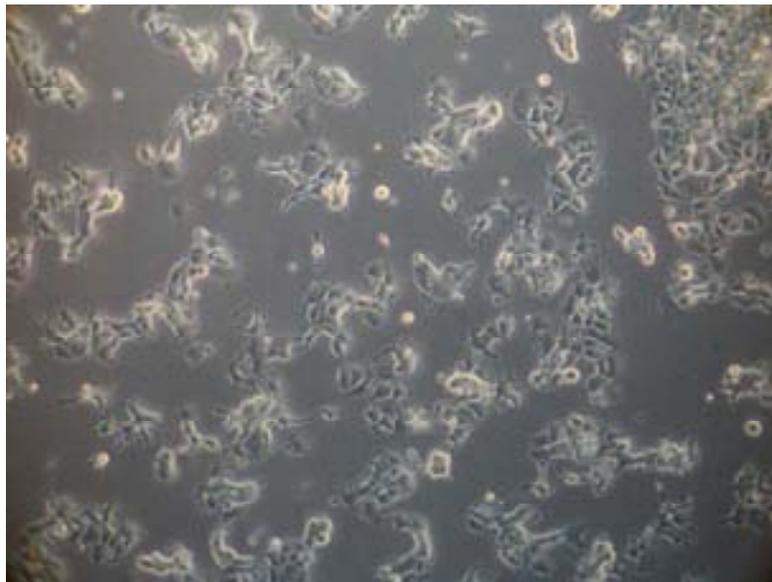
Las células Hs578Bst provienen de tejido normal de la glandula mamaria de una mujer caucasica de 74 años, estas células provienen de tejido periférico a un carcinoma ductal infiltrante, probablemente provenientes de mioepitelio. Presentaron receptores a factor de crecimiento epidérmico pero no presentaron receptores a estrógenos (Figura 17).



**Figura 17:** Microfotografía de células Hs578Bst en una caja de cultivo. Microscopio invertido marca Zeiss modelo Axiovert 40 CFL. Aumento 10x y 20x.

Se puede apreciar en la figura 17 que las células tienen una morfología tipo fibroblasto.

Las células Hs578T provienen del tejido de la glandula mamaria de una mujer caucasica de 74 años (la misma mujer de la cual provienen las células Hs578Bst), estas células provienen del tejido del carcinoma. No presentaron receptores de estrógeno (Figura 18).



**Figura 18:** Microfotografía de células Hs578T en una caja de cultivo. Microscopio invertido marca Zeiss modelo Axiovert 40 CFL. Aumento 10x y 20x.

Se puede apreciar en la figura 18 que las células tienen una morfología tipo epitelial.

## II. RUPTURA CELULAR

Después se agregó PBS y se rasparon las células de las cajas petri para colectarlas en un solo tubo falcon de 15ml. Se centrifuga a 1500r.p.m. por 15-20 minutos a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se repiten estos pasos 2 ó 3 veces para lavar las células. Después del último lavado, se decantó el líquido del tubo y se colocó sobre un pedazo de papel absorbente para quitar el exceso de PBS de la pastilla. Se añade amortiguador de lisis con inhibidor de proteasas 10µl de inhibidor por cada mililitro de disolución, (ver tabla 2).

**Tabla 2:** Amortiguador de extracción para la ruptura celular

Reactivo	Cantidad	Conc. Final
Urea	5.4g	9M
CHAPS	0.4g	4%
amort. IPG *	50µL	
DTT	0.077g	50mM
AguamiliQ	c.b.p. 10ml	

\* *anfólitos de ph3-10(GE Healthcare)*

En el caso de ruptura celular para extraer proteínas de membrana, el medio de lisis es la disolución hipotónica (ver tabla 3).

**Tabla 3:** Disolución hipotónica para la ruptura celular

<b>DISOLUCIÓN HIPOTÓNICA</b>		
<b>SUSTANCIA</b>	<b>Conc. final</b>	<b>Cantidad</b>
Tris (M.W.121.14) <sup>+</sup>	20mM	0.242g
MgCl <sub>2</sub> (M.W.95.21)	10mM	0.0952g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O (M.W.147.02)	10mM	0.147g
TOTAL		100ml

<sup>+</sup>El TrisHCl, está a pH 7.4

En el caso de ruptura celular para extraer proteínas de membrana, se resuspende brevemente y se deja reposar a 4°C por 20 minutos.

Se transfirió el amortiguador de extracción (o amortiguador de lisis) al tubo, utilizando una micropipeta, en una proporción de dos volúmenes de amortiguador de lisis por cada volumen de pastilla.

Se dio un vortex suave al tubo para resuspender la pastilla. Se añadió amortiguador IPG 50µl por cada 10ml de amortiguador de extracción.

### **III. OBTENCIÓN DE UN EXTRACTO DE PROTEÍNAS.**

Se transfirió el lisado a un tubo apropiado de ultracentrífuga y se centrifuga a 100,000g, por 20 minutos a 4°C. Se colectó el sobrenadante cuidadosamente. Se observa en el fondo del tubo un líquido viscoso, que es ADN y ARN. El sobrenadante es mi extracto de proteínas. En caso de no usarse inmediatamente, la muestra de proteína (el sobrenadante) siempre se almacenó a -80°C. En caso contrario se resuspendió en el volumen mínimo necesario de disolución de rehidratación de la tira (ver tabla 4).

#### **III.1 LIMPIEZA**

Cuando fue necesario, se hizo una limpieza con ácido trifluoroacético (TCA) y acetona al 77%:

La muestra de proteína se llevó a 900µl con agua miliQ. Se agregaron 100µl de TCA al 77% en acetona fría, se mezcló lentamente y después la mezcla se incubó a -20°C durante 30 minutos. Se centrifugaron las muestras a 15000g y 4°C por 15 minutos, se descartó el sobrenadante y se lavó 3 veces (en cada lavado se centrifugó a 15000g 4°C por 7 minutos) con 400 µl de acetona fría. Posteriormente se secó a temperatura ambiente con los tubos destapados pero con una cubierta para que no les entrara polvo y Finalmente, las pastillas de proteína se resuspendieron en el volumen mínimo necesario de disolución de rehidratación de la tira (ver tabla 4).

**Tabla 4.** Disolución de rehidratación de la tira

Sustancia	Concentración final	Cantidad
Urea(FW 60.06)	8M ó 9, 9.8mM	10.5g
CHAPS	4%(w/v)	1.0g
Thiourea (FW 76.12)	2M	3.8g
Pharmalyte o amortig. IPG	2%(v7v)	500µL
DTT(FW 154.2)	40mM	154mg
Agua miliQ		Para 25mL(13.5 son requeridos)

### **III.2 OBTENCIÓN DE UN EXTRACTO DE PROTEÍNAS DE MICROSOMAS Y SOLUBLE DE CÉLULAS.**

En el caso de ruptura celular para extraer proteínas de membrana. Se transfirió el lisado a un tubo apropiado de ultracentrífuga y se centrifuga a 3000g (8000r.p.m.) por 20 minutos a 4°C, esto para remover ácidos nucleicos y componentes del citoesqueleto.

Se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a 100000g (47000r.p.m.) durante 2 horas para obtener la fracción microsomal, que es la pastilla del fondo del tubo.

La fracción soluble es el sobrenadante del tubo el cual se almacenó a -80°C hasta que se usó.

La fracción microsomal se resuspendió en el volumen mínimo necesario de disolución de rehidratación de la tira (ver tabla 4).

Los primeros resultados se obtuvieron de la cuantificación de proteína usando amortiguadores de lisis de Amersham que lo proporciona el fabricante, se investigó en la literatura sobre amortiguadores de lisis distintos, se encontraron los siguientes: El amortiguador de Richard J. Simpson<sup>27</sup>, otro propuesto en un artículo por Ludovic Canelle, y finalmente uno propuesto por Frank A. Witzmann. Esto fue para compararlos y ver cual era el mejor para nuestro caso.

De los cuatro amortiguadores que se probaron, el amortiguador de lisis que se decidió utilizar, por dar la mayor cantidad de proteína e interferir poco con la determinación espectrofotométrica, fue el propuesto por Richard J. Simpson<sup>27</sup>.

#### IV. CUANTIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA.

Se utiliza un estuche de cuantificación de proteína. Como preparación previa, se mezcla 100 partes de reactivo A por una parte de reactivo de color B, esto da como resultado la disolución de color que se usa más adelante en la cuantificación. Se realiza una curva estándar de albúmina de suero bovino como se describe en la tabla 5.

**Tabla 5.** La curva patrón para la cuantificación de proteína

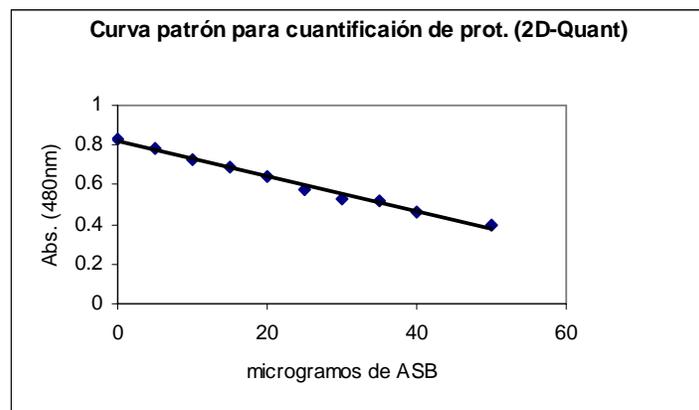
No. Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>ASB(2mg/MI)</b>	0	2.5	5	7.5	10	12.5	15	17.5	20	25
<b>Cantidad proteína ( g)</b>	0	5	10	15	20	25	30	35	40	50

Se adicionó 500 L de precipitante para cada tubo (incluyendo tubos que contienen el estándar de Albúmina de suero de bovino), se agitó e incubó 2-3 minutos a temperatura ambiente y después se adicionó 500 L de co-precipitante, se mezcló brevemente y posteriormente se centrifugó al menos 10,000g por 5 minutos.

Se quitó el sobrenadante y se centrifugó brevemente, después se removió el sobrenadante con micropipeta. Esto rápidamente para evitar la resuspensión de la muestra. El líquido remanente no fue visible.

Se agregó 100  $\mu$ L de solución de cobre y 400  $\mu$ L de agua desionizada en cada tubo, se agitó y se disolvió el precipitado de la proteína.

Se adicionó 1mL de solución de de color para cada tubo, se incubó a temperatura ambiente por 15-20 minutos, y finalmente, se leyó la absorbancia a 480nm para cada muestra.



**Gráfica 2.** Curva estándar para la cuantificación de proteína (estuche 2D-Quant GE Healthcare).

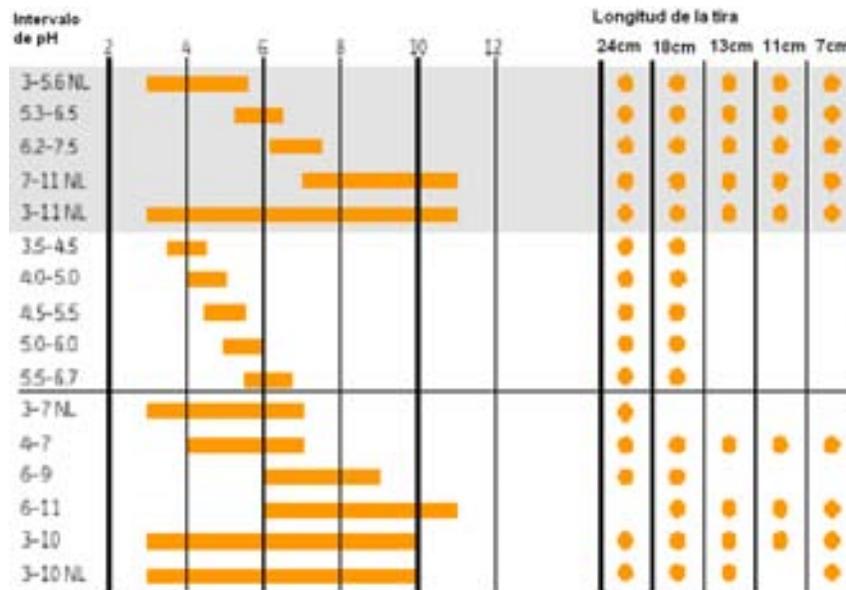
Las muestras se hicieron por triplicado y la absorbancia promedio es la que se usa, a la cual se le resta la absorbancia del amortiguador para obtener la absorbancia que se introduce a la ecuación para así calcular la cantidad de proteína. Para medir absorbancia, se utilizó el espectrofotómetro UV/Visible Ultrospec 2100 de Amersham Biosciences.

## V. ISOELECTROENFOQUE.

Se prepara una disolución con la cantidad necesaria de proteínas, ditiotretitol, amortiguador IPG, y amortiguador de equilibrio. La cantidad de disolución así como todas las cantidades depende del tamaño de tira y rango de pH que abarca la tira que se elige.

Para la elección de la tira se debe de tomar en cuenta el rango de pH :

**Figura 19.** Tiras para IEF con sus respectivos intervalos de pH



*Fuente: 2-D Electrophoresis Principles and Methods, GE Healthcare*

Una vez elegido el tamaño e intervalo de pH de la tira, se preparó la disolución (tabla 4) para rehidratarla.

