



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
*Facultad de Estudios Superiores Iztacala*

“Identificación de proteínas de las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y SK-BR-3 mediante estudios de proteómica a partir de extractos totales y fraccionamiento subcelular”

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE BIÓLOGO

P R E S E N T A :

**SUÁREZ GALVÁN KARLA MARIANA**

Director de tesis: Dr. Juan Pedro Luna Arias



**Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, México.**



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.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia por el apoyo incondicional, los múltiples consejos, cariño y comprensión que me brindaron durante toda mi carrera profesional.

A María Luisa y Leticia Zavala por su importante ayuda y paciencia en cada uno de los métodos para poder concluir este proyecto.

Al Dr. Juan Pedro por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de laboratorio.

Al Instituto Nacional de Medicina Genómica y a Karla Calderón por permitirnos el uso del equipo MALDI-TOF/TOF y por su asesoría.

A la Dra. Cecilia Silva por su ayuda brindada en el equipo de HPLC 2D ESI-MS/MS

A todos mis amigos que estuvieron conmigo y compartimos tantas aventuras, experiencias, desveladas, convivencias, conocimientos e hicieron que los tiempos tediosos fueran amenos y divertidos.

<b>ÍNDICE</b>	<b>Pág.</b>
Lista de Abreviaturas.....	7
Lista de Tablas .....	9
Lista de Figuras.....	10
Agradecimientos.....	12
Resumen.....	13
<b>CAPÍTULO I</b>	
Introducción.....	14
1- Cáncer.....	14
1.1- Cáncer de mama .....	16
1.1.1.- ¿Cómo se detecta el cáncer de mama?.....	16
1.1.2.- Anatomía de la mama.....	16
1.1.3.- Tipos de cáncer de mama según su localización anatómica en la mama .....	17
1.1.4.- Estadios de desarrollo del cáncer de mama.....	19
1.1.5.- Epidemiología.....	20
1.1.6. Estadísticas.....	20
1.1.7.- Factores de riesgo.....	21
1.1.8.- Tratamiento.....	24
1.1.9.- Microarreglos de DNA usados en la detección del cáncer de mama.....	26
1.1.10.- ¿Puede el cáncer de mama tener un origen viral?.....	27
1.2.- Proteómica.....	28
1.3.- Espectrometría de masas.....	29
1.3.1. ESI.....	30
1.3.2. MALDI.....	31

1.4.- Biomarcadores.....	34
CAPÍTULO II	Pág.
Justificación.....	36
CAPÍTULO III	
Objetivo general.....	37
CAPÍTULO IV.	
Objetivos particulares.....	37
CAPÍTULO V	
Metodología (Diagramas de flujo).....	38
5.1.- Cultivo de las líneas celulares SK-BR-3 y MCF-7.....	39
5.2.- Cosecha de las líneas celulares SK-BR-3 y MCF-7.....	39
5.3.-Extracción de proteínas totales.....	40
5.3.1 Precipitación proteica y eliminación del GdmCl 6M + NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> 0.2 M.....	40
5.4.-Fraccionamiento subcelular por DDF.....	41
5.4.1 Preparación de las células.....	41
5.4.2 Fraccionamiento por detergentes en cultivos crecidos en monocapa.....	41
5.5.- Cuantificación de proteínas por el método de Lowry (1951).....	42
5.6.- Deslipidación .....	43
5.7.-Gel de acrilamida-bisacrilamida SDS-PAGE al 12% .....	44
5.7.1.- Preparación de marcadores.....	44
5.7.2.- Preparación de la muestra.....	44
5.7.3.- Tinción del SDS-PAGE con azul de Coomassie.....	44
5.7.4.- Tinción del SDS-PAGE con nitrato de plata.....	45
5.8.-Digestión proteica.....	46
5.9.- Desalación y purificación.....	46
5.10.- Preparación de la muestra para ESI-MS/MS.....	47

5.11.- LC ESI-MS/MS e identificación proteica.....	47
5.12.- MALDI-TOF/TOF e identificación proteica.....	48

CAPÍTULO VI	Pág.
Resultados.....	49
6.1. Cultivo de las líneas celulares SK-BR-3 y MCF-7.....	49
6.2. Solubilización de proteínas .....	51
6.3. Determinación proteica por el método de Lowry.....	54
6.4. Obtención de los espectros generales.....	54
6.5. Proteínas obtenidas de los “shot gun” de ambas líneas celulares.....	57
6.6. Proteínas obtenidas de las fracciones subcelulares de ambas líneas celulares.....	61
6.7. Espectros y proteínas obtenidos de las fracciones subcelulares de ambas líneas celulares.....	64
CAPÍTULO VII	
Discusión.....	76
CAPÍTULO VIII	
Conclusión.....	79
CAPÍTULO IX	
Perspectivas.....	80
CAPÍTULO X	
Referencias .....	81

## RESUMEN

La acumulación de numerosas y frecuentes alteraciones moleculares causan la proliferación celular, un incremento invasivo, un fenotipo resistente y la inestabilidad genética, generando así una de las enfermedades hoy en día más mortales, el cáncer. Uno de los tipos más importantes del cáncer es el de mama que, en México, corresponde a la primera causa de muerte por cánceres en mujeres. Se han realizado varios estudios para combatirlo, entre ellos se encuentran los basados en la proteómica. Esta tecnología ha entrado en los archivos de la biomedicina con claras esperanzas para la identificación de marcadores patológicos y blancos terapéuticos específicos de cáncer de mama. Actualmente las herramientas proteómicas permiten el alto rendimiento de los análisis para la detección, identificación e investigación funcional de proteínas, siendo éstas una alternativa en la búsqueda de novedosos biomarcadores. Es por esto que en este trabajo se presenta la identificación de proteínas (*mining*) de la línea celular de cáncer de mama SK-BR-3 y MCF-7 por espectrometría de masas a partir de extractos totales y fracciones subcelulares, además de realizar la optimización de las técnicas adecuadas para la extracción y solubilización proteica. Para alcanzar dichos objetivos se cultivaron ambas líneas celulares (SK-BR-3 y MCF-7), se implementó la metodología adecuada para la extracción y solubilización de proteínas, para posteriormente procesarlas y realizar un análisis por HPLC-2D acoplado a espectrometría de masas en tándem (ESI-MS/MS) y MALDI/TOF-TOF. Se obtuvo un total de 21 proteínas para SK-BR-3; entre ellas varias proteínas hipotéticas, actinas, tubulinas, histonas, entre otras; las que consideramos de mayor importancia fueron las citoqueratinas tipo 1 como la 19 y la 16, ya que han sido observadas en los ductos de la glándula mamaria, la 18 que induce a la proliferación celular, la CK19 y la CK20 que han sido exitosamente usadas para la detección de células circulantes tumorales en sangre de pacientes con cáncer de mama. Todas estas moléculas juegan un papel crucial en la supervivencia y crecimiento de células cancerosas, pudiendo servir como blancos terapéuticos efectivos, por lo que se sugiere un estudio exhaustivo de las proteínas encontradas en este estudio, el uso de un control, como la línea celular MDA-MB-231 o MCF-10A para la interpretación diferencial de las proteínas.

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN.

### 1.- Cáncer

Hoy en día el cáncer se considera como una de las enfermedades más mortales producida por la acumulación de numerosas, variadas y frecuentes alteraciones moleculares, que causan la proliferación celular con la adquisición de un incremento invasivo y un fenotipo resistente, así como también la inestabilidad genética en la célula (Bertucci *et. al.*, 2006).

Dichas alteraciones en la célula ocurren normalmente en el organismo pero generalmente el sistema inmune las controla; sin embargo, en algunos casos las células anormales no son destruidas, se multiplican a una velocidad asombrosa y forman tumores. Un tumor situado en una zona concreta y limitada del cuerpo no suele constituir un peligro vital. Por el contrario, cuando el cáncer se extiende (metástasis) resulta una amenaza para la vida. Alrededor del 90% de los procesos cancerosos tienen su origen en la metástasis. Para facilitar la penetración en los órganos, las células cancerosas segregan unas enzimas que descomponen el tejido conjuntivo circundante, allanando así el camino hacia otros órganos del cuerpo, además estimulan la angiogénesis, lo que facilita su oxigenación.

La transformación de células normales a malignas consiste en la adquisición progresiva de una serie de cambios genéticos específicos que actúan desobedeciendo los mecanismos antitumorales que existen en todas las células, como son la regulación de la transducción de señales, la diferenciación celular, la apoptosis, la reparación del ADN, la progresión del ciclo celular, la angiogénesis, la funcionalidad de los genes supresores tumorales (*p53*, *BRCA1* y *BRCA 2*) e incluso se ha llegado a creer que este mal radica en las células madre, las cuales, han llegado a ser famosas por su capacidad de sanar, generando esperanzas de que un día puedan curar el mal de Parkinson, lesiones a la médula espinal y una amplia variedad de males. Sin embargo, hoy en día, un creciente número de investigadores está llegando a la conclusión de que las células madre son también



la fuerza oculta detrás del cáncer; todo esto hace posible brindar características específicas a las células, tales como: absorber cantidades anormalmente altas de azúcares, tener una tasa elevada de metabolismo anaeróbico, cambios en la membrana, poseer antígenos tumorales que les confieren propiedades inmunológicas específicas y la más evidente, el crecimiento incontrolado (Torres, 1986).

En el 2006, el cáncer fue la tercera causa de muerte en México con 63 888 defunciones, representando el 12.9% del total de muertes registradas (Figura 1) (INEGI, 2008).