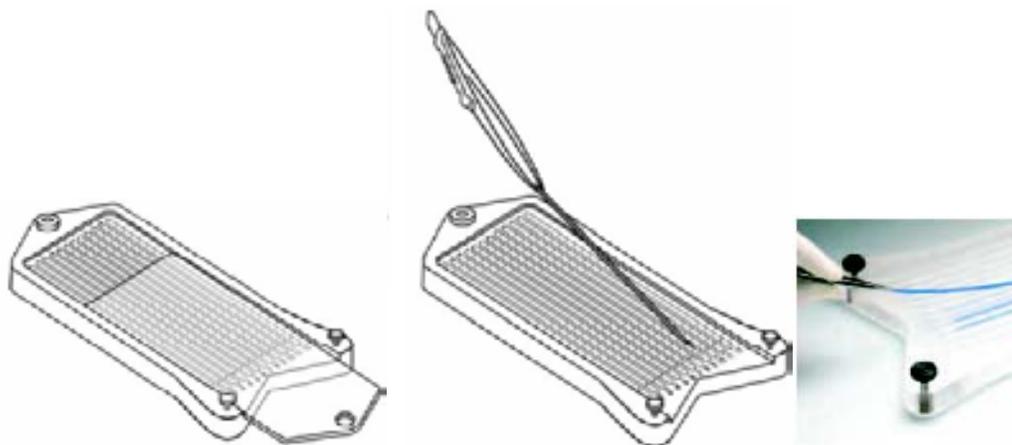
Ya que la muestra de proteína está resuspendida en esta disolución (con urea y tiourea), se toma el volumen necesario (de la disolución que contiene la proteína) para completar los  $\mu\text{g}$  de proteína necesarios en cada caso (por ejemplo  $60 \mu\text{g}$  de proteína para una tira de 7cm que se tiñó con Commassie). Este volumen se mezcla con la disolución de urea y tiourea en un volumen que no exceda del volumen que soporta la tira elegida.

**Tabla 6.** Volumen de solución de rehidratación que se le añade a las tiras de IEF

Longitud de la tira seca e inmóvil [cm]	Volumen total por tira [microlitros]
7	125
11	200
13	250
18	340
24	450

Se agregó inhibidor de proteasas en una relación de 10 $\mu$ L de inhibidor por cada mililitro de disolución.

La disolución se coloca en los carriles de la charola y a ésta se le ponen las tiras. Las tiras se dejan hidratando con el lado que contiene el gel viendo hacia la parte de abajo (Figura 20).



**Figura 20.** Fuente: 2-D Electrophoresis Principles and Methods, GE Healthcare

Se dejaron hidratando las tiras elegidas en esta disolución que se preparó, el tiempo de hidratación fue siempre de 13-20horas.

Se prepararon las tiras para el GE-IPGphor3 (aparato de isoelectroenfoque GE-Healthcare) y se aplican los Volt/hora necesarios para que se enfoquen las proteínas, generalmente de 3-8horas dependiendo de la longitud de la tira y el intervalo de pH.

El Isoelectroenfoque (IEF) es una técnica que se usa para separar proteínas de acuerdo con su punto isoeléctrico. Para ello, las proteínas se colocan en un gradiente de pH y se someten a la acción de un campo eléctrico en el que las proteínas migran, a través del gradiente de pH, hasta alcanzar su punto

isoelectrónico. La forma y el tiempo de aplicar el campo eléctrico así como el tamaño de tira y el gradiente de pH de la tira varían, según el tipo de separación deseada (ver figura 21).

**Figura 21.** Condiciones teóricas para IEF de diferentes tiras

**Tiras de 7cm**

Intervalos de pH	forma de aplicar el voltaje	voltaje (V)	tiempo [h:min]	kVh
3-11 NL	Paso 1 sostenido	300	0:30	0.2
3-10	2 Gradiente	1000	0:30	0.3
6-11	3 Gradiente	5000	1:20	4.0
	Paso 4 sostenido	5000	0:06-0:25	0.5-2.0
	Total		2:26-2:45	5.0-6.5

**Tiras de 24cm**

Intervalos de pH	Forma de aplicar el voltaje	Voltage (V)	Tiempo [h:min]	kVh
3-11 NL	Paso 1 sostenido	500	1:00	0.5
3-10	2 Gradiente*	1000	1:00 (0:00)*	0.8 (0.0)*
	3a Gradiente	8000	3:00	23.5
	Paso 4a sostenido	8000	2:30-3:45	20-30
	3b Gradiente	10000	3:00	36.5
	Paso 4b sostenido	10000	1:45-2:45	17.2-27.2
	Total			55-95

*Fuente: 2-D Electrophoresis Principles and Methods, GE Healthcare*

Para estandarizar la técnica, primero se realizó un isoelectroenfoque con una muestra de proteínas obtenidas de hígado de ratón, en el aparato EttanIPGphor3 de General Electric, el cual posee un programa que arroja una pantalla donde se muestra una gráfica de Voltaje vs Tiempo (ver figura 22), esta gráfica es la que usa el programa del aparato para ilustrar como se llevo a cabo el isoelectroenfoque. La línea azul representa la curva teórica que debe de seguir la corrida según el programa que se le indicó el tamaño de la tira y el rango de pH de la tira, la línea roja representa la curva real (experimental) que siguió la corrida.

Aunque en este caso se alejaron una de la otra, posteriormente se observó que no es indicativo de que el experimento completo saldrá deficiente, así como tampoco es indicativo de que el experimento saldrá bien si las dos curvas se empalman perfectamente.



Figura 22. EttanIPGphor3 de General Electric, gráfica de Voltage vs Tiempo.

## VI. PREPARACIÓN PARA LA ELECTROFORESIS EN SEGUNDA DIMENSIÓN.

Se sacaron las tiras del aparato y se pusieron a equilibrar (para tiras de 7cm) cada una con 5ml de una disolución de amortiguador de equilibrio con ditiotretitol por 15min. y después se pusieron a equilibrar cada una con 5ml de una disolución de amortiguador de equilibrio con yodoacetamida por 15min. En el caso de tiras de 24cm las cantidades de disolución fueron de 15ml en ambos casos.

Tabla 7. Disolución SDS amortiguador de equilibrio de tiras

Reactivo	Concentración final	Cantidad
Urea(FW 60.06)	6M	72.1g

Tris-HCl, pH 8.8	75mM	10.0mL
Glicerol(87% w/w)	29.3%(v/v)	69mL(84.2g)
SDS(FW 288.38)	2%(w/v)	4.0g
1% azul de bromofenol	0.002%(w/v)	400 L
Agua miliQ	-	p/200mL

Si no se procedía con el siguiente paso, se almacenaban a – 80°C las tiras, si se procedía se equilibraba con DTT agregando DTT 100 mg por 10 ml de disolución de equilibrio por 15 minutos, yodoacetamida 250 mg por 10 ml de disolución de equilibrio.

## VII. ELECTROFORESIS SDS-PAGE (SODIUM DODECYL SULPHATE-POLIACRILAMIDE GEL ELECTROPHORESIS).

De acuerdo al número y tamaño de tiras con las que se trabajó, fue el número y tamaño de geles que se preparó, se prepararon geles de poliacrilamida al 12%.

**Tabla 8.** Disolución para geles de poliacrilamida al 12%.

<b>Formulación para gel SDS-PAGE(12%)</b>	
<b>Disolución</b>	<b>cantidad</b>
Acrilamida	40ml
AguamiliQ	33.5ml
1.5M tris-HCl de pH8.8	25ml
SDS 10%(w/v)	1ml

PSA 10% (fresco)	500 $\mu$ L
TEMED	50 $\mu$ L
Total	100ml

Y se prepararon la o las cámaras para correr el o los geles añadiendo amortiguador Laemli a las cámaras.

**Tabla 9.** Amortiguador Laemli SDS de electroforesis (10X).

Sustancia	Concentración final	Cantidad
Tris base(FW 121.1)	250mM	303g
Glicina(FW 75.07)	1.92M	1441g
SDS(FW 288.38)	1%(w/v)	100g
Agua miliQ	-	p/10L

A los geles preparados se les pone la tira equilibrada en las disoluciones antes mencionadas cuidando de que no haya burbujas entre la tira y el gel, se agrega agarosa para “sellar” la tira con el gel de la segunda dimensión.

**Tabla 10.** Solución de agarosa para sellar

Sustancia	Concentración final	Cantidad
Buffer laemli	1x	100mL
agarosa	0.5%	0.5g
1% azul de bromofenol	0.002%(w/v)	200 L

Finalmente, al pozo que se le formo al gel cuando polimerizó, se le agrega 1 $\mu$ L de marcadores de peso molecular; Aunque no siempre fueron los mismos marcadores de peso molecular, principalmente los que se usaron fueron: marcadores Low molecular weight calibration kit for SDS electroforesis, (Amersham). La identidad de las proteínas que corresponden a estos marcadores es:

- 1- Fosforilasa (b) de músculo de conejo, de 97kDa.
- 2- Albúmina de suero de bovino de 66kDa.
- 3- Ovoalbúmina de huevo (blanco) de gallina de 45kDa.
- 4- Anhidrasa carbónica de eritrocito de bovino, de 30kDa.

5- Inhibidor de tripsina de frijol de soya, de 20.1kDa.

6-  $\alpha$ -Lactoalbúmina de leche de bovino, de 14.4kDa.

Se programó el voltaje y la corriente a la que se dejaron los geles en la cámara vigilando que no baje el nivel de amortiguador en la cámara.

### VIII. TINCIÓN DE LOS GELES CON AZUL DE COMMASSIE Y PLATA.

Se procedió con la tinción elegida para cada uno de los geles (esto depende entre otras cosas de la cantidad de proteína cargada inicialmente en la tira de isoelectroenfoco), generalmente fue la tinción con azul de Commassie.

Se fijó el gel en una solución de 10% ácido acético y 40% etanol al menos 30 min, Se decantó la solución de fijación y se colocó la solución de anfolitos (100 a 300mL) dependiendo del tamaño del gel.

**Tabla 11.**

DISOLUCIÓN COMMASSIE	
Metanol	1500ml
Agua miliQ	1500ml
Acido acético	300ml
Azul brillante R de Commassie(SigmaB-0630)	6g

Se dejó toda la noche o más; la tinción se logró más o menos intensa después de 2 días, Se enjuagó el gel en agua hasta remover los residuos del teñido. Se tomaron imágenes de los geles con el scanner (Imagescanner Amersham Biosciences GE Healthcare).

Tinción con plata; También se probó teñir con plata utilizando el paquete Silver Plus de BioRad:

Las preparaciones son adecuadas para teñir dos geles de 8 por 10cm, y de 0.75-1.0mm de grueso.

Primero la fijación : después de la electroforesis el gel se colocó en la solución fijadora (ver tabla 12) y se dejó en agitación suave durante 20 minutos.

**Tabla 12.** Disolución fijadora

Sustancia	Cantidad	Porcentajes v/v
Metanol	200ml	50%
Ácido acético	40ml	10%
Concentrado incrementador de la fijación (BioRad)	40ml	10%
AguamiliQ	120ml	30%
volumen total	400ml	100%

Posteriormente los lavados: Se decantó la disolución fijadora, se le agregó 100ml de agua miliQ y se dejó en agitación durante 10 minutos. Se decantó la disolución y se agregó 100ml de agua miliQ.

Después la tinción y revelado (se preparó 5 minutos antes de su uso) Se colocaron 35ml de agua miliQ en un matraz Erlenmeyer y se añadieron los siguientes reactivos en el orden en el que aparecen a continuación:

- a) 5.0ml de disolución de complejo de plata
- b) 5.0ml de disolución moderadora de la reducción
- c) 5.0ml del agente desarrollador de la imagen

Inmediatamente antes de su uso se agregaron 50ml de disolución aceleradora del desarrollo al matraz, se mezcló y trasvasó la disolución a los recipientes que contenían los geles. Se agitó suavemente por un tiempo hasta lograr la mejor intensidad.

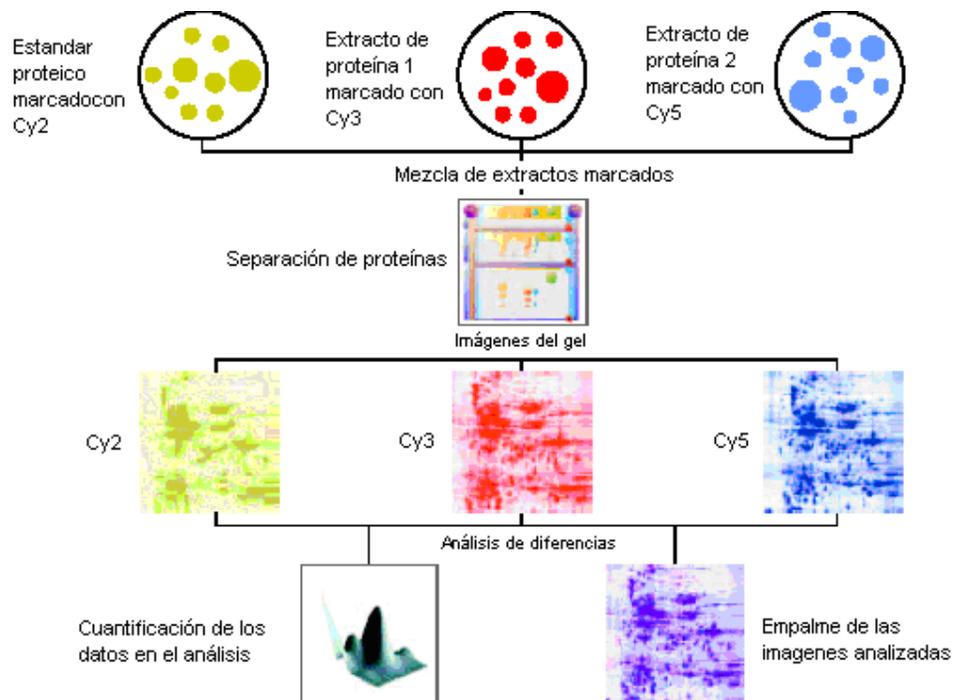
Finalmente, detención de la reacción: Se preparó 100ml de una disolución de ácido acético al 5%, para parar la reacción de teñido (5-10 minutos), después se desechó esta disolución y se agregó agua miliQ para lavar, se hicieron 3 ó 4 lavados con agua miliQ y se obtuvieron las imágenes de los geles.