**Porcentaje de defunciones generales y por sexo causadas por tumores malignos, 1997-2006**

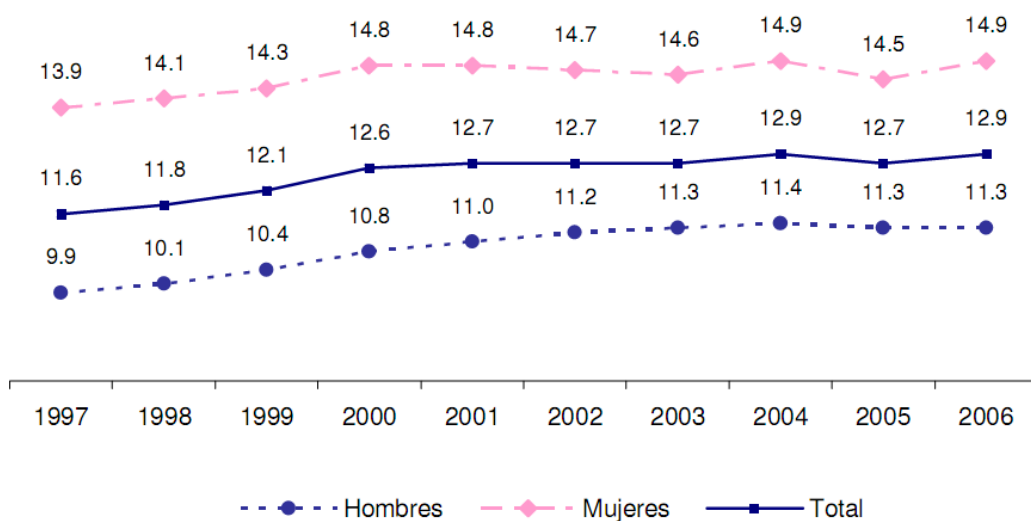


Figura 1. Porcentaje de defunciones generales y por sexo causadas por tumores malignos (Cáncer) de 1997 al 2006 en México. El porcentaje está en relación con el total de defunciones registradas en cada año. Fuente: INEGI. Estadísticas Vitales, 1997-2006.

La Organización Mundial de la Salud (OMS), estima que alrededor de 84 millones de personas morirán a causa de esta enfermedad entre 2005 y 2015. Asimismo, la mortalidad más alta es debida al cáncer de pulmón, seguido por el de estómago,

hígado, colon y mama; por sexo las incidencias más frecuentes en los hombres son por cáncer de pulmón, estómago, hígado, colon-recto, esófago y próstata; y para las mujeres el de mama, pulmón, estómago, colon-recto y cuello uterino (OMS, 2009).

## **1.1. Cáncer de mama**

El cáncer de mama es el resultado de la transformación maligna de las células epiteliales que forman el sistema ducto-lobulillar de la glándula mamaria. El cáncer de mama es la mayor causa de mortalidad entre la población femenina en el mundo (Boyle et al., 2003).

### **1.1.1. ¿Cómo se detecta el cáncer de mama?**

Históricamente la primera presentación de un cáncer de mama era la presencia de un nódulo palpable o un cambio físico externo en la mama detectado por el propio paciente. En la actualidad, los programas de detección precoz permiten detectar anomalías radiológicas no palpables por la mujer que además, en muchos casos, son asintomáticas.

El diagnóstico temprano de tumores efectuado por medio de autoexamen o con exploración periódica realizada por el médico, constituye la mejor alternativa que una mujer tiene para sobrevivir en caso de presentar un cáncer de mama (Trujillo, 1999).

### **1.1.2. Anatomía de la mama.**

El seno se compone de la porción glandular, que está involucrada en la producción y transporte de leche, de tejido conectivo y estroma. La parte glandular de la mama tiene de 15 a 20 lóbulos, dentro de cada uno hay gran cantidad de lobulillos o pequeños lóbulos terminando en docenas de diminutos bulbos que pueden producir leche (Figura 1). Los lobulillos terminan en el pezón y están unidos por delgados tubos llamados ductos. Las células formadoras de ductos y lobulillos son células epiteliales que tienen la función de producir y secretar varios constituyentes de la leche.

Las células epiteliales tienen una capa de células microepiteliales adjuntas a una membrana basal la cual se encarga de mantener la estructura de los ductos y lobulillos. Estos últimos son rodeados de tejido conectivo y adiposo los cuales presentan otros componentes como: fibroblastos, células endoteliales, fibras nerviosas, adipositos así como vasos sanguíneos y linfáticos que irrigan la glándula mamaria (Hondermark, 2003).

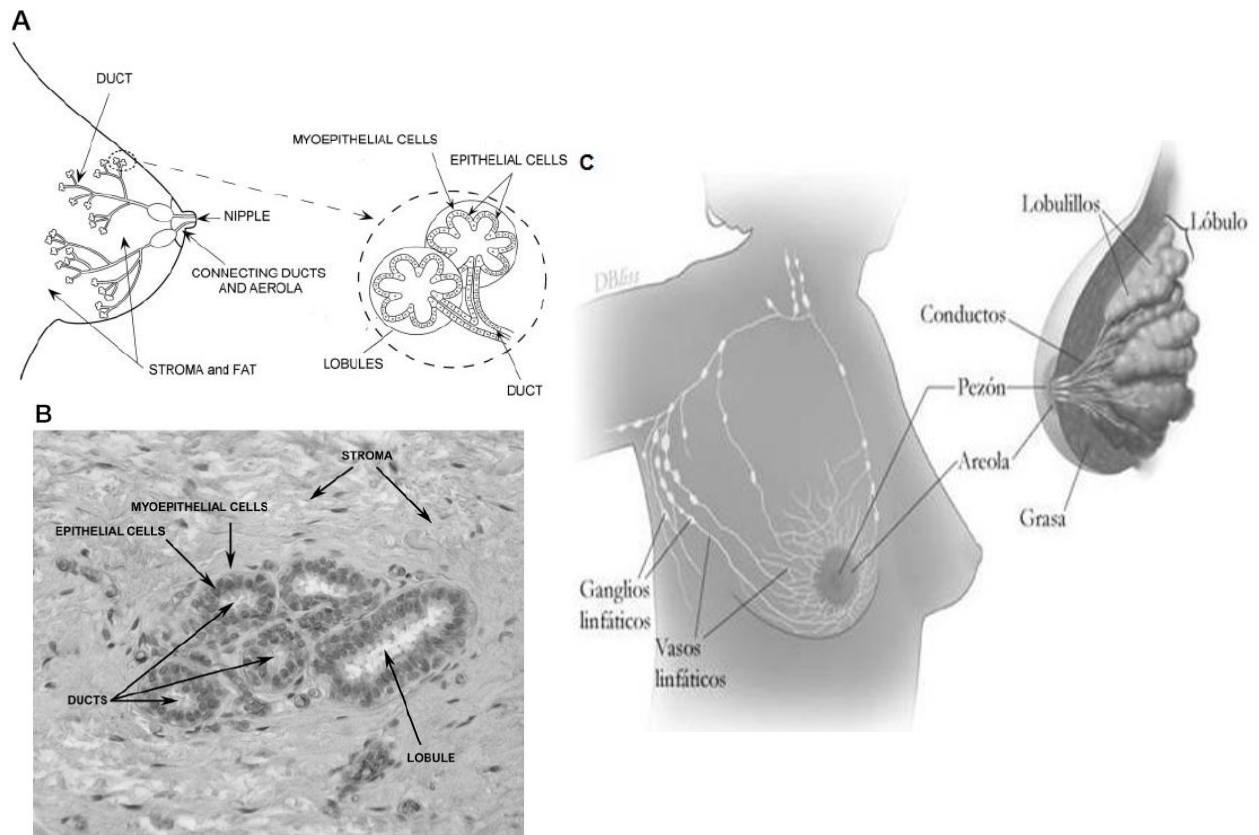


Figura 2. Anatomía (A,C) e histología (B) de la glándula mamaria (Hondermark, 2003).

### **1.1.3. Tipos de cáncer de mama según la localización anatómica en la mama (Rica, 2004):**

#### **Carcinoma ductal *in situ* (CDIS):**

Es un trastorno precanceroso no invasivo, donde se encuentran células anormales en el revestimiento del ducto. Se origina en las células de las paredes de los conductos mamarios. Es un cáncer muy localizado, que no se ha extendido a otras zonas. Por este motivo, puede extirparse fácilmente; es decir, a veces el CDIS se convierte en un tipo de cáncer invasivo mamario, aunque se desconoce cómo predecir cuáles lesiones se convertirán en invasivas. La cifra de curación en las mujeres que presentan este tipo de cáncer ronda el 100%. Este tipo de tumor se puede detectar a través de una mamografía.

#### **Carcinoma ductal infiltrante o invasivo:**

Se inicia en el conducto mamario pero logra atravesarlo y pasa al tejido adiposo de la mama; tiene una alta probabilidad metastásica en otras partes del organismo. Es el más frecuente de los carcinomas de la mama, aproximadamente en 80% de los casos.

#### **Carcinoma lobular *in situ* (CLIS):**

Se origina en las glándulas mamarias o en los lóbulos y aunque no es un cáncer “verdadero”, aumenta el riesgo de que el paciente pueda desarrollar un cáncer en el futuro; pero rara vez llega a ser cáncer invasivo. En la mujer, suele darse antes de la menopausia. Una vez detectado, y según las recomendaciones de la OMS, es importante que la mujer se realice una mamografía de control al año y varios exámenes clínicos para vigilar el posible desarrollo de cáncer.

#### **Carcinoma lobular infiltrante o invasivo:**

Se origina en las glándulas mamarias pero se puede extender y destruir otros tejidos del cuerpo. Entre 10% y 15% de los tumores de mama son de este tipo. Este carcinoma es más difícil detectarlo a través de una mamografía.

#### Carcinoma inflamatorio:

Es poco común, tan sólo se presenta en un 1% del total de los tumores cancerosos de la mama. Es agresivo y de crecimiento rápido. Hace enrojecer la piel de la mama y aumentar su temperatura. La apariencia de la piel se vuelve gruesa y ahuecada, como la de una naranja y pueden aparecer arrugas y protuberancias en ella; estos síntomas son debidos al bloqueo que producen las células cancerosas sobre los vasos linfáticos.

#### **1.1.4. Estadios del cáncer de mama (FEFOC, 2001)**

Estadio I y Estadio II son estadios iniciales del cáncer de mama, pero el cáncer ya ha invadido los tejidos próximos. En el estadio I las células cancerosas no se han extendido más allá de la mama y el tumor no mide más de 2 centímetros en su mayor dimensión.

El estadio II significa que el cáncer ha invadido los ganglios linfáticos axilares y/o el tumor en la mama mide más de 2 centímetros pero menos de 5 centímetros en su mayor extensión. A las mujeres con estadios iniciales (I o II) de la enfermedad se les practica cirugía conservadora seguida de radioterapia como primer tratamiento local, o bien mastectomía. La elección de cirugía conservadora o mastectomía depende principalmente del tamaño y localización del tumor, el tamaño de la mama de la mujer, ciertas características de la mamografía, y de cómo se siente la mujer sobre la preservación de su mama. En cualquiera de los dos casos los ganglios linfáticos axilares se suelen extirpar. Algunas mujeres en estadio I y la mayoría de mujeres en estadio II reciben quimioterapia y/o hormonoterapia.

Estadio III, también llamado cáncer localmente avanzado. El tumor en la mama es grande (más de 5 centímetros de diámetro máximo), se extiende a los ganglios linfáticos axilares, o se ha diseminado a los ganglios linfáticos de otras zonas o a otros tejidos cercanos a la mama. El carcinoma inflamatorio de la mama es uno de los tipos de cáncer de mama localmente avanzado.

Las pacientes en estadio III de la enfermedad suelen recibir un tratamiento local con el fin de extirpar o destruir el cáncer en la mama, y un tratamiento sistémico

para impedir la diseminación de la enfermedad. El tratamiento local puede consistir en cirugía y/o radioterapia en la mama y axila. El tratamiento sistémico puede ser quimioterapia, hormonoterapia, o ambos; y puede ser aplicado antes o después del tratamiento local.

Estadio IV es el cáncer metastásico. El cáncer ha diseminado desde la mama hacia otros órganos del cuerpo. Las mujeres que están en el estadio IV del cáncer de mama reciben quimioterapia y/o hormonoterapia para reducir el tumor o destruir células cancerosas. Pueden recibir tratamiento quirúrgico o radioterapia para controlarlo. La radioterapia también puede ser útil para el control de los tumores en otras partes del cuerpo.

#### **1.1.5. Epidemiología**

El cáncer de mama muestra ser uno de los más frecuentes y mortales, siendo una de las enfermedades más complejas ya que en algunos países toma gran importancia por sus altas tasas de incidencia mientras en otros lugares se presenta en forma más esporádica, aproximadamente con una estimación de 1,200,000 nuevos casos en el 2004 a nivel mundial (19% del total de los cánceres en la mujer) (Ferlay *et al.* 2002). Su frecuencia varía ampliamente, siendo más alta en los países norteamericanos y europeos mientras que Asia y África tienen la más baja (Metzlin, 1999). Los países latinoamericanos, también tienen una baja frecuencia y mortalidad a excepción de Argentina y Uruguay los cuales tienen tasas semejantes a la de los países europeos, ya que el origen de su población es mayoritariamente europea a diferencia del resto de los países latinoamericanos donde existe un mestizaje entre indígenas, europeos y negros. En México, corresponde a la primera neoplasia maligna más frecuente en mujeres y a la segunda causa de defunción por enfermedades neoplásicas teniendo más impacto en mujeres mayores de 35 años, ya que la edad es uno de los factores de riesgo conocidos para padecer cáncer de mama. En México suele manifestarse a partir de los 20 años de edad y su frecuencia se incrementa hasta alcanzar los 40 y 54

años (Rodríguez y Carpuso, 2006) una década antes que las mujeres europeas o estadounidenses (51 vs 63 años de edad, respectivamente).

#### **1.1.6. Estadísticas**

La estadística mundial señala más de un millón de casos nuevos cada año (Ferlay *et al.*, 2002), por tanto, este tipo de cáncer representa un problema de salud pública porque es la principal causa de muerte en mujeres en todo el mundo (Sandoval y Cárdenas, 2005). Una de cada ocho mujeres tiene riesgo de padecer cáncer de mama a lo largo de la vida (12.2%) y una de cada 28 de morir por esta enfermedad, según la Sociedad Americana del Cáncer.

La mortalidad por cáncer mamario en nuestro país ha mantenido una tendencia ascendente en los últimos 20 años representando 12,953 casos o el 15.2% del total de las neoplasias malignas en la mujer mexicana (FUCAM, 2004; INEGI, 2008). Existen incluso estados donde el cáncer de mama ha rebasado ya al carcinoma cervicouterino como primera causa de mortalidad en mujeres, como es evidente en el estado de Jalisco donde desde 1997 el cáncer de mama ocupa el primer lugar, con una tasa de mortalidad de 15.82% por 100,000 mujeres (Rodríguez y Cuevas, 1999). En México, hoy en día mueren 7 mujeres por día, por esta causa se calcula que dentro de 3 años serán 10 mujeres por día (Harri *et al.*, 1992; Ruiz, 2001). El 47% de las mujeres con esta enfermedad mueren en edades de 45 a 64 años, equivaliendo cada muerte a 21 Años de Vida Productivos Perdidos (AVPP). En el 2007 se perdieron 81,669 AVPP con costo de \$3,107,505.00 pesos (FUCAM, 2008).

#### **1.1.7. Factores de riesgo**

Existen múltiples factores por los cuales esta enfermedad puede ser adquirida. Los estrógenos juegan un papel importante en la aparición del cáncer de mama; por tanto, la menarquia antes de los 11 y menopausia después de los 54

años de edad incrementan el riesgo del padecerlo, además de la nuliparidad (Rodríguez y Carpuso, 2006). Del mismo modo, el primer embarazo después de los 30 años de edad se considera un factor de riesgo, pues éste produce un efecto protector, como resultado de la proliferación y diferenciación del tejido mamario durante la gestación (Cnatringius *et al.*, 2005).

La terapia hormonal de reemplazo por tiempo prolongado (periodo mayor de cinco años) incrementa 2% anual el riesgo de padecer cáncer de mama (Rodríguez y Carpuso, 2006). Este riesgo permanece latente cinco años después de suspender el tratamiento; posterior a este periodo, el riesgo se iguala al de las mujeres que nunca recibieron terapia (Singletary, 2003). En las mujeres posmenopáusicas se ha demostrado la asociación entre obesidad y cáncer de mama; se considera que el Índice de Masa Corporal (IMC) de 27 o mayor, para talla normal, y de 25 o mayor para la población de talla baja (150 cm para mujeres) es un factor de riesgo (Martínez-Abundis *et al.* 2004 y Jee *et al.*,2008). Mientras que en la mujer premenopáusica la obesidad tiene relación inversamente proporcional con el desarrollo de cáncer de mama, en la posmenopáusica se convierte en un factor importante (Song *et al.*,2008) pues se asocia con riesgo hasta dos veces mayor que en las mujeres premenopáusicas.

En la mujer posmenopáusica obesa, el tejido adiposo se convierte en el único órgano productor de estrógenos, a través de la aromatización de androstenediona, ya que se altera la unión de éstos con la proteína transportadora de esteroides sexuales, lo que induce elevadas concentraciones de estrógenos libres (Jee *et al.*, 2008). Entre los factores ambientales y estilos de vida, la exposición a la radiación ionizante produce lesiones en el genoma, como hidroxilación de la timina, lo que resulta en formación de dímeros de dicha base nitrogenada y rotura de una o dos cadenas de ADN (Heredia y Bautista, 2007).

El consumo de bebidas alcohólicas se ha identificado como factor de riesgo, ya que entre sus productos se encuentra el acetaldehído, conocido como carcinógeno primario en animales (Blot, 1999). Existe controversia entre la asociación de tabaquismo y cáncer de mama, pues algunos autores señalan que



sus derivados, como el benzopireno, las aminas aromáticas y nitrosaminas, están implicados en la carcinogénesis de la mama (Castaño, 2006) aunque otros no han encontrado ninguna asociación (Lin *et al.*,2008)

Algunos de los factores genéticos que implican mutaciones en genes específicos como:

- a) un polimorfismo en el gen *ER*, ya que en el desarrollo y la progresión del cáncer mamario existe una gran influencia de estrógeno y antiestrógenos. Cuando el estrógeno entra en la célula se fija a la proteína del receptor estrogénico (ER) que migra al núcleo. Esto induce a cambios estructurales como la dimerización del ER, el cual se une al ADN activando la transcripción de los genes regulados por el estrógeno. El antiestrogeno se fija al “*pocket*” del ER disminuyendo la proliferación celular o incluso causando la muerte celular. Un poliformismo en el gen *ER* puede afectar la unión del estrógeno y la regulación del índice de transcripción de algunos genes (Trujillo, 1999).
- b) una mutación germinativa en los genes *BRCA1* y *BRCA2*, que son genes supresores tumorales y que comúnmente tienen la función de controlar el crecimiento y muerte celular, en el cáncer mamario se han identificado más de 200 mutaciones en estos genes (Carvalho, 2004)
- c) una mutación en el gen *p53*, cuyo producto se encarga de reparar el daño al genoma y/o llevar a la célula a apoptosis , dicha mutación codifica productos que fallan en la reparación o en la inhibición del ciclo celular, y pueden promover la proliferación. La proteína no se detecta en grandes cantidades en el tejido de mama normal; sin embargo las mutaciones en el gen *p53* se han hallado en una gran proporción de muestras de ADN de tumores de pacientes con antecedentes familiares de cáncer de mama (Pasqualini, 2002)
- d) la sobreexpresión del receptor tirosina cinasa ErbB2/Neu/Her2 provocando su activación constitutiva y de las vías de transducción de señales, induciendo la formación tumoral; este gen se encuentra amplificado en 10 a

30% de pacientes que padecen de cáncer de mama invasivo, y se encuentra con más frecuencia en el carcinoma ductal *in situ* (60% de los casos) (Trujillo, 1999).

- e) Cambios en otros genes como en el gen *AT* de la ataxia-telangiectasia, *H-ras1* y *PTEN/MMAC* relacionados con el síndrome de Cowden (Hartmann et al., 1997) y en *c-myc* que se encuentra amplificado en 1-56% de los tumores de mama (Pasqualini, 2002).

### **1.1.8. Tratamiento**

Hay muchos tipos de terapias utilizadas para tratar el cáncer de mama. El tratamiento dependerá del tamaño y localización del tumor en la mama, los resultados de los estudios de laboratorio (incluido el análisis de los receptores hormonales), y del estadio (o extensión) de la enfermedad.