## **IX. MARCAJE DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DIGE (DIFERENTIAL IN GEL ELECTROPHORESIS).**

Se utilizaron fluoróforos GE Healthcare de Amerhsham CyDye (minimal dyes) para DIGE. La electroforesis fluorescente diferencial en gel de doble dimensión(2-D) es un método para marcar proteínas con fluoróforos CyDye que son posteriormente separados usando electroforesis en gel de doble dimensión. Esta técnica permite detectar e identificar proteínas mediante la separación de hasta tres diferentes muestras de proteínas en el mismo gel de doble dimensión. Cada una de las tres muestras de proteínas etiquetada con un CyDye(flúoróforo) diferente. Después del marcaje(etiquetado) de las proteínas, las tres muestras se mezclan y juntas se corren en el mismo gel de isoelectroenfoque así como el mismo gel de electroforesis de doble dimensión con SDS (dodecilsulfato de sodio). Cada tipo de muestra de proteínas puede ser visualizada individual e independientemente de las otras, seleccionando la longitud de onda de excitación y emisión de cada CyDye cuando el gel de 2-D se pasa por el escaner de fluorescencia.

Los geles 2D-SDS-PAGE se pasaron por un escaner de fluorescencia de Ettan DIGE anfolitos de GE Healthcare.

Los fluoróforos CyDye DIGE tienen un grupo reactivo esterNHS y están diseñados para enlazarse covalentemente al grupo -amino de la lisina de las proteínas vía un enlace amida (el CyDye2 tiene la fórmula  $C_{32}H_{28}N_3O_6C_2F_3O_2$ ).



Fuente: 2D Electrophoresis principles and methods, GE Healthcare.

**Figura 23** : Proceso general del método DIGE.

Todo el procedimiento que implica manipulación de los fluoróforos se hizo en la oscuridad (con la luz apagada), esto incluye reconstituirlos mezclarlos con la proteína y todos los procedimientos que implican IEF y SDS-PAGE, así como la manipulación del gel al pasarlo por el scanner, ya que los mismos son sensibles a la luz.

Este es el procedimiento por pasos:

Antes de empezar, los fluoróforos se debieron reconstituir (preparar para ser usados), esto se hizo agregando el tubo donde estaban, 5  $\mu$ l de dimetilformamida (DMF), a cada uno de los fluoróforos.

Se tomó 1.4  $\mu$ l de cada uno de los CyDye (los fluoróforos) reconstituidos y se colocaron en un tubo cada uno.

Se agregó 50  $\mu$ g de proteína (la muestra de proteína seleccionada para cada fluoróforo) a cada uno de los tubos donde están los fluoróforos.

Se dejó reposar 30 minutos en hielo la reacción.

Se paró la reacción agregando a cada tubo 1.4 µl de lisina 10mM.

Se juntan las muestras de los tres tubos en un solo tubo y se determina el volumen total que se tiene en este tubo.

Se siguió el procedimiento para rehidratar tira y correr la primera(IEF) y segunda (SDS-PAGE) dimensiones con la excepciones de que aquí todo fue en la oscuridad, se usaron tiras de 24cm de intervalo de pH de 3-11NL lo que implica un volumen de rehidratación de 450 µl, y las muestras de proteína iban resuspendidas en amortiguador DIGE (ver Tabla 13).

**Tabla 13:** Amortiguador DIGE para lisis.

Sustancia	Cantidad	Concentración final
Urea(F.W. 60.06)	4.20g	7M
CHAPS, pH 8.5	0.4g	4%(w/v)
Tris HCl, pH 8.8	0.2ml	30Mm
Agua miliQ	c.b.p. 10ml	

Se agregan anfolitas (amortiguador IPG) e inhibidores de proteasas en las proporciones usadas consideramos para los volúmenes de este experimento, así como los volúmenes de equilibrio de las tiras previo a la doble dimensión.

## **X. OBTENCIÓN DE IMÁGENES Y ANÁLISIS DE GELES TEÑIDOS CON TINCIÓN DE AZUL DE COMMASSIE.**

Se utilizó el Image Master 2D Platinum para analizar los geles y descartar las impurezas de las proteínas verdaderas en cada uno de los geles.

## **XI. OBTENCIÓN DE IMÁGENES Y ANÁLISIS DE GELES DE PROTEÍNAS MARCADAS CON MÉTODO DIGE.**

Todo el proceso que involucra el método DIGE se lleva a cabo con la luz apagada, es decir, en la oscuridad o con luz muy tenue.

El gel se saca de la cámara donde corrió la segunda dimensión y se coloca en un vidrio de baja fluorescencia.

Para tomar simultáneamente las tres imágenes del mismo gel (una imagen por cada fluoróforo utilizado) se utiliza el escáner the Ettan DIGE system, el cual automáticamente arroja las imágenes en un formato de archivo que es compatible con el DeCyder 2-D Differential Software . Este programa se utiliza para comparar y analizar las imágenes de las proteínas marcadas con los fluoróforos en el mismo gel.

## **XII. PICADO Y DIGESTIÓN DE LAS MANCHAS DE PROTEÍNAS SELECCIONADAS DE LOS GELES.**

Se seleccionaron las proteínas de interés y se extrajeron del gel utilizando una micropipeta, se pusieron a digerir (en tubos eppendorf tapados con parafilm) en un termoblock con tripsina toda la noche (aproximadamente 12 horas) a 37°C. Después de esto se sacaron del termoblock y se llevó cada una de las muestras a un pH menor ó igual a 4, utilizando una disolución de ácido trifluoroacético al 0.1%, verificando el pH con papel Pehanon de pH 1-12. En un nuevo tubo (Eppendorf) se agregó 40µl de una disolución que contiene 0.1% de ácido trifluoroacético/50% de acetonitrilo, ésta fue la disolución de elusión.

En otro tubo se colocaron 40µl de acetonitrilo 100%.

Se utilizó una punta Zip-Tip Millipore y se aspiró la disolución de péptidos digeridos a través de la punta de 20 a 30 veces manteniendo la punta dentro del tubo. Esto para que los péptidos se queden en la columna (la punta).

Para lavar los péptidos (librar de iones la columna), se aspiró y expelió 10µl de una disolución de ácido trifluoroacético 0.1%, tres veces.

Para la elusión de péptidos, se aspiraron 50µl de la disolución de elusión (es decir, se hace pasar la disolución de elusión por la columna), de 20 a 30 veces manteniendo la punta dentro del tubo.

Finalmente los péptidos quedaron en disolución y listos para su análisis en el espectrómetro de masas.

### **XIII. ANÁLISIS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS.**

Se analizaron los péptidos con el equipo de espectrometría de masas con un sistema de ionización por electrospray y un detector de trampa lineal de iones (LTQ- Orbitrap, Termo Electrón Corporation). Los espectros de los iones específicos de cada muestra se compararon en base de datos UniProtKB (<http://www.uniprot.org>) con el algoritmo de búsqueda en base de datos SEQUEST ([www.sequest.com](http://www.sequest.com)) para la identificación de las proteínas seleccionadas.

## RESULTADOS

### I. RENDIMIENTO DE LA EXTRACCIÓN Y LIMPIEZA DE PROTEÍNA DE CÉLULAS DE CÁNCER EN CULTIVO

Inicialmente, se trabajó con células C33-A (cáncer de cérvix), sin embargo para la estandarización de las siguientes técnicas se utilizaron las líneas celulares de cáncer de mama. La concentración promedio de la extracción de proteínas de 3-6 cajas de estas líneas celulares con un 80% de confluencia se presenta en la Tabla 14.

**Tabla 14.** Concentración de los extractos de proteínas obtenidos de las líneas celulares y sus fracciones.

<b>Línea celular (fracción)</b>	<b>Promedio de la concentración de proteína (mg/ml)</b>
C33-A (extracto total)	2.23
Hs578T (extracto total)	1.17
Hs578Bst (extracto total)	2.33
MCF-7 (extracto total)	4.99
MCF-7 (fracción membranal)	3.66
MCF-7 fracción soluble (citosol)	15.65

Como se puede observar los valores de concentración se encuentran entre 1.17 hasta 4.99 mg/ml que es una concentración suficiente de proteína para la realización de la electroforesis en isoelectroenfoque en tiras de 7 cm. El volumen final de la extracción se encontró entre 60-700 microlitros.

## II. ISOELECTROENFOQUE DEL EXTRACTO DE PROTEÍNAS DE CÉLULAS EN CULTIVO.

Se realizó el IEF (isoelectroenfoque o primera dimensión), el cual se lleva a cabo con las condiciones que se describen en la metodología. Las líneas teórica y experimental no se empalman en el experimento representativo de la figura 24a.



**Figura 24a.** Curva Voltaje vs Tiempo aplicada al IEF.

En la figura 24b, las líneas teórica y experimental corrieron empalmadas pero en el gel de segunda dimensión no se ven bien enfocadas las proteínas como se puede observar en la figura 25.

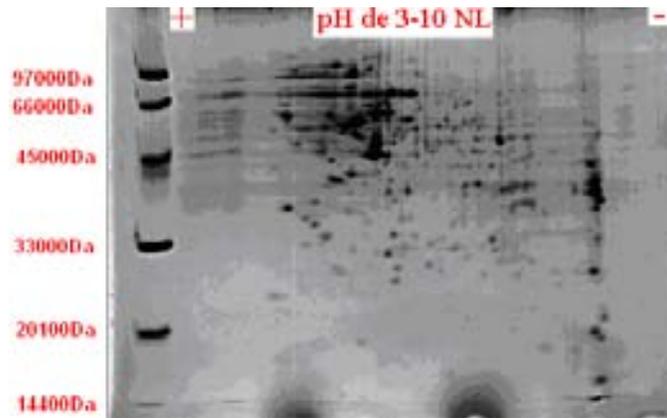


**Figura 24b.** Curva Voltaje vs Tiempo aplicada al IEF.

Esto nos indicaba que en el medio de solubilización de las proteínas se presentan impurezas que interfieren con la corrida del isoelectroenfoque como en el caso de la figura 24a. Sin embargo, se presentan casos como el de la figura 24b donde la interferencia con el isoelectroenfoque no se detecta en la gráfica. Por lo que, esta gráfica sólo se utilizó como un indicador útil de la corrida de isoelectroenfoque pero que no garantizaba que las proteínas se enfocarían correctamente.

### III. ELECTROFORESIS EN DOBLE DIMENSIÓN DEL EXTRACTO DE PROTEINA DE CÉLULAS EN CULTIVO.

A continuación (figura 25), se observa un gel teñido con commassie, a la izquierda del gel están los pesos moleculares (en daltones) de los marcadores de peso molecular.



**Figura 25 :** Gel de segunda dimensión de un extracto de proteínas de células C33-A.

Se puede observar que se está llegando a la estandarización de condiciones para obtener geles con los que se pueda trabajar, aunque, todavía existe el problema del fondo en el gel teñido con plata el cual se realizó por duplicado, y el problema de la

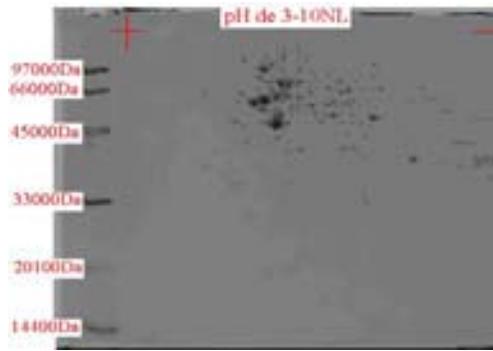
falta de enfoque de las proteínas (es decir, se observan rayas en vez de puntos) en ambas tinciones.

Se realizó el experimento de estandarización en el que se varían la cantidad de marcadores de peso molecular. Por otro lado, se modificó la concentración de las anfolitas (amortiguador IPG) para mejorar el isoelectroenfoco y la cantidad de proteínas agregadas para mejorar la resolución en el gel 2D. Sin embargo, se debe de considerar que todas las tiras contenían el mismo tipo de muestra, eran de igual tamaño así como del mismo intervalo de pH.

Fueron 4 geles en total, a) el primero con 0.6 $\mu$ l de anfolitas, 60 $\mu$ g de proteína cargada, 1 $\mu$ l de marcadores de peso molecular, y teñido con Commassie. b) el segundo con 1.2 $\mu$ l de anfolitas, 60 $\mu$ g de proteína cargada, 1 $\mu$ l de marcadores de peso molecular, y teñido con Commassie (figura 26). Los otros dos geles fueron teñidos con plata, cargando 10 $\mu$ g de proteína 0.3 $\mu$ l de marcadores de peso molecular, e igual que en los geles anteriores, a uno se le agregó 0.6 $\mu$ l de anfolitos y a el otro 1.2 $\mu$ l de anfolitas, pero los geles teñidos con plata resultaron con un fondo muy intenso que no permitía diferenciar en el gel las proteínas menos abundantes, por lo cual se abandonó la tinción con plata.

De estos geles se determinó que la cantidad adecuada de proteína para un gel que se tiñe con azul de Commassie es de 60 $\mu$ g para un gel de 7cm, la cantidad de amortiguador IPG es de 1.2 $\mu$ L, y la cantidad de marcadores de peso molecular es de 1  $\mu$ L, todo esto para geles de 7cm.

**Figuras 26.** Gel de poliacrilamida con proteína de células C33-A, con 1.2 $\mu$ l de anfolitos.



#### IV. ELECTROFORESIS EN DOBLE DIMENSIÓN DE PROTEÍNAS DE EXTRACTO TOTAL PROVENIENTES DE TRES LINEAS CELULARES DISTINTAS.

Después se trabajó con células Hs578Bst (tejido de seno sano adyacente a un tumor), células Hs578T (tumor primario de seno), y con células MCF-7 (tejido canceroso metastásico de seno). Todas las células cultivadas *in vitro*.

Se utilizaron los procedimientos mencionados en la sección de materiales y métodos para la extracción y cuantificación de proteínas totales de estas líneas celulares. Posteriormente, se hizo el isoelectroenfoque. En el isoelectroenfoque, las tres tiras con las proteínas provenientes de las tres líneas celulares se enfocaron en una sola corrida (figura 27), y los geles de doble dimensión, se obtuvo el patrón de proteínas de las figuras 28-a,b, y c.