Algunos de los tratamientos más utilizados son:

- a) La radioterapia que consiste en utilizar radiaciones de alta energía (gammas), con el fin de dañar las células cancerosas e impedir su crecimiento. Los rayos proceden de material radioactivo situado fuera del cuerpo y dirigido hacia la mama por un equipo (radiación externa). La radiación también puede provenir de material radioactivo colocado directamente en la mama en unos tubos delgados de plástico (implante radioactivo). A veces la paciente recibe ambos tipos de radioterapia.
- b) La quimioterapia es el uso de fármacos para matar las células cancerosas. La quimioterapia para tratar el cáncer de mama suele consistir en una combinación de fármacos que dañan al ADN. Estos pueden ser administrados oralmente o bien, por una inyección intravenosa o a través de un catéter. En cualquiera de los casos, la quimioterapia es un tratamiento sistémico, porque los fármacos entran a la circulación sanguínea y viajan por todo el cuerpo.
- c) La hormonoterapia fue el primer tratamiento que se propuso para enfermedades neoplásicas desde 1986, sin embargo continúa teniendo una función muy importante en el tratamiento del cáncer de mama además de

desempeñar un papel clave en el tratamiento adyuvante de las etapas tempranas del mismo. El tamoxifeno (TAM) es un claro ejemplo de un fármaco más utilizado en el tratamiento hormonal por un lapso de dos a cinco años. El TAM es un modulador selectivo del receptor de estrógenos usado comúnmente durante las dos últimas décadas para el tratamiento y prevención del cáncer de mama (Osborne, 1998) teniendo una eficacia demostrada en la reducción del riesgo de cáncer de mama del 50% (Vogel *et al.*, 2006). Además, en 1998, la FDA (*Food and Drug Administration*) americana también aprobó el uso de TAM para la prevención de cáncer de mama en mujeres con alto riesgo de desarrollar la enfermedad (Fisher *et al.*, 1998). TAM actúa como antiestrogénico en tejido mamario interfiriendo con la actividad de los estrógenos, hormonas femeninas que promueven el crecimiento de las células cancerosas en la mama. Debido a su efecto agonista parcial, el TAM ejerce efectos beneficiosos sobre el metabolismo lipídico y óseo.

- d) La terapia con anticuerpos consiste en la producción de éstos a partir de un tipo único de células del sistema inmunitario, los anticuerpos pueden identificar sustancias en las células cancerosas o sustancias normales del cuerpo que pueden ayudar a crecer las células cancerosas. El Trastuzumab es un anticuerpo monoclonal derivado de ADN recombinante humano, dirigido de forma selectiva al sitio de acción extracelular de la proteína del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2). Este anticuerpo es una IgG1 que contiene regiones estructurales humanas que se complementan con las regiones determinantes de un anticuerpo anti-p185-HER2 murino que se enlaza al receptor HER2. El protooncogen *HER2* o *c-erbB2* codifica para una única proteína transmembranal receptora de 185 kDa, que se encuentra estructuralmente relacionada con el receptor del factor de crecimiento epidérmico. En 25-30% de los cánceres de mama primarios se ha encontrado sobreexpresión del gen *HER2*. Una consecuencia de la amplificación del gen *HER2* es un incremento en la expresión de la proteína HER2 en la superficie de las células tumorales, lo

cual da como resultado un receptor HER2 constitutivamente activo. Los estudios indican que las pacientes cuyos tumores presentan una amplificación o sobreexpresión de HER2 tienen una supervivencia, libre de enfermedad, más corta que la de aquellos que presentan tumores sin amplificación o sobreexpresión de HER2. Tanto en los estudios *in vitro* como en la experimentación animal, se ha comprobado que el Trastuzumab inhibe la proliferación de las células tumorales humanas con sobreexpresión de HER2. Se ha demostrado *in vitro* que la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos mediada por el Trastuzumab afecta más a las células cancerosas con sobreexpresión de HER2 que a las células cancerosas sin sobreexpresión de HER2 (INCU).

#### **1.1.9. Microarreglos de ADN usados en la detección del cáncer de mama**

La tecnología de microarreglos de ADN (TMA), se describió por primera vez en 1998 (Vieira *et al.*, 2008), constituyendo una de las herramientas más versátiles y poderosas que nos permiten medir en una escala global, los cambios en los patrones de expresión génica de distintos tipos celulares en diversas condiciones, tales como salud y enfermedad. Gracias a esta tecnología, se ha mejorado el diagnóstico y la posibilidad de tratar de manera adecuada a muchos pacientes, se han identificado nuevos marcadores potenciales para terapia y existe un mejor entendimiento en los mecanismos moleculares de las enfermedades, especialmente del cáncer.

Los tratamientos actuales como la radioterapia y quimioterapia no toman en cuenta la actividad de genes específicos para cada paciente y no permiten abatir satisfactoriamente los efectos de esta enfermedad. Por ende, es necesario recurrir a tecnologías alternas como la determinación de los perfiles de expresión génica empleando microarreglos para identificar marcadores relevantes en la patogénesis que serán de gran valor para el diagnóstico, pronóstico y terapia dirigida contra el cáncer de mama desde una perspectiva molecular.

Gracias a la determinación de perfiles de expresión génica, se ha podido llegar a una nueva clasificación y subclasificación molecular del cáncer, así

como a una predicción clínica y diagnóstico de muchos tipos de cáncer (Wadlow y Ramaswamy 2005). Asimismo, mediante los microarreglos de ADN se han identificado nuevos marcadores potenciales para terapia y existe un mejor entendimiento de los mecanismos moleculares del cáncer (Clarke *et al.*, 2004). Hay estudios clásicos donde se ha demostrado el potencial de la tecnología de los microarreglos; el primero de ellos se hizo para la clasificación molecular precisa de las leucemias agudas mediante un patrón de expresión de 50 genes (Golub *et al.*, 1999). Un excelente ejemplo del uso de los perfiles de expresión génica se ha demostrado en el pronóstico del cáncer de mama. Por medio de un microarreglo de 25,000 oligonucleótidos y 78 muestras de tumores primarios de mama obtenidos de pacientes con estado de nódulos linfáticos negativo a metástasis, se identificó una firma de “mal pronóstico” con tan solo 70 genes (van't Veer *et al.*, 2002). Esta firma corresponde a una alta probabilidad de desarrollar metástasis a corto plazo y muy probablemente morir por esta enfermedad. Lo interesante de este estudio radica en que los tumores no se hacen “buenos o malos” conforme progresa la enfermedad, como se proponía hace pocos años con el modelo del desarrollo clonal, sino que una célula maligna desde muy temprano está predestinada a provocar metástasis. Gracias a dicha firma génica, se puede decidir qué pacientes deben tomar la terapia adyuvante que puede consistir en tamoxifeno. Este mismo estudio fue validado con 217 muestras nuevas, en las que reconfirmaron que la firma de 70 genes es el mejor criterio para decidir si una paciente requiere terapia adyuvante o no (van de Vijver *et al.*, 2002). En el presente existen “kits” comerciales que sirven para tomar esta decisión aunque no han sido aprobados del todo y su precio es alto (Garber, 2004). Aunque esta tecnología ha permitido definir al menos cinco distintos subgrupos de cáncer de mama: Luminal A, luminal B, sobreexpresión de HER-2, basal y normal, también existen distintas plataformas de microarreglos de DNA que permiten tratar, de una forma personalizada, a pacientes con cáncer de mama (Weigelt *et al.*, 2005).

### **1.1.10. ¿Puede el cáncer de mama tener un origen viral?**

La idea de que el cáncer humano es originado por un virus, nació a principios del siglo XX cuando se conoció que la leucemia en las aves era producida por un virus. En relación con el cáncer de mama, la participación de un agente viral en su etiología obedece a que se sabe que un virus es el agente causal del cáncer de mama en el ratón y que otro virus fue identificado, en el mismo padecimiento en el primate, los virus asociados con el cáncer de mama pertenecen a los oncornavirus y pertenecen a la familia de los retrovirus. Se clasifican en seis tipos que van del A al F, el tipo B es el que produce el cáncer de mama en ratón y el D, en el primate. En 1936, Bittner encontró en la leche de ratones un virus que lleva su nombre y es el prototipo del oncornavirus B, agente que convierte ratones con reducida frecuencia de cáncer de mama (C57 BL) en cepas de frecuencia aumentada al ser amamantados por madres con cepas de frecuencia incrementada de cáncer de mama (C3).

Estudios con microscopía electrónica han mostrado la presencia ocasional de partículas virales en el tejido de mama y en la leche humana, que no han permitido un estudio bioquímico por su escasa magnitud y por la dificultad para diferenciarlas de los restos celulares; sin embargo no se han establecido diferencias significativas entre los hallazgos en tejido de mama tumoral y normal, así como entre la leche de mujeres de alto riesgo comparadas con pacientes de riesgo bajo de cáncer de mama .

Las pruebas actuales señalan que los oncornavirus del tipo A y B se encuentran dentro del complejo etiológico multifactorial del cáncer de mama en el ratón y en algunos primates, pero falta por determinar el papel preciso de estos virus en la etiología del cáncer humano.

## 1.2. Proteómica

A pesar de la existencia de los microarreglos existen otras técnicas dedicadas a la lucha contra el cáncer de mama, tal es el caso de la tecnología proteómica que ha permitido realizar varios estudios para combatir el cáncer de mama.

La proteómica que es una tecnología poderosa e indispensable en la biología molecular, ha entrado en los archivos de la biomedicina con claras esperanzas para la identificación de marcadores patológicos y blancos terapéuticos. Actualmente las herramientas proteómicas permiten el alto rendimiento de los análisis para la detección, identificación e investigación funcional de proteínas (Hondermarck, 2003).

La tecnología Proteómica es usada para identificar los componentes de pequeños complejos proteicos y de grandes organelos, se basa principalmente en las técnicas de separación de proteínas mediante métodos electroforéticos y cromatográficos, preparación de las muestras para su análisis y finalmente el análisis e identificación de las proteínas por espectrometría de masas (MS) (Batista, 2000).

Algunas de las mayores ventajas de la proteómica es que puede trabajar con mezclas complejas, tan complejas como extractos celulares totales, necesita sólo de un análisis parcial de las secuencias de las proteínas y hace énfasis en la identificación de las proteínas mediante la comparación de las secuencias parciales de péptidos en una base de datos de proteínas, es por esto que se han desarrollado otras técnicas complementarias para alcanzar dichos objetivos como la cromatografía líquida de alta resolución combinada con la espectrometría de masas en tándem (HPLC 2D-MS/MS), la cual permite analizar cientos o miles de proteínas directamente a partir de mezclas proteicas ("*shot gun*") (Aebersold y Goodlett, 2003; Washburn *et al.*, 2001).

La identificación analítica de una proteína mediante proteómica está basada en el hecho fundamental de que aún cuando muchas proteínas comparten

dominos, la mayoría de las secuencias de péptidos de aproximadamente seis o más aminoácidos son en su mayoría únicas en el proteoma de un organismo. Por consiguiente, si podemos obtener la secuencia de un péptido o si podemos medir con suficiente exactitud su masa molecular, entonces es factible identificar la proteína de donde procede en una base de datos de secuencias de proteínas. Sin embargo, es necesario identificar varios polipéptidos para tener certeza sobre la proteína identificada. Si las secuencias de varios péptidos caen dentro de una secuencia de un mismo polipéptido, entonces estas secuencias son suficientes para la identificación de la proteína de la cual se generaron los péptidos. Entre más péptidos se identifiquen para un polipéptido determinado (porcentaje de la secuencia cubierta) mayor certeza se tendrá en la identificación de la proteína (Luna y Orozco, 2008).

### **1.3. Espectrometría de masas**

La MS es un método utilizado para la identificación de proteínas y es la base tecnológica fundamental para la proteómica.

La clave de la tecnología proteómica basada en esta técnica es la secuenciación de péptidos, ya que el espectrómetro de masas tiene más sensibilidad en péptidos que en proteínas, debido a que las proteínas son más difíciles de manejar, no todas son solubles bajo las mismas condiciones y pueden ser modificadas o alteradas provocando efectos de combinación determinando la masa de diversas isoformas (Steen y Mann 2004).

La espectrometría de masas, también llamada espectroscopia de masas, utiliza el movimiento de iones en campos eléctricos y magnéticos para clasificarlos de acuerdo a su relación masa/carga ( $m/z$ ). De esta manera es una técnica analítica por medio de la cual las sustancias químicas se identifican separando los iones gaseosos en campos eléctricos y magnéticos. Los instrumentos usados en estos estudios se llaman espectrómetros de masas los cuales realizan esta operación y utiliza medios eléctricos para detectar los iones clasificados (Simpson, 2003).



La MS brinda información cualitativa y cuantitativa acerca de la composición atómica y molecular de materiales orgánicos e inorgánicos.

Los espectrómetros de masas consisten en un conjunto de componentes modulares esenciales (Figura 5):

a) Fuente de ionización

La fuente de iones (o fuente de ionización) es el elemento del espectrómetro que ioniza el material a ser analizado (*el analito*). Luego los iones son transportados a través de los campos magnéticos o eléctricos al analizador total.

Las técnicas para la ionización han sido las dominantes para determinar qué tipos de muestras se pueden analizar por espectrometría de masas. La ionización del electrón y la ionización molecular se utilizan en los gases y los vapores.

Existen diversas fuentes de ionización como son: ESI, MALDI, APCI, APPI, DESI y SELDI, así que me enfocaré a los dos más utilizados:

### 1.3.1 ESI (Ionización por Electrospray)

En el sistema de ionización por electrospray o aerosol, la muestra que contiene péptidos o proteínas en solución (generalmente acetonitrilo, ácido acético, agua, etc.) se inyectan a un HPLC a través de una aguja con un diámetro muy pequeño (un capilar de 2-5 cm de diámetro interno) en la presencia de un campo eléctrico alto (típicamente de 3 a 5 kVoltios) para formar pequeñas gotitas (spray o aerosol) que contienen a los iones cargados los cuales, son desolvatados, es decir, se les elimina el solvente con la ayuda de un gas inerte como el nitrógeno que fluye en contracorriente al desplazamiento de los iones. Cuando la densidad de carga en la superficie de las gotitas supera el límite de estabilidad de *Rayleigh* entonces se produce una repulsión de cargas produciéndose una explosión de la gota (explosión coulombica) lo cual genera que los iones estén ahora en una fase gaseosa. Una característica del sistema de ionización por *electrospray* es que se forman especies multicargadas. Por lo general, para el caso de péptidos (<2 kDa) tenemos especies iónicas con una o dos cargas, mientras que en el caso de proteínas (>2 kDa) se producen especies iónicas multicargadas (Luna y Orozco, 2008) (Fig. 3).

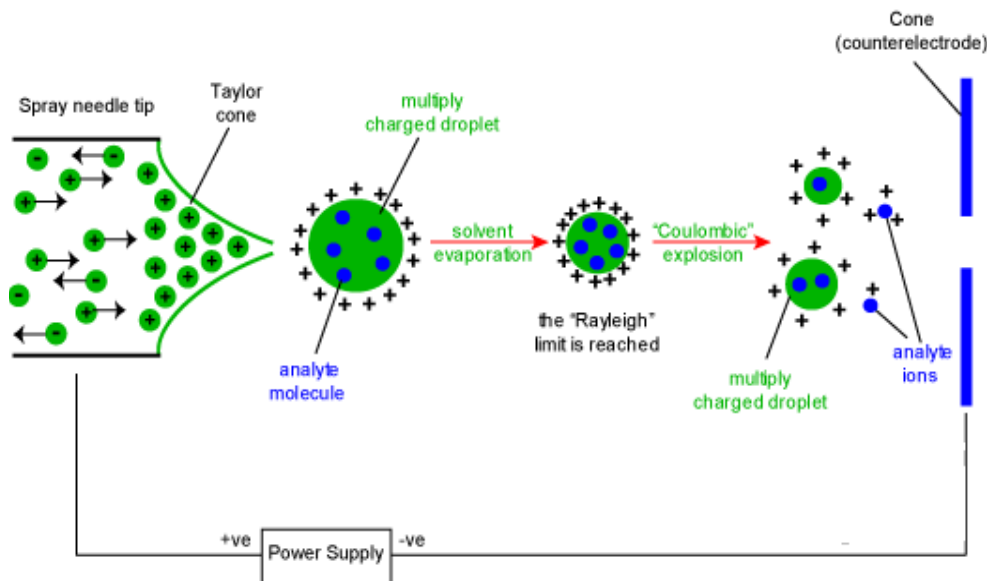


Figura 3. Ionización *Electrospray* (ESI) en donde se generan gotas multicargadas (péptidos) que son desolvatadas por un gas en contra flujo (nitrógeno) dándose la explosión de Coulomb, la cual generará partículas más pequeñas, listas para su análisis.

### 1.3.2. MALDI (Desorción/Ionización por láser asistida por matriz)

En el sistema MALDI, la muestra que se va a analizar se mezcla con una matriz química (aproximadamente en una relación molar analito/matriz de 1/1,000), el cual está formado por moléculas orgánicas pequeñas que contienen un fluorocromo que absorbe luz a una longitud de onda específica. Las matrices más utilizadas son el ácido 2,5-dihidroxi-benzoico, el ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico (ácido sinapínico) y el ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico. Una vez hecha la mezcla, se deposita en pequeños discos y se deja que seque. La evaporación del solvente permite la formación de una matriz cristalina que contiene a las proteínas o a los péptidos. Posteriormente, el disco se coloca en un soporte del equipo para que se haga incidir un haz de luz (generalmente de un láser) para que la matriz absorba los fotones y se excite electrónicamente. Los electrones generados se transfieren entonces a los péptidos o proteínas presentes en la muestra formándose iones los cuales son extraídos a una fase gaseosa y

acelerados hacia el analizador de masas con la ayuda de un campo eléctrico alto (típicamente de alrededor de 30 kV) aplicado entre el soporte de la muestra y un orificio del analizador de masas. El proceso de ionización genera iones positivos y negativos, dependiendo de la naturaleza de la muestra. En el caso de péptidos y proteínas, los iones que se forman tienen carga positiva debido a la transferencia de un protón. Al tener un péptido con una masa molecular  $M$  de 1566.9 Da, la especie con una carga  $[M+H]^+$  (que significa que ha ganado un protón) tendrá una relación  $m/z$  de 1567.9 (1566.9 Da del péptido más 1 dalton correspondiente al protón, que al dividirse entre un valor de  $z = 1$  produce el valor de 1567.9) y para la especie con dos cargas  $[M+H]^{2+}$  tendrá un valor  $m/z$  de 784.7 (que se obtiene de sumar 1566.9 Da más 2 daltones por los dos protones ganados, dividido entre  $z = 2$ , para producir el valor de 784.45, el cual es muy cercano al valor calculado experimentalmente de 784.7) (Fig. 4).

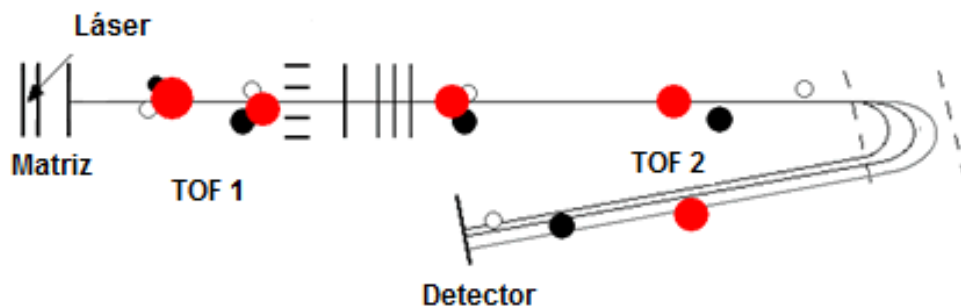


Figura 4. En la ionización MALDI (Desorción/ionización por láser asistida por matriz) los analitos cocrystalizados con una matriz apropiada son convertidos en iones mediante la acción de un láser. Esta fuente de ionización suele asociarse a un analizador de tiempo de vuelo (TOF, Time-Of-Flight) en el que los iones se separan en función de su relación masa-carga tras ser acelerados en un campo eléctrico.