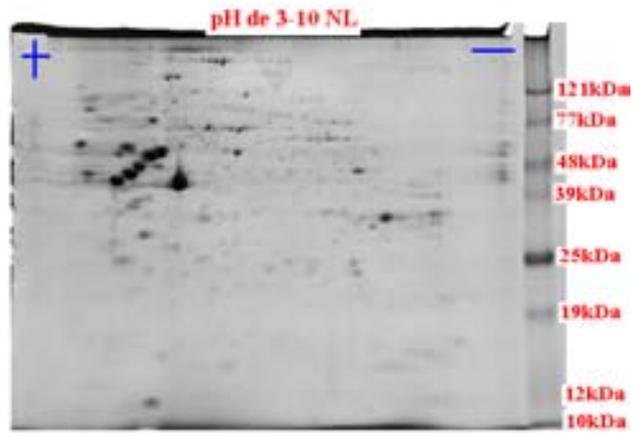


**Figura 27** : Curva Voltaje vs >Tiempo del IEF de las proteínas del extracto total de células MCF-7, Hs578T, y Hs578Bst.

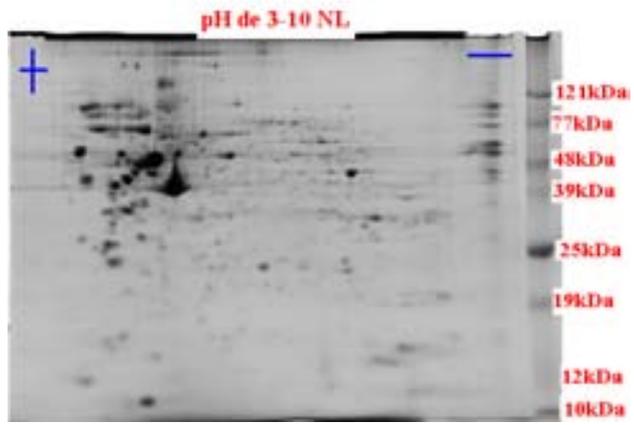
A simple vista, se puede observar un patrón de manchas de proteínas en los geles que contienen las proteínas provenientes de las líneas celulares Hs578Bst y Hs578T, diferenciándose únicamente en los niveles de expresión (intensidad de las manchas) de algunas proteínas. Sin embargo, en el gel que contiene las proteínas provenientes de la línea celular MCF-7, si se puede apreciar claramente cambios en el proteoma. Estos tres proteomas (figuras 28a-c), contienen proteínas de extracto total de sus respectivas líneas celulares.

A pesar de que el intervalo de pH de estos geles no es lineal (en la parte superior del gel se indica NL que significa no lineal), en la zona que corresponde al intervalo de pH de aproximadamente 3.5 a 5, se puede ver la mayor concentración de las proteínas más abundantes. Aparentemente dichas proteínas se empalman en algunas zonas del gel, esto llevó a “ampliar” este intervalo de pH.

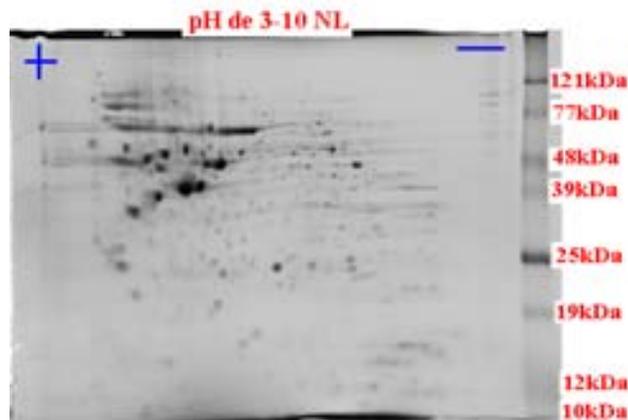
**a**



***b***

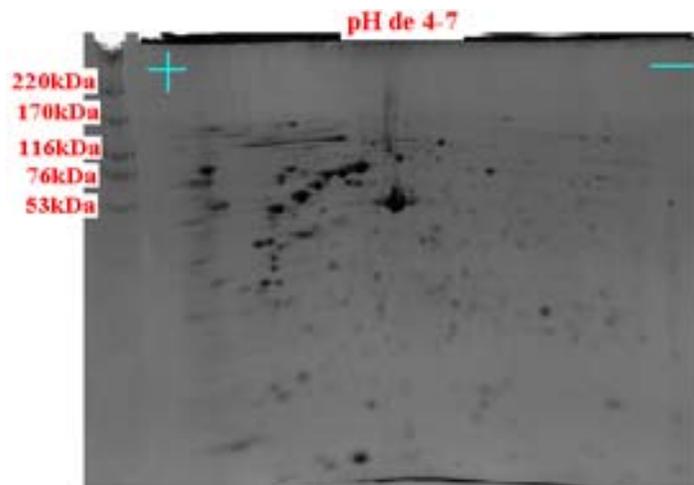


***c***

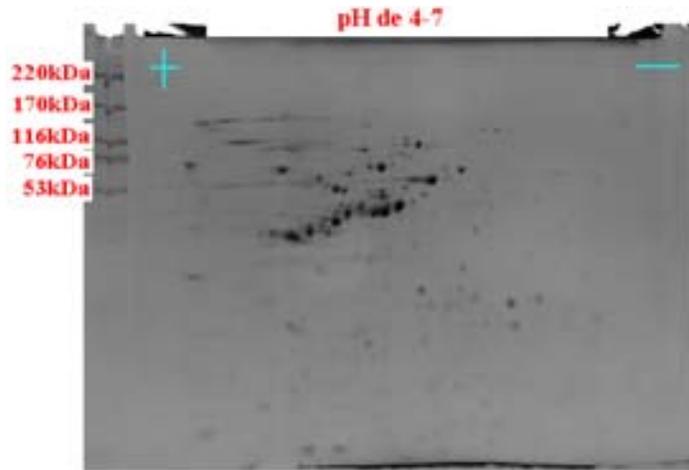


**Figuras 28a-c.** Geles bidimensionales de proteína total de las células a)Hs578Bst, b)Hs578T, c)MCF7. Intervalo de pH de 3-10NL de poliacrilamida al 12%, de 7cm.

Después de su respectivo isoelectroenfoque, se corrió la segunda dimensión de extracto total de proteínas provenientes de células Hs578T (figura 29), pero ahora “abriendo” el intervalo de pH 4-7. En este gel se identificó por espectrometría de masas la proteína tubulina. Lo mismo se hizo con el extracto total de proteínas provenientes de células MCF-7 (figura 30). En este gel se identificó por espectrometría de masas a las proteínas: queratina19, queratina tipoll 1B, queratina18, y la proteína de choque térmico de 60kDa. También, estos dos geles fueron de siete centímetros.



**Figura 29.** Gel de segunda dimensión con proteínas de células Hs578T.



**Figura 30.** Gel de segunda dimensión con proteínas de células MCF-7.

Se puede observar que en el gel con proteínas de células Hs578T se separaron mejor las proteínas de la zona de interés, aunque la separación es mucho mejor en el caso de las proteínas de células MCF-7 y, también, se puede observar en este último gel que las proteínas mayoritarias en el gel de pH 3-10, en realidad son mezclas de distintos tipos de proteínas empalmadas.

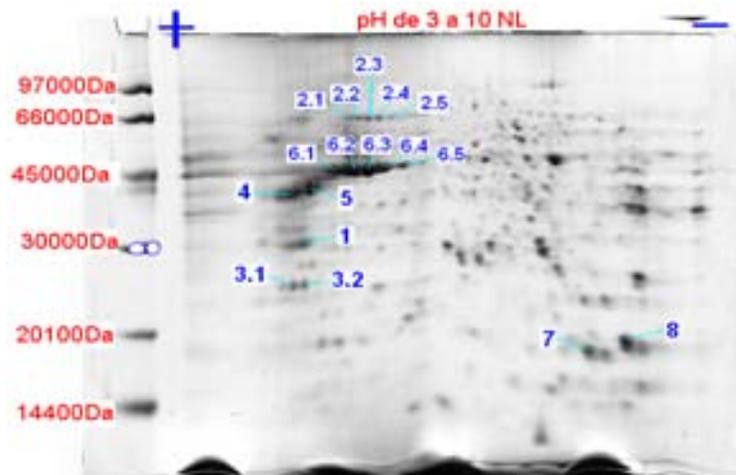
Ya que se tuvieron las condiciones para lograr la separación de proteínas totales de este tipo de células en un gel bidimensional, se procedió a separar el extracto total, que contiene el total de proteínas de las células, en dos fracciones principales las proteínas de la línea celular MCF7:

- a) Fracción microsomal (microsomos): Que contiene únicamente las proteínas contenidas en membranas de las células.
- b) Fracción Soluble: Que contiene únicamente las proteínas contenidas en el citosol de las células.

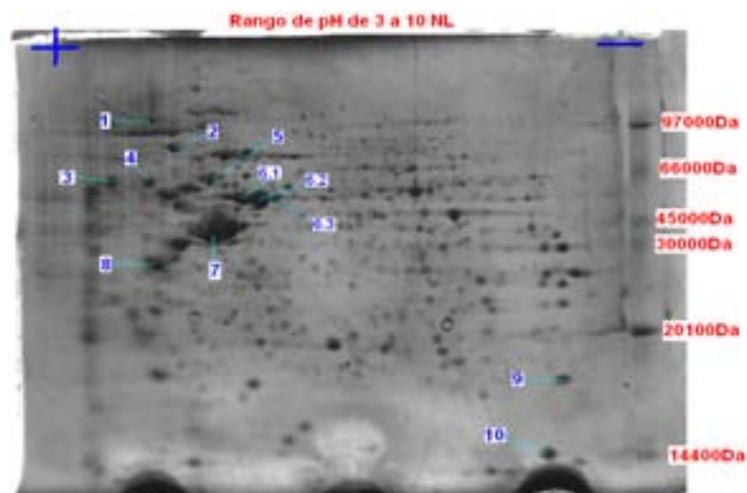
Por lo que, el extracto total se puede ver como la suma de las dos fracciones anteriores, es decir, juntando las proteínas de la fracción soluble y las proteínas de la fracción microsomal se obtienen las proteínas del extracto total.

Se siguió el procedimiento descrito en el apartado III.2, de materiales y métodos para la extracción de las proteínas de membranas y de este mismo método se obtuvo la fracción soluble. Con cada una de las fracciones se obtuvo un gel de 7cm teñido con azul de Commassie (Figuras 31a-c).

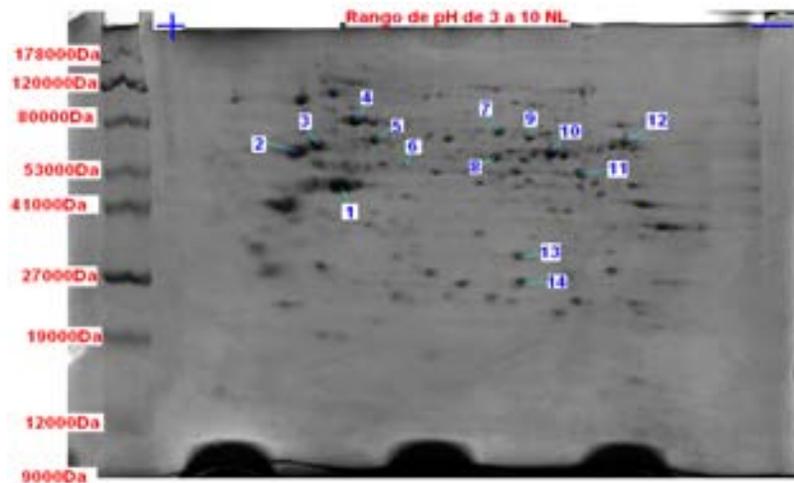
**a**



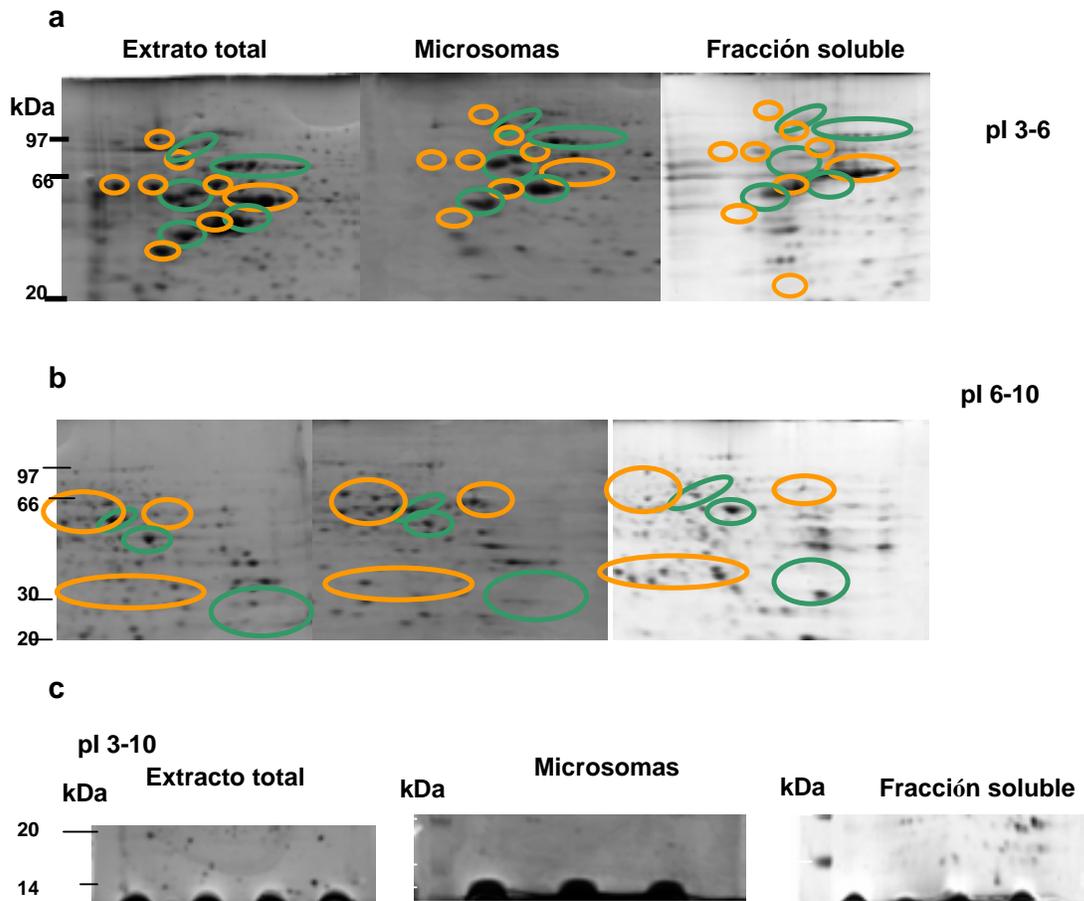
**b**



**c**



**Figuras 31a-c:** Geles bidimensionales de a)fracción soluble, b)extracto total, c)fracción membranal de células MCF7. Con números de identificación en las proteínas diferenciales más abundantes de cada fracción que se seleccionaron para su análisis por EM, según la sección V.