#### b) Analizador de masas

El analizador de masa es la pieza más flexible del espectrómetro de masa. Utiliza un campo eléctrico o magnético para afectar a la trayectoria o velocidad de las partículas cargadas de una cierta manera. Existen diversos analizadores como: cuadrupolo, cuadrupolo trampa de iones, trampa de iones lineal, TOF, TOF-TOF, sector magnético y resonancia magnética de ciclotrón.

#### c) Detector

Los iones de un valor de  $m/z$  en particular pasan del analizador de masas al detector, siendo este último la parte final del espectrómetro de masas. La magnitud de la corriente producida al detector como una función de tiempo es usada para determinar la intensidad (abundancia) y el valor de  $m/z$  del ión. En general las abundancias relativas de iones generados en la fuente de ionización son medidas en el detector, y los resultados son manifestados en valores de  $m/z$  como abscisa y la abundancia de iones como ordenada.

#### d) Procesador y Registrador de datos

Los espectrómetros de masas pueden producir dos tipos de información: la masa de una molécula y la masa de los iones derivados de la molécula principal que permitió la fragmentación, datos que son especialmente valiosos para determinar la secuencia de algún péptido u otras biomoléculas.

La MS es muy sensible (alcanzando niveles de femtomoles y de subfemtomoles) y puede fragmentar los péptidos en segundos permitiendo así una mayor eficiencia en el manejo de la muestra y resultados mucho más rápidos.

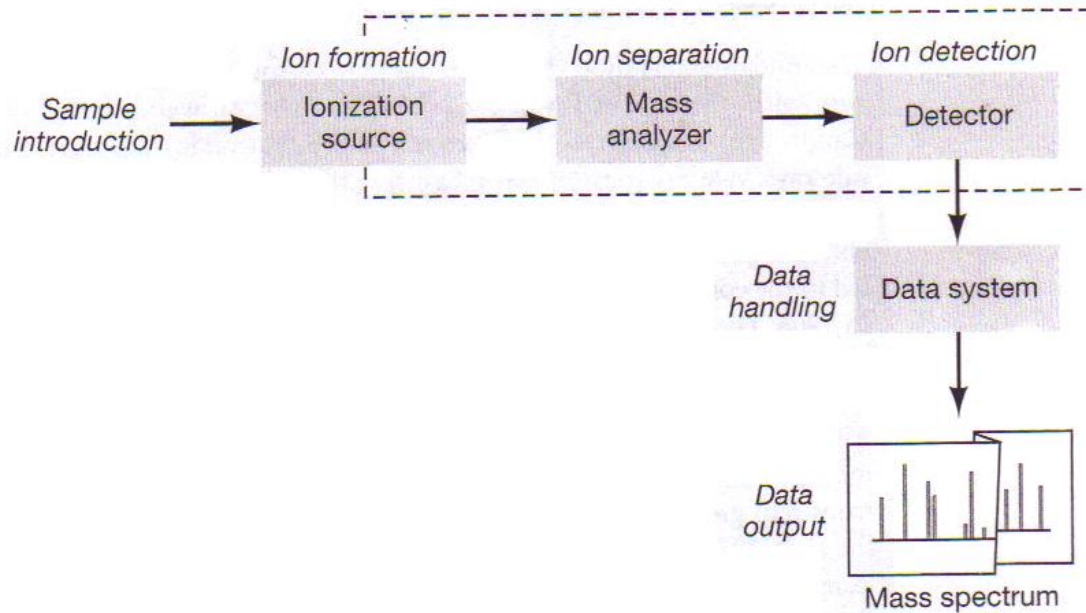


Figura 5. Componentes modulares de un espectrómetro de masas.

#### 1.4. Biomarcadores

El análisis del patrón proteómico ha sido desarrollado como una manera de identificar novedosos biomarcadores (Abramovitz y Leyland-Jones, 2006), definidos como cualquier molécula que proporcione una correlación con un fenotipo particular o perturbación de un sistema biológico. El término *biomarcador* (o marcador tumoral, para el caso de tumores) ha llegado a descubrir una variedad de moléculas o procesos que difieren entre células normales a malignas, así como en tejidos o fluidos de pacientes sanos y con enfermedades. Varios estudios de proteómica han permitido la identificación de biomarcadores, como el que realizó Unwin y col. en el 2003 en donde encontró la timidina fosforilasa, anexina I y II, y cofilina como biomarcadores para carcinoma renal y Whiteaker y col. en el 2007 encontraron la fibulina2 y la ostiopontina como bioarcadores de plasma en cáncer mamario en ratón.

Los marcadores tumorales pueden incluir cambios en el nivel genético (p.ej. mutaciones, deleciones, amplificaciones), en el nivel transcripcional (p.ej. sobre o mínima expresión), en el nivel de traducción o postraducción (p.ej. incremento o decremento en las cantidades de proteína o glucolisación anormal de proteínas)

y/o en el nivel funcional (p.ej. descripción histológica de un grado celular o presencia de neovascularización) (Bronchud *et al*, 2004).

La respuesta diferente a los tratamientos y la evolución de las pacientes con tumores clínica y patológicamente similares, con probabilidad se debe a diferencias moleculares de esos tumores. De aquí la hipótesis de que un análisis molecular detallado de los cánceres pueda llevarnos a desarrollar pruebas diagnósticas más seguras que los modelos disponibles hasta ahora, o bien, que los complementen. Así se han definido dos tipos de marcadores: de *pronóstico* (para identificar pacientes con buen pronóstico y altas probabilidades de curarse y terapias locorregionales) y de *predicción* (pruebas que nos permiten detectar individuos que se pueden beneficiar con un fármaco o un esquema específico de tratamiento (Rodríguez-Cuevas y Luna, 2007).

Las proteínas como biomarcadores han impactado drásticamente el cuidado del paciente con cáncer, conduciendo al desarrollo y uso directo de blancos hormonales y terapias con anticuerpos (Whiteaker *et al*, 2007), ya que los biomarcadores pueden ser usados para desarrollar herramientas de exploración con suficiente sensibilidad y especificidad para detectar el cáncer en la población en general, ayudando al diagnóstico clínico, pronóstico e identificación del cáncer para pacientes con una enfermedad constante o metastásica (Bronchud *et al*, 2004), es por esto que el interés en las estrategias proteómicas para la identificación de biomarcadores se aumentó en los últimos años, abriendo grandes expectativas para el tratamiento del cáncer de mama.

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN.

### 1.- Cáncer

Hoy en día el cáncer se considera como una de las enfermedades más mortales producida por la acumulación de numerosas, variadas y frecuentes alteraciones moleculares, que causan la proliferación celular con la adquisición de un incremento invasivo y un fenotipo resistente, así como también la inestabilidad genética en la célula (Bertucci *et. al.*, 2006).

Dichas alteraciones en la célula ocurren normalmente en el organismo pero generalmente el sistema inmune las controla; sin embargo, en algunos casos las células anormales no son destruidas, se multiplican a una velocidad asombrosa y forman tumores. Un tumor situado en una zona concreta y limitada del cuerpo no suele constituir un peligro vital. Por el contrario, cuando el cáncer se extiende (metástasis) resulta una amenaza para la vida. Alrededor del 90% de los procesos cancerosos tienen su origen en la metástasis. Para facilitar la penetración en los órganos, las células cancerosas segregan unas enzimas que descomponen el tejido conjuntivo circundante, allanando así el camino hacia otros órganos del cuerpo, además estimulan la angiogénesis, lo que facilita su oxigenación.

La transformación de células normales a malignas consiste en la adquisición progresiva de una serie de cambios genéticos específicos que actúan desobedeciendo los mecanismos antitumorales que existen en todas las células, como son la regulación de la transducción de señales, la diferenciación celular, la apoptosis, la reparación del ADN, la progresión del ciclo celular, la angiogénesis, la funcionalidad de los genes supresores tumorales (*p53*, *BRCA1* y *BRCA 2*) e incluso se ha llegado a creer que este mal radica en las células madre, las cuales, han llegado a ser famosas por su capacidad de sanar, generando esperanzas de que un día puedan curar el mal de Parkinson, lesiones a la médula espinal y una amplia variedad de males. Sin embargo, hoy en día, un creciente número de investigadores está llegando a la conclusión de que las células madre son también

la fuerza oculta detrás del cáncer; todo esto hace posible brindar características específicas a las células, tales como: absorber cantidades anormalmente altas de azúcares, tener una tasa elevada de metabolismo anaeróbico, cambios en la membrana, poseer antígenos tumorales que les confieren propiedades inmunológicas específicas y la más evidente, el crecimiento incontrolado (Torres, 1986).

En el 2006, el cáncer fue la tercera causa de muerte en México con 63 888 defunciones, representando el 12.9% del total de muertes registradas (Figura 1) (INEGI, 2008).

**Porcentaje de defunciones generales y por sexo causadas por tumores malignos, 1997-2006**

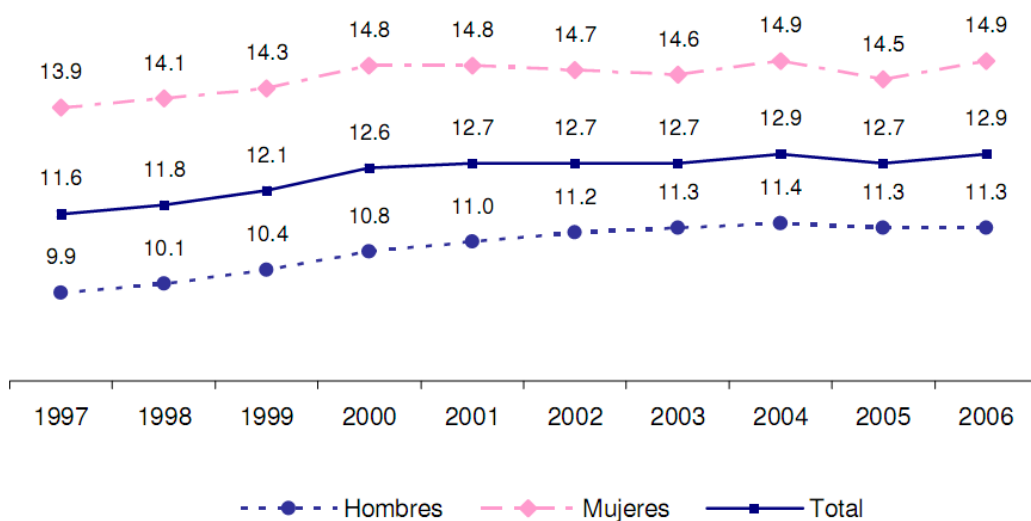


Figura 1. Porcentaje de defunciones generales y por sexo causadas por tumores malignos (Cáncer) de 1997 al 2006 en México. El porcentaje está en relación con el total de defunciones registradas en cada año. Fuente: INEGI. Estadísticas Vitales, 1997-2006.

La Organización Mundial de la Salud (OMS), estima que alrededor de 84 millones de personas morirán a causa de esta enfermedad entre 2005 y 2015. Asimismo, la mortalidad más alta es debida al cáncer de pulmón, seguido por el de estómago,



hígado, colon y mama; por sexo las incidencias más frecuentes en los hombres son por cáncer de pulmón, estómago, hígado, colon-recto, esófago y próstata; y para las mujeres el de mama, pulmón, estómago, colon-recto y cuello uterino (OMS, 2009).

## **1.1. Cáncer de mama**

El cáncer de mama es el resultado de la transformación maligna de las células epiteliales que forman el sistema ducto-lobulillar de la glándula mamaria. El cáncer de mama es la mayor causa de mortalidad entre la población femenina en el mundo (Boyle et al., 2003).

### **1.1.1. ¿Cómo se detecta el cáncer de mama?**

Históricamente la primera presentación de un cáncer de mama era la presencia de un nódulo palpable o un cambio físico externo en la mama detectado por el propio paciente. En la actualidad, los programas de detección precoz permiten detectar anomalías radiológicas no palpables por la mujer que además, en muchos casos, son asintomáticas.

El diagnóstico temprano de tumores efectuado por medio de autoexamen o con exploración periódica realizada por el médico, constituye la mejor alternativa que una mujer tiene para sobrevivir en caso de presentar un cáncer de mama (Trujillo, 1999).

### **1.1.2. Anatomía de la mama.**

El seno se compone de la porción glandular, que está involucrada en la producción y transporte de leche, de tejido conectivo y estroma. La parte glandular de la mama tiene de 15 a 20 lóbulos, dentro de cada uno hay gran cantidad de lobulillos o pequeños lóbulos terminando en docenas de diminutos bulbos que pueden producir leche (Figura 1). Los lobulillos terminan en el pezón y están unidos por delgados tubos llamados ductos. Las células formadoras de ductos y lobulillos son células epiteliales que tienen la función de producir y secretar varios constituyentes de la leche.

Las células epiteliales tienen una capa de células microepiteliales adjuntas a una membrana basal la cual se encarga de mantener la estructura de los ductos y lobulillos. Estos últimos son rodeados de tejido conectivo y adiposo los cuales presentan otros componentes como: fibroblastos, células endoteliales, fibras nerviosas, adipositos así como vasos sanguíneos y linfáticos que irrigan la glándula mamaria (Hondermark, 2003).

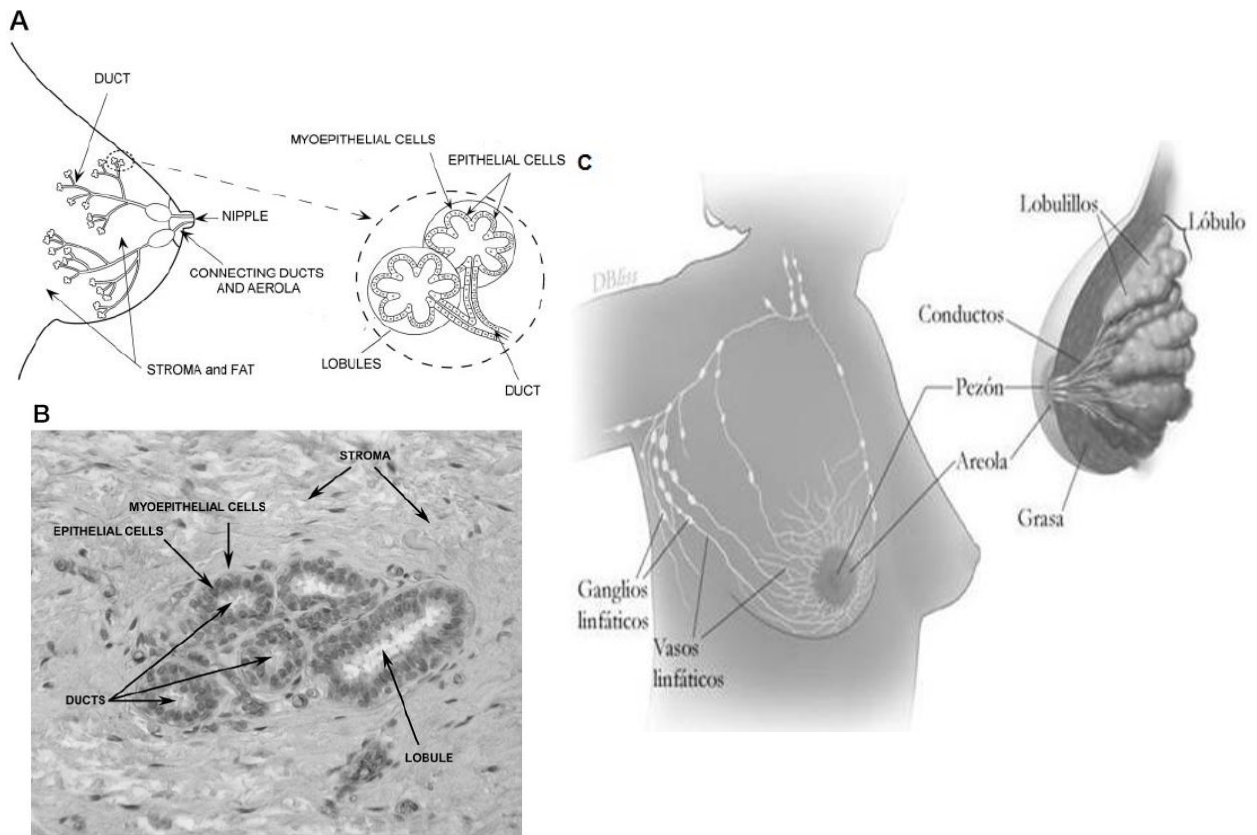


Figura 2. Anatomía (A,C) e histología (B) de la glándula mamaria (Hondermark, 2003).

### **1.1.3. Tipos de cáncer de mama según la localización anatómica en la mama (Rica, 2004):**

#### **Carcinoma ductal *in situ* (CDIS):**

Es un trastorno precanceroso no invasivo, donde se encuentran células anormales en el revestimiento del ducto. Se origina en las células de las paredes de los conductos mamarios. Es un cáncer muy localizado, que no se ha extendido a otras zonas. Por este motivo, puede extirparse fácilmente; es decir, a veces el CDIS se convierte en un tipo de cáncer invasivo mamario, aunque se desconoce cómo predecir cuáles lesiones se convertirán en invasivas. La cifra de curación en las mujeres que presentan este tipo de cáncer ronda el 100%. Este tipo de tumor se puede detectar a través de una mamografía.

#### **Carcinoma ductal infiltrante o invasivo:**

Se inicia en el conducto mamario pero logra atravesarlo y pasa al tejido adiposo de la mama; tiene una alta probabilidad metastásica en otras partes del organismo. Es el más frecuente de los carcinomas de la mama, aproximadamente en 80% de los casos.

#### **Carcinoma lobular *in situ* (CLIS):**

Se origina en las glándulas mamarias o en los lóbulos y aunque no es un cáncer “verdadero”, aumenta el riesgo de que el paciente pueda desarrollar un cáncer en el futuro; pero rara vez llega a ser cáncer invasivo. En la mujer, suele darse antes de la menopausia. Una vez detectado, y según las recomendaciones de la OMS, es importante que la mujer se realice una mamografía de control al año y varios exámenes clínicos para vigilar el posible desarrollo de cáncer.

#### **Carcinoma lobular infiltrante o invasivo:**

Se origina en las glándulas mamarias pero se puede extender y destruir otros tejidos del cuerpo. Entre 10% y 15% de los tumores de mama son de este tipo. Este carcinoma es más difícil detectarlo a través de una mamografía.

#### Carcinoma inflamatorio:

Es poco común, tan sólo se presenta en un 1% del total de los tumores cancerosos de la mama. Es agresivo y de crecimiento rápido. Hace enrojecer la piel de la mama y aumentar su temperatura. La apariencia de la piel se vuelve gruesa y ahuecada, como la de una naranja y pueden aparecer arrugas y protuberancias en ella; estos síntomas son debidos al bloqueo que producen las células cancerosas sobre los vasos linfáticos.

#### **1.1.4. Estadios del cáncer de mama (FEFOC, 2001)**

Estadio I y Estadio II son estadios iniciales del cáncer de mama, pero el cáncer ya ha invadido los tejidos próximos. En el estadio I las células cancerosas no se han extendido más allá de la mama y el tumor no mide más de 2 centímetros en su mayor dimensión.

El estadio II significa que el cáncer ha invadido los ganglios linfáticos axilares y/o el tumor en la mama mide más de 2 centímetros pero menos de 5 centímetros en su mayor extensión. A las mujeres con estadios iniciales (I o II) de la enfermedad se les practica cirugía conservadora seguida de radioterapia como primer tratamiento local, o bien mastectomía. La elección de cirugía conservadora o mastectomía depende principalmente del tamaño y localización del tumor, el tamaño de la mama de la mujer, ciertas características de la mamografía, y de cómo se siente la mujer sobre la preservación de su mama. En cualquiera de los dos casos los ganglios linfáticos axilares se suelen extirpar. Algunas mujeres en estadio I y la mayoría de mujeres en estadio II reciben quimioterapia y/o hormonoterapia.