**Figuras 32a-c.** Proteínas diferenciales encontradas entre las 3 fracciones celulares obtenidas de los geles 2D de proteínas de células de cáncer de mama MCF7. Se compararon las manchas de proteínas por regiones en el gel de pI de 3-6 y 6-10 para los intervalos de peso molecular de 20-97 kDa.

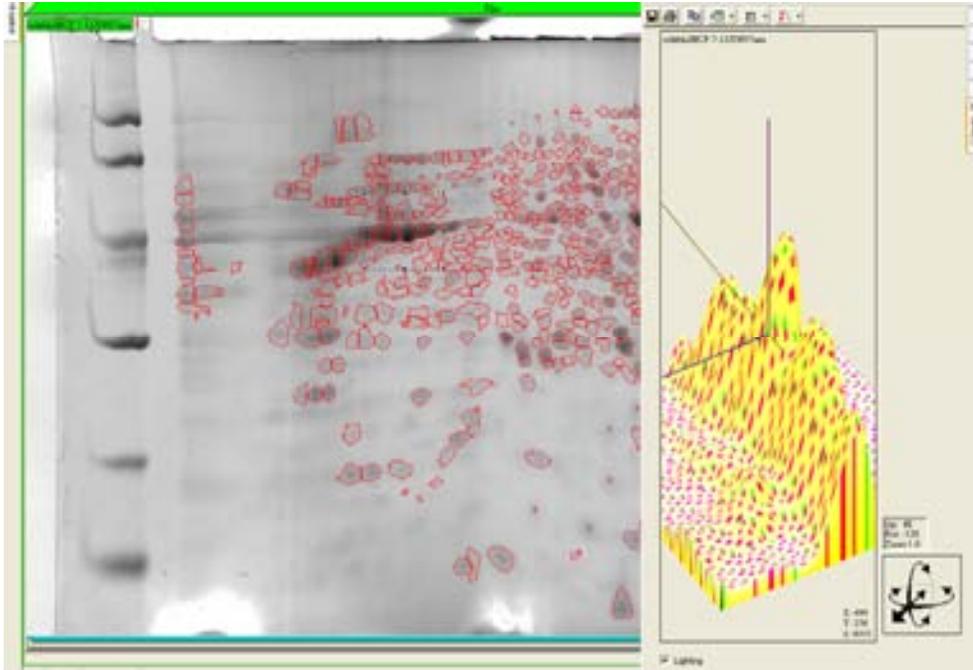
## V. ANÁLISIS DE LAS IMÁGENES OBTENIDAS EN LOS GELES DE ELECTROFORESIS EN 2D.

El análisis de los geles teñidos con azul de Commassie de las tres fracciones de proteínas de las diferentes partes de la célula se hizo con el programa ImageMaster 2D platinum. Las zonas donde se tuvo duda al discriminar si la mancha detectada correspondía o no a proteína, se confirmó con una proyección en tercera dimensión. En la cual aparece una vista de curvas de nivel de la zona estudiada, y aquí las proteínas aparecen con

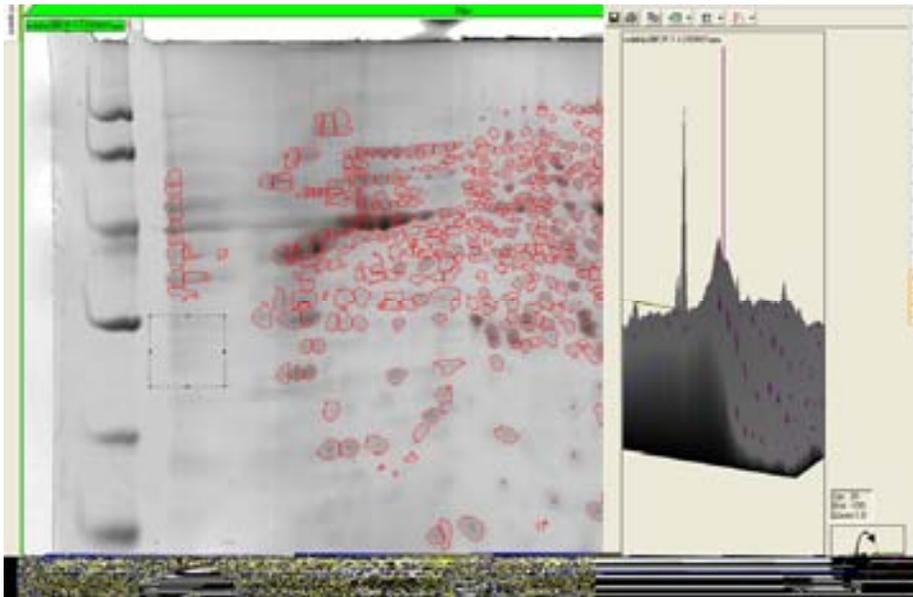
pendientes pequeñas (parecido a montañas pero con puntas redondeadas), es decir, con los bordes curvos y lo que no es proteína aparece como picos (ver Figuras 32 y 33). Al final, sólo las manchas que se considera que son proteína y que pertenecen a la muestra aparecen en el gel marcadas con un contorno rojo. Los datos obtenidos del conteo de manchas de algunos de estos geles son: El gel de la figura 28a es de un extracto total de proteínas que provienen de la línea celular Hs578Bst, con un intervalo de pH de 3 a 10 no lineal y con 134 manchas después del análisis. El gel de la figura 28b es de un extracto total de proteínas que provienen de la línea celular Hs578T, con un intervalo de pH de 3 a 10 no lineal y con 300 manchas después del análisis. El gel de la figura 28c es de un extracto total de proteínas que provienen de la línea celular MCF-7, con un intervalo de pH de 3 a 10 no lineal y con 180 manchas después del análisis. El gel de la figura 29 es de un extracto total de proteínas que provienen de la línea celular Hs578T, con un intervalo de pH de 4 a 7 y con 551 manchas después del análisis. El gel de la figura 30 es de un extracto total de proteínas que provienen de la línea celular MCF-7, con un intervalo de pH de 4 a 7 y con 489 manchas después del análisis. El gel de la figura 31-a es de la fracción soluble de proteínas que provienen de la línea celular MCF-7, con un intervalo de pH de 3 a 10 no lineal y con 472 manchas después del análisis.

Esto significa que, por ejemplo en uno de los geles, el gel resultó con un total de 472 manchas, es decir, un total de 472 proteínas que son consideradas proteínas lo suficientemente enfocadas y abundantes para ser extraídas del gel e identificadas por espectrometría de masas.

**a**



**b**



**Figura 33a-b** : Imágenes del análisis del gel de la fracción soluble de células MCF-7, se puede observar (en a) un ejemplo de manchas que NO son proteínas. Y se puede observar (en b) un ejemplo de manchas que si son proteínas, para ambas imágenes la vista en tres dimensiones que aparece a la derecha es una zona del gel, para la imagen 33b esta zona del gel está marcada en el rectángulo con líneas punteadas.

## VI. ELECTROFORESIS EN DOBLE DIMENSIÓN DE PROTEÍNAS MARCADAS POR EL MÉTODO ELECTROFORESIS FLUORESCENTE EN GEL DIFERENCIAL (DIGE).

Antes de decidir que proteínas se picarían del gel para su digestión y extracción en gel para su posterior identificación se escogieron las proteínas que presentan diferencias entre una y otra fracción, se realizó una serie de experimentos haciendo geles de 24cm de intervalo de pH de 3 a 11 no lineal pero con el método electroforesis diferencial en gel (DIGE), esto para comparar mejor las imágenes de las proteínas de las tres fracciones, procurando que cada comparación de fracciones, se hiciera usando imágenes de un solo gel (ver Figuras 34-a y 34-b) y así poder ubicar las proteínas que realmente variaran en sus niveles entre las fracciones comparadas. A este respecto, el método de electroforesis diferencial en gel (DIGE) permite empalmar casi perfectamente las imágenes obtenidas de estos geles.

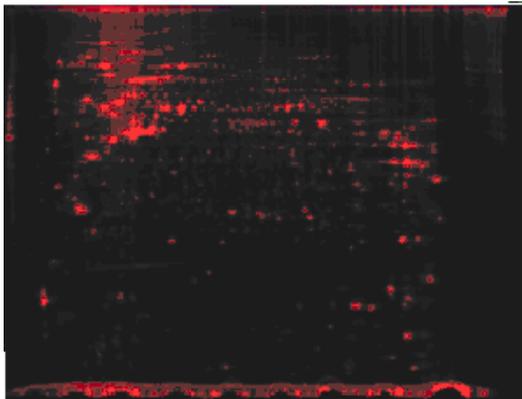


Figura 34a: Extracto de proteína total y marcadas con CyDy.

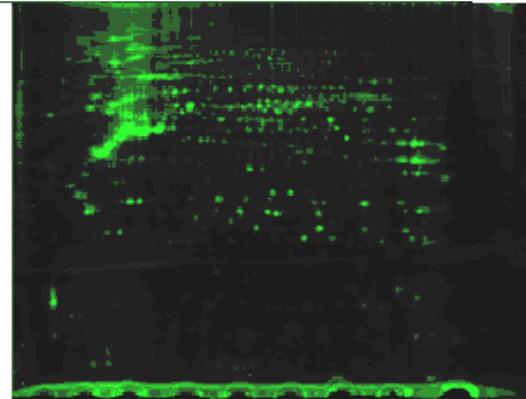


Figura 34b: Proteína de microsomas marcadas con CyDy.

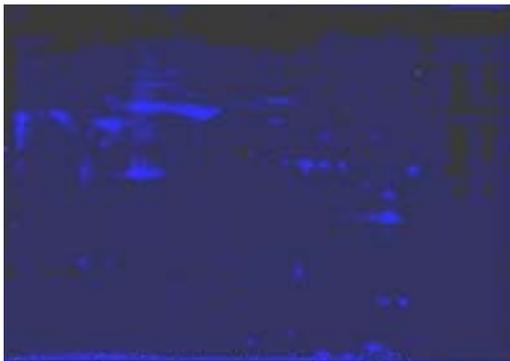


Figura 34c: Proteína de fracción soluble y marcadas con CyDy.

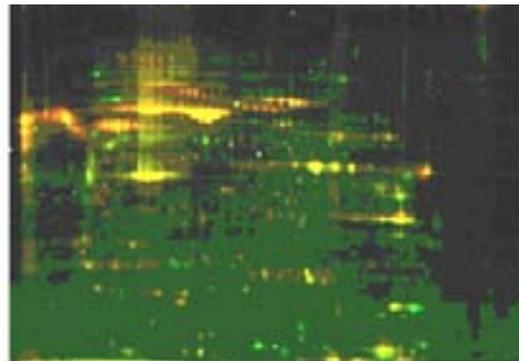


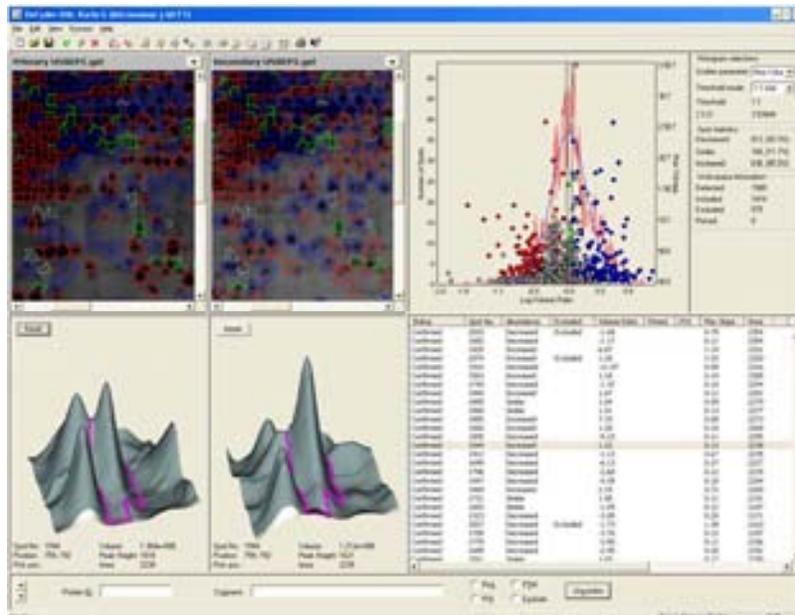
Figura 34d: Las proteínas de las fracciones soluble y microsomas empalmadas y marcadas con CyDy.

Como se puede observar se presenta un patrón de proteínas similar entre si, sin embargo, el análisis de expresión de proteína muestra diferencias como se observa en la siguiente sección.

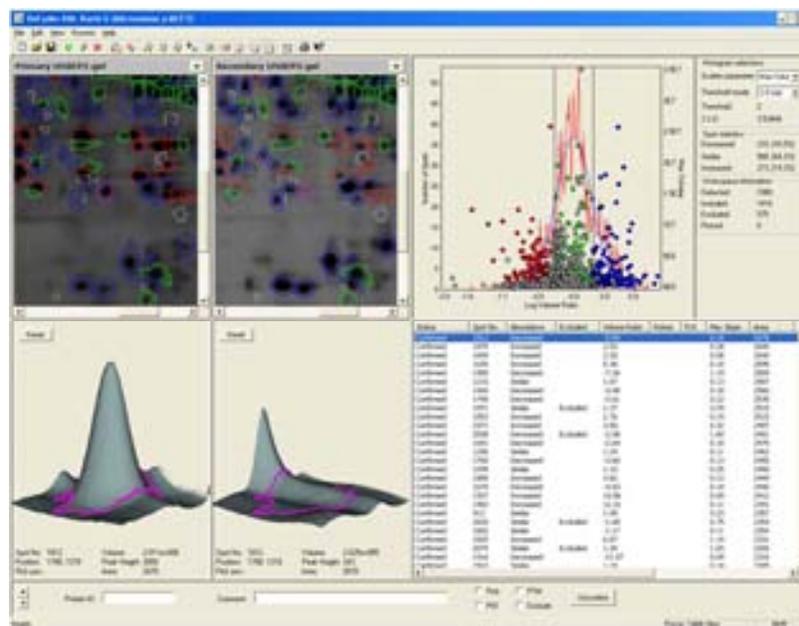
## **VII. ANÁLISIS DE LAS IMÁGENES DE PROTEÍNA MARCADA POR EL MÉTODO DIGE OBTENIDAS DE LOS GELES DE ELECTROFORESIS DE 2D**

En este análisis, el programa que se usó fue el Decyder 6.0 (GE-Healthcare), en tal programa, las manchas se analizan una por una. En la esquina superior izquierda aparecen las imágenes de los geles que se están comparando en el momento, en la esquina superior derecha aparece una gráfica que contiene el total de las manchas del gel en la esquina inferior izquierda aparece una imagen en tres dimensiones de la mancha estudiada en el momento con sus datos, en la esquina inferior derecha aparece una lista de todas las manchas de la imagen que se está comparando con sus datos y estadísticas.

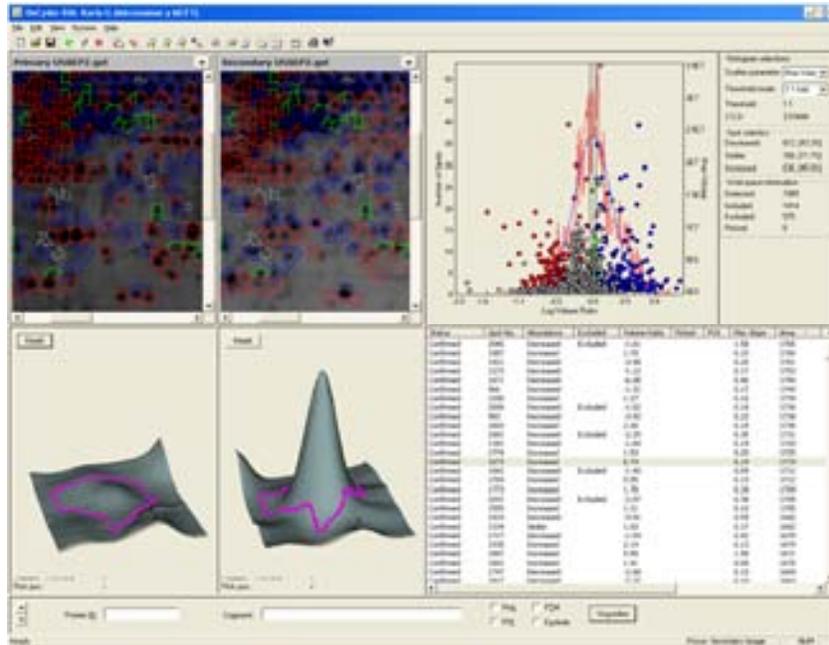
En las figuras 35a-d, se muestra un ejemplo el programa para analizar geles hechos con el método DIGE, en este caso una comparación entre la fracción membranal (las imágenes del lado izquierdo de las figuras) y el extracto total (las imágenes del lado derecho en las figuras).



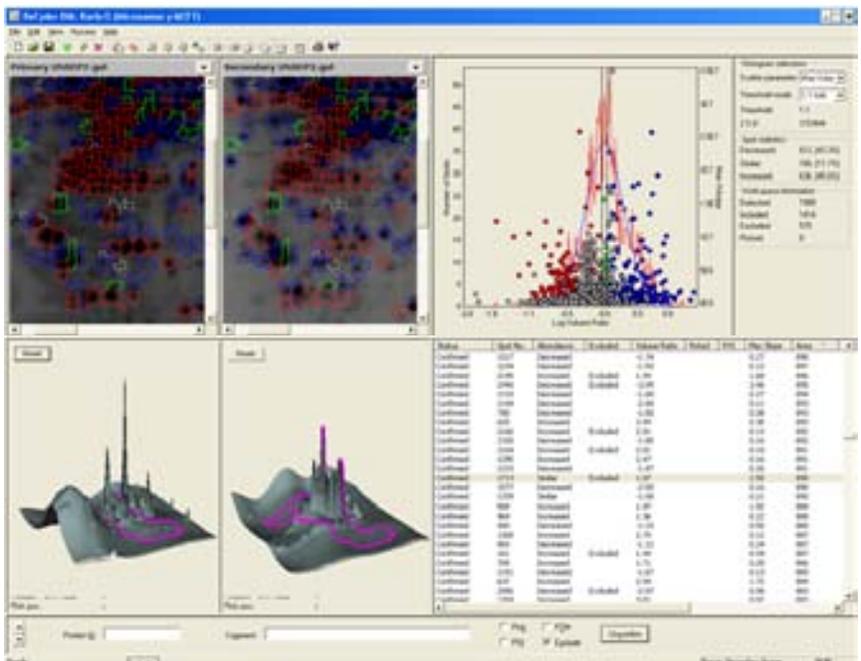
**Figura 35a** : Análisis de las manchas de proteína obtenidas en geles 2D por el método DIGE. En esta imagen se realiza una mancha que aparece en cantidad similar en ambas fracciones celulares (los dos recuadros de la esquina inferior izquierda de la imagen).



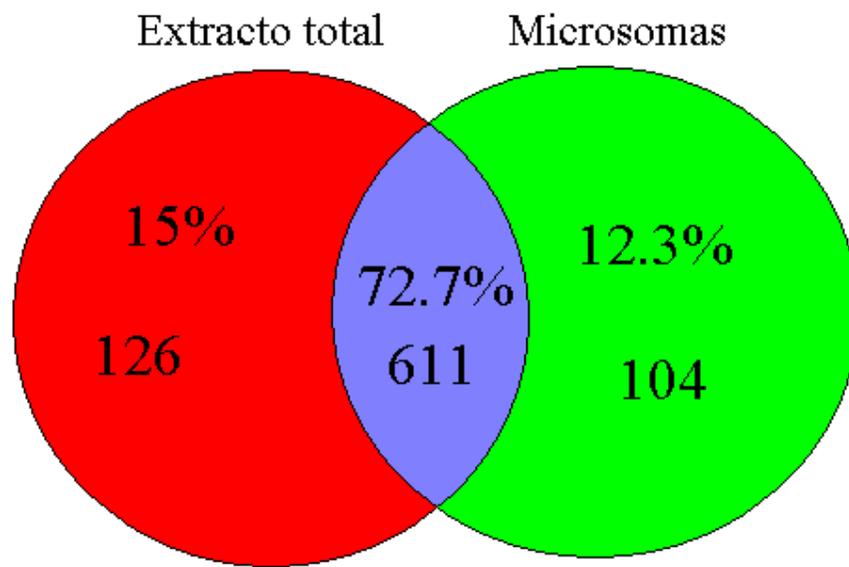
**Figura 35b** : El mismo gel que la figura 35a, pero en este caso, se realiza una mancha que aparece disminuída en su cantidad en las dos fracciones celulares.



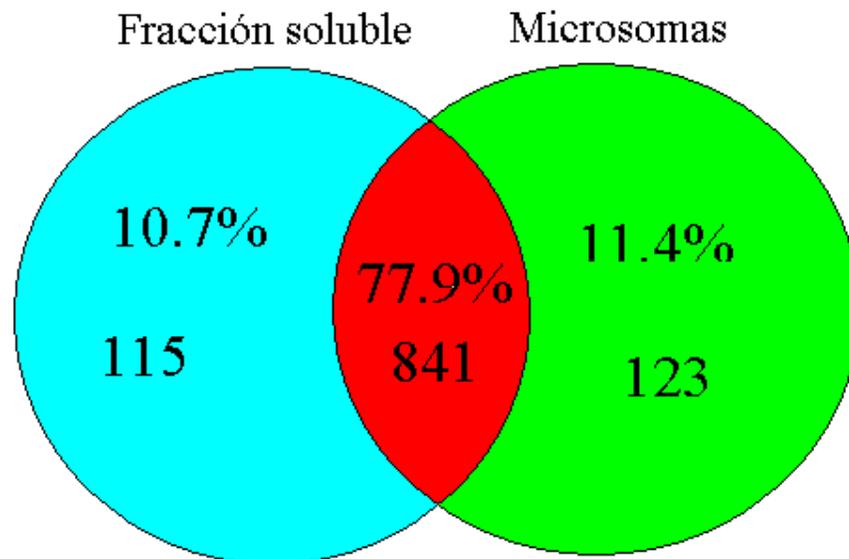
**Figura 35c** : El mismo gel que la figura 35a, pero en este caso, se realiza una mancha que aparece incrementada en su cantidad en las dos fracciones celulares.



**Figura 35d** : En este caso una mancha que aparece en las dos fracciones celulares pero que NO es proteína sino un contaminante desconocido, esto se deduce de la forma de picos de los dos recuadros de la esquina inferior izquierda de la imagen y por los valores que muestra la lista de la esquina inferior derecha de la imagen.



**Figura 36.** Representación de los resultados del análisis DIGE. Se compara la fracción membranal con el extracto total de proteínas. Se observa 611 proteínas que aparecen en ambas fracciones, 126 proteínas que sólo aparecen en el extracto total y 104 proteínas que sólo aparecen en la fracción membranal.



**Figura 37.** Representación de los resultados del análisis DIGE. Se compara la fracción membranal con la fracción soluble de proteínas. Se observa 841 proteínas que aparecen en ambas fracciones, 123 proteínas que sólo aparecen en la fracción membranal y 115 proteínas que sólo aparecen en la fracción soluble.

## **VIII. IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS SELECCIONADAS DE LAS IMÁGENES DE GELES 2D TEÑIDOS CON COOMASSIE.**

Con todos los datos obtenidos de los geles teñidos por comassie y de la información obtenida por el método DIGE. Se decidió picar las manchas de proteína (ver números en las figuras 31a-c) que resultaron tener diferencias entre las distintas fracciones celulares. Aparte en el gel de la fracción soluble, se picó por duplicado un marcador de peso molecular para usarlo como control en la identificación por espectrometría de masas. El marcador que se picó fue el de 30000Da que corresponde a la proteína anhidrasa carbónica de bovino; Esta proteína está marcada en la tabla como marcad en las columnas que corresponden a número de mancha y fracción.

La identificación de proteínas por espectrometría de masas y los datos derivados de esto se presentan en la tabla 16; para las 3 fracciones.

Existen proteínas que no arrojan ningún resultado en la identificación por espectrometría de masas, tal vez fue muy poca la cantidad de proteína contenida en la mancha como para poder ser detectada por el espectrómetro.



**TABLA 15: Resultados de la identificación por espectrometría de masas de las proteínas señaladas como diferenciales**

No. de mancha	Fracción	Nombre de la proteína	No. de péptidos	Probabilidad	% de cobertura	No. de acceso UniprotKB	P.I. teórico	P.I. experimental	P.M. teórico	P.M. experimental	Score
3.1	soluble	NO HUBO RESULTADOS									
3.2	soluble	NO HUBIERON RESULTADOS									
4	soluble	VALORES DE PROBABILIDAD NOACEPTABLES									
6.1	soluble	Queratina tipo II de citoesqueleto 8	3	1.2*10 <sup>-6</sup>	6.8	P05787	5.52	5.2	53704.25	53671.2	30.2
6.1	soluble	Queratina tipo I de citoesqueleto 18	1	5.9*10 <sup>-2</sup>	3	P05783	5.34	5.2	48057.81	48028.6	10.2
6.2	soluble	Queratina tipo I de citoesqueleto 18	4	3.7*10 <sup>-12</sup>	13.3	P05783	5.34	5.3	48057.81	48028.6	40.2
6.3	soluble	Queratina tipo I de citoesqueleto 18	4	5.9*10 <sup>-8</sup>	13.5	P05783	5.34	5.4	48057.81	48028.6	40.3
6.3	soluble	Queratina tipo II de citoesqueleto 8	2	1.6*10 <sup>-7</sup>	5.2	P05787	5.52	5.4	53704.25	53671.2	20.1
6.3	soluble	Serpina B6 ó Antiproteinasa citoplasmica	1	6.3*10 <sup>-6</sup>	2.7	P35237	5.18	5.4	42589.83	42562.1	10.2
6.4	soluble	Queratina tipo I de citoesqueleto 18	2	9.4*10 <sup>-13</sup>	10.2	P05783	5.34	5.5	48057.81	48028.6	20.3
6.4	soluble	Actina citoplasmica 1 ó β-actina	2	1.6*10 <sup>-6</sup>	5.9	P60709	5.29	5.5	41736.73	41709.7	20.2
6.4	soluble	Queratina tipo I de citoesqueleto 13	1	7.0*10 <sup>-6</sup>	2.6	P13646	4.91	5.5	49586.24	49555.4	10.1
6.5	soluble	NO EXISTEN CANDIDATAS EN LOS DATOS DE LA BASE									
8	soluble	Cofilina 1	2	1.5*10 <sup>-4</sup>	13.3	P23528	8.22	7.8	18502.49	18490.7	20.2

Proteína que representa la mancha en la fracción

**TABLA 15: Resultados de la identificación por espectrometría de masas de las proteínas señaladas como diferenciales**

No. de mancha	Fracción	Nombre de la proteína	No. de péptidos	Probabilidad	% de cobertura	No. de acceso UniprotKB	P.I. teórico	P.I. experimental	P.M. teórico	P.M. experimental	Score
2	micros	Queratina tipo I de citoesqueleto 10	3	1.2*10 <sup>-6</sup>	3.9	P13645	5.13	4.9	59510.68	59474.8	30.2
2	micros	Queratina tipo II de citoesqueleto 1	2	3.6*10 <sup>-5</sup>	3.4	P04264	8.16	4.9	66017.67	65977.9	20.2
2	micros	Queratina tipo II de citoesqueleto 2, epidermal	2	3.6*10 <sup>-5</sup>	4	P35908	8.07	4.9	65865.32	65825.4	20.2
3	micros	Queratina tipo II de citoesqueleto 2, epidermal	4	1.4*10 <sup>-6</sup>	8.4	P35908	8.07	5	65865.32	65825.4	40.2
3	micros	Queratina tipo 2 de citoesqueleto 1	2	2.6*10 <sup>-6</sup>	3.4	P04264	8.16	5	66017.67	65977.9	20.2
4	micros	Cognado de golpe de calor, proteína de 71kDa	3	8.6*10 <sup>-6</sup>	3.9	P11142	5.37	5.4	70898.09	70854.4	30.2
7	micros	Queratina tipo II de citoesqueleto 1	4	1.5*10 <sup>-6</sup>	7.6	P04264	8.16	6	66017.67	65977.9	40.2
7	micros	Queratina tipo I de citoesqueleto 9	1	1.6*10 <sup>-7</sup>	2.2	P35527	5.19	6	62129.44	62091.8	10.2
8	micros	Proteína 1 complejo-T subunidad β	4	9.8*10 <sup>-6</sup>	5.4	P78371	6.01	6	57488.21	57452.3	40.2
8	micros	Queratina tipo II de citoesqueleto 1	2	9.8*10 <sup>-7</sup>	3.4	P04264	8.16	6	66017.67	65977.9	20.2
8	micros	Queratina tipo II de citoesqueleto 2, epidermal	1	3.9*10 <sup>-6</sup>	1.9	P35908	8.07	6	65865.32	65825.4	10.2
8	micros	Queratina tipo I de citoesqueleto 10	1	5.8*10 <sup>-6</sup>	1.9	P13645	5.13	6	59510.68	59474.8	10.1
10	micros	Inosina-5'-monofosfato deshidrogenasa 2	5	1.8*10 <sup>-7</sup>	13.2	P12268	6.44	6.2	55804.98	55769.7	50.2
10	micros	Queratina tipo II de citoesqueleto 2, epidermal	2	2.0*10 <sup>-4</sup>	3.7	P35908	8.07	6.2	65865.32	65825.4	20.2
11	micros	α-enolasa, específica de pulmon	2	4.5*10 <sup>-7</sup>	6.8	Q05524	5.78	6.6	49477.34	49446.4	20.2
11	micros	α-enolasa	3	5.2*10 <sup>-7</sup>	10.4	P06733	7.01	6.6	47168.96	47139.4	30.2
12	micros	Piruvato cinasa isozimas M1/M2	23	1.1*10 <sup>-10</sup>	42.9	P14618	7.96	7.4	57936.89	57900.2	228.3
12	micros	Proteína 1 complejo-T subunidad η	3	3.7*10 <sup>-11</sup>	5.5	Q99832	7.55	7.4	59366.62	59329	30.2
12	micros	Queratina tipo II de citoesqueleto 1	4	3.8*10 <sup>-7</sup>	7	P04264	8.16	7.4	66017.67	65977.9	40.2
12	micros	Proteína 1 del complejo-T subunidad δ	3	9.2*10 <sup>-9</sup>	7.8	P50991	7.96	7.4	57924.23	57887.9	30.3
13	micros	Subunidad-α tipo1 del proteosoma	1	6.5*10 <sup>-4</sup>	4.6	P25786	6.15	6.1	29555.59	29536.9	10.1
14	micros	Subunidad-α tipo 6 del proteosoma	1	3.2*10 <sup>-7</sup>	5.3	P60900	6.35	6	27399.45	27381.8	10.2
14	micros	Proteína C14orf166	1	1.5*10 <sup>-7</sup>	6.6	Q9Y224	6.19	6	28068.09	28050.7	10.2
14	micros	Fosforribosiltransferasa hipoxantina-guanina	1	2.2*10 <sup>-6</sup>	6	P00492	6.21	6	24579.38	24563.6	10.2
1	soluble	14-3-3 Proteína β/α	1	1.2*10 <sup>-6</sup>	7.7	P31946	4.76	4.9	28082.4	28064.8	10.3
1	soluble	14-3-3 Proteína θ	1	5.2*10 <sup>-6</sup>	7.3	P27348	4.68	4.9	27764.25	27746.8	10.2
1	soluble	14-3-3 Proteína ζ/δ	1	1.2*10 <sup>-5</sup>	7.8	P63104	4.73	4.9	27745.1	27727.7	10.3
2.4	soluble	NO IDENTIFICADO									
2.5	soluble	NO IDENTIFICADO									

Proteína que representa la mancha en la fracción

## DISCUSIÓN

La proteómica estudia las proteínas utilizando técnicas que permiten extraer todas (o por lo menos gran parte) de las proteínas de un determinado tejido en una muestra concreta fundamentalmente en fluidos, por lo que es de gran utilidad en el abordaje de sistemas biológicos complejos.

Mientras que los micro arreglos de ADN (genómica) pueden identificar un amplio número de genes cuya expresión se modifica durante la transformación de una célula normal a célula maligna, no aportan información acerca de la presencia de la proteína correspondiente, ni de la existencia de modificaciones postraduccionales. Las proteínas celulares son las que catalizan y controlan el metabolismo de la célula, y las vías de señalización, por lo tanto, el estudio de los cambios en las proteínas es esencial para descifrar el proceso que sigue la enfermedad. La proteómica es el estudio a gran escala de los cambios de proteínas. Estos cambios pueden incluir alteraciones de la cantidad total, modificaciones post-traduccionales e interacciones proteína-proteína. Las técnicas y métodos incluyen separaciones por geles de dos dimensiones seguida por identificación por espectrometría de masas, así como el uso de microarreglos. Se espera que en un futuro cercano la proteómica pueda dar a conocer una buena cantidad de información acerca de interacciones y alteraciones de las proteínas que permitan un mejor entendimiento de las neoplasias, así como ayudar en el desarrollo de nuevas terapias para los pacientes con cáncer.

Para este trabajo se utilizaron tres líneas celulares distintas, Hs578Bst (de mama normal), Hs578t (de tumor primario) y MCF7 (de metastasis). Al compararse los perfiles de proteínas de los extractos totales de proteínas provenientes de las tres líneas celulares se observaron diferencias de expresión entre las 3 líneas celulares, tanto a nivel de intensidad de la mancha de proteína, como en la cantidad de proteínas detectadas en el gel de doble dimensión. Si comparamos las diferencias entre las líneas celulares de cáncer, MCF7 y Hs578T, entre estas mismas se observan diferencias con 180 proteínas detectadas para MCF7 y 300 para Hs578T. Se compararon los perfiles obtenidos de proteínas con los reportados en la literatura y coincidieron

con los perfiles reportados. Encontrándose manchas de proteína representativas como la  $\alpha$ -enolasa<sup>37</sup> y la piruvato cinasa isozimas M1/M2<sup>37</sup>.

Se debe de tomar en cuenta que las líneas celulares Hs578Bst y Hs578T provienen del mismo paciente, mientras que las células de la línea celular MCF-7 provienen de un paciente distinto a la mujer de la cual se obtuvieron las otras dos líneas celulares. Esto es un factor que podría explicar la similitud de los proteomas provenientes de las líneas Hs578Bst y Hs578T, así como también en las diferencias entre proteomas cuando se comparan estas dos líneas contra el proteoma de la línea MCF-7. Sin embargo, no se puede asegurar que todas las diferencias y similitudes entre proteomas se deban únicamente a este hecho. Actualmente, debido a que más del 50% de las drogas usadas para tratamiento contra el cáncer son dirigidas contra proteínas membranales<sup>37,44</sup> se ha despertado un gran interés por estudiar el proteoma de membranas de células de cáncer. Además, de que varias de estas podrían ser antígenos de superficie para detección de células de cáncer o ser secretadas hacia el torrente sanguíneo para servir como biomarcadores de diagnóstico. Inicialmente, tratamos de realizar la obtención de una fracción membranas totales (microsomas) de las 3 líneas celulares estudiadas, pero debido a que el crecimiento de las líneas celulares Hs578Bst y Hs578t era muy lento en comparación con la línea celular MCF7, no obteníamos la cantidad de proteína necesaria para realizar geles de doble dimensión de la fracción microsomal. Por lo que, decidimos continuar el análisis con mayor detalle del proteoma de la fracción membranal, así como de la soluble con la línea celular MCF7. Ésta es una línea celular que se ha utilizado en estudios proteómicos sobre el efecto de drogas anticancerígenas como tamoxifen o el efecto de la radiación ionizante en éstas, por lo que se ha descrito extensamente su proteoma en extracto total bajo estas condiciones<sup>37</sup>. Sin embargo, sobre su fracción membranal prácticamente son pocos los reportes<sup>37</sup>.

Como se puede observar en las figuras 29 y 30 en el extracto de proteínas totales se empalmaban proteínas que son mayoritarias y están en una de las zonas de mayor interés a pH entre 4 y 7. Por lo que, el fraccionamiento en proteínas solubles en el medio y proteínas microsomales del mismo extracto (figuras 31a-c), permitiría separar proteínas abundantes de

la fracción soluble que pudieran estar “ocultando” a otras proteínas. Se lograría así una mejor separación e identificación de las proteínas de microsomas (Figura 32a-c). De esta separación e identificación se obtuvo la tabla 15. De los experimentos de extracto total, fracción soluble y microsomas hubieron proteínas que se observaron en gel en ambas fracciones y en el extracto total. Lo que indica que, en la fracción microsomal, se arrastraron muchas proteínas de la fracción soluble. Sin embargo, cuando en el laboratorio se intentó realizar una mayor purificación mediante gradientes de sacarosa, el rendimiento disminuía aún más y, en muchos de los casos, resultó casi nulo. Sin embargo, el análisis por zonas del gel muestra que varias proteínas se enriquecían en la fracción microsomal.

Ya que las proteínas membranales son proteínas que se encuentran en bajas concentraciones en extractos de proteína total. Se decidió realizar un experimento de electroforesis diferencial en gel (DIGE) en el que, se etiquetaron las lisinas de la proteína con un fluoróforo comercial Cy3 o Cy5 (Amersham, GE Healthcare). Así, se pudieron detectar un número mayor proteínas de la fracción microsomal, que no observamos por la tinción de coomassie ni en un extracto total de proteína. Los resultados se resumen en las figuras 36 y 37 en las que se muestran 104 manchas de proteína que se encuentran en la fracción microsomal y no se encuentran en el extracto total ni en la fracción soluble.

Con la información de ambos tipos de experimentos en geles de doble dimensión se decidió seleccionar aproximadamente unas 40 manchas de proteínas de los geles de doble dimensión para su identificación por espectrometría de masas (Fig 31a-c). Con los resultados de la tabla 15 se asignó la identidad probable que corresponde a cada una de las manchas seleccionadas en el gel, utilizando para esto diferentes criterios. Por ejemplo: el número de péptidos, el porcentaje de cobertura de la secuencia proteica y la calificación que arroja el programa de búsqueda.

Para la asignación de la identidad también se compararon otros datos como el punto isoeléctrico (pI) y peso molecular. En el caso de la mancha número 10 de la fracción del extracto total en donde la identificación por espectrometría de masas sugiere dos probables identidades, entre las que se

propone la Queratina tipo II de citoesqueleto 1; en un análisis del gel que se obtuvo (Figura 31-b), se observa que dicha proteína tendría que aparecer a un peso molecular más alto en el gel, en cambio la mancha está ubicada muy cercana al marcador que indica 14400 Da, lo que lleva a proponer que en realidad es la proteína Cofilina-1 de aproximadamente 18.5kDa. En otros casos, influyó en la decisión el punto isoeléctrico como en el caso de la mancha 8 de la fracción de extracto total, pero estos resultados (de punto isoeléctrico) fueron tomados con reserva, ya que fueron un parámetro muy variable al comparar el dato teórico (obtenido de bases de datos de geles 2D) contra el resultado experimental de cada gel. De la misma forma, comparando los resultados de peso molecular teórico y experimental de la tabla 15, se observa variabilidad en los resultados, pero esta variabilidad se mantiene con una misma tendencia a lo largo de todas las manchas y proteínas de las tres fracciones. Dicha variabilidad (en la que el peso molecular teórico es mayor al peso molecular experimental) no es tan grande como en el caso de los puntos isoeléctricos. En otros casos, como el de la mancha número 7 de la fracción de extracto total, influyó de manera determinante la clasificación taxonómica del tejido de donde se extrajo la proteína para su identificación la proteína probable no pertenecía a un ser humano, en este caso particular, pertenecía a un platelminto.

Otro aspecto a considerar es el hecho de que existen proteínas que aparecen en dos fracciones distintas, como en el caso de la mancha 2 de microsomas que parece ser la misma proteína que la mancha 6.1 del extracto total. Si bien es cierto que es lógico encontrar las proteínas de membrana (y las citosólicas) en las proteínas totales. Existen casos como el de las manchas 6.2, 6.3, y 6.4, de la fracción soluble (citosólica); cuya identidad es la misma, la Queratina tipo I-18 de citoesqueleto. Podría tratarse de la misma proteína que se encuentra modificada post-traduccionalmente o alguna de sus isoformas. La proteína queratina tipo II-1 de citoesqueleto es otra proteína que aparece como candidata en muchas manchas distintas, lo cual parece objeto de una investigación específica y con más detalle, ya que esta proteína (queratina tipo II de citoesqueleto 1), aparece como candidata en manchas que están muy alejadas en punto isoeléctrico y peso molecular, es muy difícil (si no es que imposible) que una misma proteína presente dicha variedad de punto

isoelectrico y peso molecular. Podría ser contaminación, pero, es improbable que todas las queratinas se deban a contaminación ya que en otros trabajos donde se estudia el proteoma de células MCF7, también aparece un número considerable de queratinas<sup>37</sup>, algunas de las cuales coinciden con manchas que se identificaron en este estudio.

De las proteínas identificadas, como en el caso de la mancha número 10 de la fracción microsomal, en donde se identificó a la inosina-5'-monofosfato deshidrogenasa 2 ; La cual se sabe que está involucrada en la síntesis de nucleótidos y, por lo tanto, en la regulación del crecimiento celular, además, se sospecha que juega un papel en el desarrollo de enfermedad y crecimiento de algunos tumores<sup>1e</sup>. La mancha número 11 de la fracción microsomal, que es una proteína del tipo α-enolasa, la cual se sabe que es una enzima multifuncional que aparte de su participación en la glucólisis, toma parte en varios procesos como en el de control del crecimiento, tolerancia a la hipoxia, y respuestas alérgicas; ya es usada como biomarcador de varios tumores<sup>1e</sup>. La mancha número 12 de la fracción microsomal, está formada de proteínas del tipo Piruvato cinasa isozimas M1/M2. Se sabe que es una enzima glucolítica que cataliza la transferencia de un grupo fosforilo del fosfoenolpiruvato al adenosindifosfato y la isozimaM2 se encuentra en las primeras etapas de los tejidos fetales, así como en la mayoría de las células cancerosas<sup>1e</sup>. La mancha número 14 de la fracción microsomal está formada de proteínas del tipo Proteína C14orf166, la cual se sabe que está sobre expresada en muchos tumores cerebrales<sup>1e</sup>. La mancha número 6.2 de la fracción soluble está formada de proteínas del tipo Queratina tipo I de citoesqueleto 18. Se sabe que se encuentra en la región peri nuclear y tiene un incremento en su expresión en los nodos linfáticos de los carcinomas de seno<sup>1e</sup>.

Se debe hacer un estudio más profundo y detallado de los niveles de expresión de estas proteínas y si se presenta el mismo patrón en el tumor o biopsia de las candidatas a ser biomarcadores de cáncer de mama: inosina-5'-monofosfato deshidrogenasa 2, α-enolasa, Piruvato cinasa isozimas M1/M2, Proteína C14orf166. Sin embargo, se ha propuesto que no es conveniente proponer una sola proteína como biomarcador. Es mejor proponer varias proteínas o subproteomas, por ejemplo: el perfil de expresión de la familia de las queratinas. Esto podría llevar a proponer un método de diagnóstico confiable

que incluyera varios biomarcadores para diagnóstico temprano, pronóstico o para decisión de terapia.

Se necesita realizar la identificación de las proteínas de este estudio en las muestras de pacientes con cáncer de mama para proponer las proteínas como biomarcadores de éste cáncer.

## **CONCLUSIONES**

- 1) El procedimiento para la extracción y separación de proteínas a partir de las líneas celulares utilizadas nos lleva a patrones reproducibles en geles 2D.
- 2) La identificación de las proteínas reprodujo lo que se ha obtenido experimentalmente en otros laboratorios pero además llevó a la identificación de proteínas que anteriormente no habían sido asociadas con cáncer de mama.
- 3) Los resultados obtenidos en este trabajo son insuficientes para sustentar la propuesta de biomarcadores específicos de cáncer de mama.

## ABREVIATURAS

MCF7: Línea de células humanas cancerosas de tejido de mama.

BRCA1: Abreviatura en inglés (breast cancer1) gen o proteína proveniente del gen de cáncer de seno1.

BRCA2: Abreviatura en inglés (breast cancer2) gen o proteína proveniente del gen de cáncer de seno 2.

p53: Gen o proteína proveniente del gen p53, la proteína codificada es de 53KDa, de ahí su nombre.

PTEN: Abreviatura en inglés (phosphatase and tensin homolog) homólogo de fosfatasa y tensina, gen o proteína proveniente de dicho gen.

CDIS: Carcinoma ductal in situ.

CLIS: Carcinoma lobular in situ.

CDI: Carcinoma ductal invasivo.

CLI: Carcinoma lobular invasivo.

HER-2: Abreviatura en inglés (human epidermal growth factor receptor 2) factor de crecimiento epidérmico humano receptor 2, gen o proteína proveniente de dicho gen.

RNM: Resonancia nuclear magnética.

TEP: Tomografía de electrón positrón.

RE: Receptor de estrógenos.

ATM: Abreviatura en inglés (ataxia telangiectasia mutated) gen mutado de ataxia telangiectasia.

FCE: Factor de crecimiento epidérmico.

Hs578t: Línea de células humanas cancerosas de tejido de mama.

Hs578Bst: Línea de células humanas sanas de tejido de mama.

PBS: Abreviatura en inglés (phosphate buffer saline) amortiguador salino de fosfatos.

CHAPS: Detergente zwitterionico

DTT: Ditiotreitól.

Amortiguador IPG: Amortiguador para permitir el mejor enfoque de las proteínas en primera y segunda dimensión (anfólitos).

ASB: Albúmina de suero de bovino.

IEF: Isoelectroenfoque.

SDS Abreviatura en ingles (sodium dodecyl sulfate) dodecil sulfato de sodio.

SDS-PAGE: Abreviatura en ingles (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio.

PSA: Persulfato de amonio.

TEMED: Abreviatura en ingles (tetramethylenediamine) tetrametiletildiamina.

2D: Segunda dimensión.

DIGE: Abreviatura en ingles (differential in gel electrophoresis) electroforesis fluorescente en gel diferencial.

DMF: Dietilformamida.

C33-A: Línea de células humanas cancerosas de tejido de la cerviz.

pI: Punto isoeléctrico.

## BIBLIOGRAFÍA

### REFERENCIAS ELECTRONICAS

- 1e. ExPASy Proteomics Server  
<http://ca.expasy.org/> (consultada a lo largo de 2007 y 2008).
- 2e. Cancer-Research-UK.  
<http://info.cancerresearchuk.org/cancerstats/types/breast/incidence/>  
(consultada en Febrero de 2007).
- 3e. American Cancer Society. <http://www.cancer.org> (consultada en Febrero de 2007).

### ARTICULOS CIENTIFICOS Y LIBROS

1. Lewison EF: The surgical treatment of breast cancer: an historical and collective review, *Surgery* 1953; 34:904-953.
2. Mansfield C: 1976, Early breast cancer: its history and results of treatment. editor: (*Experimental biology and medicine: monographs on interdisciplinary topics*), In Wolsky A, vol 5, New York, Karger, pp 2-22.
3. LeDran HF: 1757, (Memoire avec un precis de plusieurs observations sur le cancer, *Memoires de L'academie royale de chirurgie*); 3:1-54.
4. Fisher B:1999, From Halsted to prevention and beyond: advances in the management of breast cancer during the twentieth century, *Euro J Cancer*, 35(14):1963-1973.
5. Armstrong B, Doll R: 1975, Enviromental factors and cancer incidence and mortality in different countries, with special reference to dietary practices, *Int J Cancer*, 15:617-631.
6. Martin AM, Weber BL: 2000, Genetic and hormonal risk factors in breast cancer, *J Natl Cancer Inst*; 92:1126-1135.

7. Kreiger N: 1990, Social class and the black/white crossover in the age specific incidence of breast cancer: a study linking census-derived data to population-based registry records, *Am J Epidemiol*; 131:804-814.
8. Jacobsen BK, Lund E: 1990, Level of education, use of oral contraceptives and reproductive factors: the Tromso Study, *Int J Epidemiol*; 19:967-970.
9. Janerich DT, Hoff MB: 1982, Evidence for a crossover in breast cancer risk factors, *Am J Epidemiol*; 116:737-742.
10. Fraumeni JF Jr and others: 1969, Cancer mortality among nuns: role of marital status in etiology of neoplastic disease in women, *J Natl Cancer Inst*, 42:455-468.
11. Titus-Ernstoff L and others: 1998, Menstrual factors in relation to breast cancer risk, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 7:783-789.
12. Trichopoulos D, MacMahon B, Cole P: 1972, Menopause and breast cancer risk, *J Natl Cancer Inst*, 48:605-613.
13. Ambrosone CB and others: 1996, Cigarette smoking, N-acetyltransferase 2 genetic polymorphisms, and breast cancer risk, *JAMA*; 276:1494-1501.
14. Jhon EM, Kelsey JL: 1993, Radiation and other environmental exposures and breast cancer, *Epidemiol Rev*, 15:157-162.
15. Cantor KP and others: 1995, Occupational exposures and female breast cancer mortality in the United States, *J Occup Environ Med*; 37:336-348.
16. Thompson PA, Ambrosone C: 2000, Molecular epidemiology of genetic polymorphisms in estrogen metabolizing enzymes in human breast cancer, *J Natl Cancer Inst Monogr*, 27:125-134.
17. Wacholder S and others: 2000, Population stratification in epidemiologic studies of common genetic variants and cancer: quantification of bias, *J Natl Cancer Inst*, 92:1151-1158.
18. Lakhani SR: 1999, The transition from hyperplasia to invasive carcinoma of the breast, *J Pathol*; 187:272-278.
19. Page DL, Simpson JF: 1999, Ductal carcinoma in situ-the focus for prevention, screening, and breast conservation in breast cancer, *N Engl J Med*; 340:1499-1500.
20. Finzi NS: 1909, Inoperable recurrent carcinoma of the breasts under treatment by radium, *Proc R Soc Med*; 2:226-227.

21. Hondemarck H., Vercoutter-Edouart A., Revillion F., Lemoine J., al-Yazidi-Belkoura I., Nurcombe V., Peyrat J. p. 2001. Proteomics of breast cancer for marker discovery end signal pathway profiling. *Proteomics* 1: 1216-1232.
22. Tyers M. y Mann M. 2003. From genomics to proteomics. *Nature* 422: 193-197.
23. Banks R.E., Dunn M.J., Hochstrasser D.F., Sanchez J.C., Blackstock W., Pappin D.J. Y Selby P.J. 2000. Proteomics: new perspectives, new biomedical opportunities. *Lancet* 356: 1749-1756.
24. Stitzel N. O., Mar B. G., Liang J. y Westbrook C. A., 2004. Membrana associated and secreted genes in breast cancer. *Cancer Res.* 64: 8682-8687.
25. Rahbar A. M. y Fenselau C. 2005. Unbiased examination of changes in plasma membrana proteins in drug resistant cancer cells. *J. Proteome Res.* 4: 2148-2153.
26. Tokarski C., Fillet M. y Rolando Christian. 2006. New 1D and 2D gels for the characterization of hydrophobic proteins. Memoria del 54o. Congreso de ASMS conference. Seattle Washington 28 Mayo-1o. De Junio.
27. Richard J. Simpson: 2003, *Proteins and Proteomics a Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp:165,166.
28. Russo J, Tay LK, Russo IH: 1982, Differentiation of the mammary gland and susceptibility to carcinogenesis, *Breast Cancer Res Treta*; 2:5-73.
29. Bonnadonna G y otros: 1998, Primary chemotherapy in operable breast cancer: eight-year experience at the Milan Cancer Institute, *J Clin Oncol*; 16:93.
30. Rebbeck TR, 1999: Inherited genetic predisposition in breast cancer: a population-based perspective, *Cancer*; 86:2501.
31. Scully R and others, 1997: Dynamic changes of BRCA1 subnuclear location and phosphorylation state are initiated by AND damage, *Cell*; 88:265-275.
32. Sharan SK and others, 1997: Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking BRCA2, *Nature*; 386:804-810.

33. Dickson RB, Lippman ME, 1995: Growth factors in breast cancer, *Endocrin Rev*;16(5):559-589.
34. Travers MT and others, 1988: Growth factor expression in normal, benign, and malignant breast tissue, *Br Med J Clin Res*; 296(6637):1621-1624.
35. Lamb P, Crawford L, 1986: Characterization of the human p53 gene, *Mol Cell Biol*; 6(5):1379-1385.
36. Levine AJ, 1997: p53, the cellular gatekeeper for growth and division, *Cell*; 88(3):323-331.
37. Amir M. Rahbar, Catherine Fenselau, 2005: Unbiased Examination of Changes in Plasma Membrane Proteins in Drug Resistant Cancer Cells, *Journal of Proteome Research*; 4,2148-2153.
38. López Ríos O, Lazcano Ponce EC, Tovar Guzman V, Hernández Avila M, 1997: La epidemia de cáncer de mama en México; Consecuencia de la transición demográfica, *Salud Publica México*; 39: 259-265.
39. Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M 1973 A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 51:1409-141.
40. William CS Cho, 2007: Contribution of oncoproteomics to cancer biomarker discovery, *Molecular Cancer*;6:25.
41. Julio E. Celis, José m. A. Moreira, Irina Gromova, Teresa Cabezon, Ulrik Ralfkiaer, Per Guldborg, Per thor Straten, Henning Mouridsen, Esbern Friis, Dorte Holm, Fritz Rank, Pavel Gromov, 2004: Towards discovery-driven translational research in breast cancer, *FEBS Journal*; 272,2-15.
42. William L. Donegan & John S. Spratt, 5<sup>a</sup> edición, 2002, *Cancer of the Breast*.
43. Wu W, Hu W, Kavanagh J. Proteomics in cancer research. *Int. Gynecol Cancer*, 2002; 12:409-423.
44. Wu, C. C.; Yates, J.R., III, The application of mass spectrometry to membrane proteomics, *Nat. Biotechnol.*, 2003, 21 ;262-267.