Estadio III, también llamado cáncer localmente avanzado. El tumor en la mama es grande (más de 5 centímetros de diámetro máximo), se extiende a los ganglios linfáticos axilares, o se ha diseminado a los ganglios linfáticos de otras zonas o a otros tejidos cercanos a la mama. El carcinoma inflamatorio de la mama es uno de los tipos de cáncer de mama localmente avanzado.

Las pacientes en estadio III de la enfermedad suelen recibir un tratamiento local con el fin de extirpar o destruir el cáncer en la mama, y un tratamiento sistémico

para impedir la diseminación de la enfermedad. El tratamiento local puede consistir en cirugía y/o radioterapia en la mama y axila. El tratamiento sistémico puede ser quimioterapia, hormonoterapia, o ambos; y puede ser aplicado antes o después del tratamiento local.

Estadio IV es el cáncer metastásico. El cáncer ha diseminado desde la mama hacia otros órganos del cuerpo. Las mujeres que están en el estadio IV del cáncer de mama reciben quimioterapia y/o hormonoterapia para reducir el tumor o destruir células cancerosas. Pueden recibir tratamiento quirúrgico o radioterapia para controlarlo. La radioterapia también puede ser útil para el control de los tumores en otras partes del cuerpo.

#### **1.1.5. Epidemiología**

El cáncer de mama muestra ser uno de los más frecuentes y mortales, siendo una de las enfermedades más complejas ya que en algunos países toma gran importancia por sus altas tasas de incidencia mientras en otros lugares se presenta en forma más esporádica, aproximadamente con una estimación de 1,200,000 nuevos casos en el 2004 a nivel mundial (19% del total de los cánceres en la mujer) (Ferlay *et al.* 2002). Su frecuencia varía ampliamente, siendo más alta en los países norteamericanos y europeos mientras que Asia y África tienen la más baja (Metzlin, 1999). Los países latinoamericanos, también tienen una baja frecuencia y mortalidad a excepción de Argentina y Uruguay los cuales tienen tasas semejantes a la de los países europeos, ya que el origen de su población es mayoritariamente europea a diferencia del resto de los países latinoamericanos donde existe un mestizaje entre indígenas, europeos y negros. En México, corresponde a la primera neoplasia maligna más frecuente en mujeres y a la segunda causa de defunción por enfermedades neoplásicas teniendo más impacto en mujeres mayores de 35 años, ya que la edad es uno de los factores de riesgo conocidos para padecer cáncer de mama. En México suele manifestarse a partir de los 20 años de edad y su frecuencia se incrementa hasta alcanzar los 40 y 54

años (Rodríguez y Carpuso, 2006) una década antes que las mujeres europeas o estadounidenses (51 vs 63 años de edad, respectivamente).

#### **1.1.6. Estadísticas**

La estadística mundial señala más de un millón de casos nuevos cada año (Ferlay *et al.*, 2002), por tanto, este tipo de cáncer representa un problema de salud pública porque es la principal causa de muerte en mujeres en todo el mundo (Sandoval y Cárdenas, 2005). Una de cada ocho mujeres tiene riesgo de padecer cáncer de mama a lo largo de la vida (12.2%) y una de cada 28 de morir por esta enfermedad, según la Sociedad Americana del Cáncer.

La mortalidad por cáncer mamario en nuestro país ha mantenido una tendencia ascendente en los últimos 20 años representando 12,953 casos o el 15.2% del total de las neoplasias malignas en la mujer mexicana (FUCAM, 2004; INEGI, 2008). Existen incluso estados donde el cáncer de mama ha rebasado ya al carcinoma cervicouterino como primera causa de mortalidad en mujeres, como es evidente en el estado de Jalisco donde desde 1997 el cáncer de mama ocupa el primer lugar, con una tasa de mortalidad de 15.82% por 100,000 mujeres (Rodríguez y Cuevas, 1999). En México, hoy en día mueren 7 mujeres por día, por esta causa se calcula que dentro de 3 años serán 10 mujeres por día (Harri *et al.*, 1992; Ruiz, 2001). El 47% de las mujeres con esta enfermedad mueren en edades de 45 a 64 años, equivaliendo cada muerte a 21 Años de Vida Productivos Perdidos (AVPP). En el 2007 se perdieron 81,669 AVPP con costo de \$3,107,505.00 pesos (FUCAM, 2008).

#### **1.1.7. Factores de riesgo**

Existen múltiples factores por los cuales esta enfermedad puede ser adquirida. Los estrógenos juegan un papel importante en la aparición del cáncer de mama; por tanto, la menarquia antes de los 11 y menopausia después de los 54

años de edad incrementan el riesgo del padecerlo, además de la nuliparidad (Rodríguez y Carpuso, 2006). Del mismo modo, el primer embarazo después de los 30 años de edad se considera un factor de riesgo, pues éste produce un efecto protector, como resultado de la proliferación y diferenciación del tejido mamario durante la gestación (Cnatringius *et al.*, 2005).

La terapia hormonal de reemplazo por tiempo prolongado (periodo mayor de cinco años) incrementa 2% anual el riesgo de padecer cáncer de mama (Rodríguez y Carpuso, 2006). Este riesgo permanece latente cinco años después de suspender el tratamiento; posterior a este periodo, el riesgo se iguala al de las mujeres que nunca recibieron terapia (Singletary, 2003). En las mujeres posmenopáusicas se ha demostrado la asociación entre obesidad y cáncer de mama; se considera que el Índice de Masa Corporal (IMC) de 27 o mayor, para talla normal, y de 25 o mayor para la población de talla baja (150 cm para mujeres) es un factor de riesgo (Martínez-Abundis *et al.* 2004 y Jee *et al.*,2008). Mientras que en la mujer premenopáusica la obesidad tiene relación inversamente proporcional con el desarrollo de cáncer de mama, en la posmenopáusica se convierte en un factor importante (Song *et al.*,2008) pues se asocia con riesgo hasta dos veces mayor que en las mujeres premenopáusicas.

En la mujer posmenopáusica obesa, el tejido adiposo se convierte en el único órgano productor de estrógenos, a través de la aromatización de androstenediona, ya que se altera la unión de éstos con la proteína transportadora de esteroides sexuales, lo que induce elevadas concentraciones de estrógenos libres (Jee *et al.*, 2008). Entre los factores ambientales y estilos de vida, la exposición a la radiación ionizante produce lesiones en el genoma, como hidroxilación de la timina, lo que resulta en formación de dímeros de dicha base nitrogenada y rotura de una o dos cadenas de ADN (Heredia y Bautista, 2007).

El consumo de bebidas alcohólicas se ha identificado como factor de riesgo, ya que entre sus productos se encuentra el acetaldehído, conocido como carcinógeno primario en animales (Blot, 1999). Existe controversia entre la asociación de tabaquismo y cáncer de mama, pues algunos autores señalan que

sus derivados, como el benzopireno, las aminas aromáticas y nitrosaminas, están implicados en la carcinogénesis de la mama (Castaño, 2006) aunque otros no han encontrado ninguna asociación (Lin *et al.*,2008)

Algunos de los factores genéticos que implican mutaciones en genes específicos como:

- a) un polimorfismo en el gen *ER*, ya que en el desarrollo y la progresión del cáncer mamario existe una gran influencia de estrógeno y antiestrógenos. Cuando el estrógeno entra en la célula se fija a la proteína del receptor estrogénico (ER) que migra al núcleo. Esto induce a cambios estructurales como la dimerización del ER, el cual se une al ADN activando la transcripción de los genes regulados por el estrógeno. El antiestrogeno se fija al “*pocket*” del ER disminuyendo la proliferación celular o incluso causando la muerte celular. Un poliformismo en el gen *ER* puede afectar la unión del estrógeno y la regulación del índice de transcripción de algunos genes (Trujillo, 1999).
- b) una mutación germinativa en los genes *BRCA1* y *BRCA2*, que son genes supresores tumorales y que comúnmente tienen la función de controlar el crecimiento y muerte celular, en el cáncer mamario se han identificado más de 200 mutaciones en estos genes (Carvalho, 2004)
- c) una mutación en el gen *p53*, cuyo producto se encarga de reparar el daño al genoma y/o llevar a la célula a apoptosis , dicha mutación codifica productos que fallan en la reparación o en la inhibición del ciclo celular, y pueden promover la proliferación. La proteína no se detecta en grandes cantidades en el tejido de mama normal; sin embargo las mutaciones en el gen *p53* se han hallado en una gran proporción de muestras de ADN de tumores de pacientes con antecedentes familiares de cáncer de mama (Pasqualini, 2002)
- d) la sobreexpresión del receptor tirosina cinasa ErbB2/Neu/Her2 provocando su activación constitutiva y de las vías de transducción de señales, induciendo la formación tumoral; este gen se encuentra amplificado en 10 a



30% de pacientes que padecen de cáncer de mama invasivo, y se encuentra con más frecuencia en el carcinoma ductal *in situ* (60% de los casos) (Trujillo, 1999).

- e) Cambios en otros genes como en el gen *AT* de la ataxia-telangiectasia, *H-ras1* y *PTEN/MMAC* relacionados con el síndrome de Cowden (Hartmann et al., 1997) y en *c-myc* que se encuentra amplificado en 1-56% de los tumores de mama (Pasqualini, 2002).

### **1.1.8. Tratamiento**

Hay muchos tipos de terapias utilizadas para tratar el cáncer de mama. El tratamiento dependerá del tamaño y localización del tumor en la mama, los resultados de los estudios de laboratorio (incluido el análisis de los receptores hormonales), y del estadio (o extensión) de la enfermedad.

Algunos de los tratamientos más utilizados son:

- a) La radioterapia que consiste en utilizar radiaciones de alta energía (gammas), con el fin de dañar las células cancerosas e impedir su crecimiento. Los rayos proceden de material radioactivo situado fuera del cuerpo y dirigido hacia la mama por un equipo (radiación externa). La radiación también puede provenir de material radioactivo colocado directamente en la mama en unos tubos delgados de plástico (implante radioactivo). A veces la paciente recibe ambos tipos de radioterapia.
- b) La quimioterapia es el uso de fármacos para matar las células cancerosas. La quimioterapia para tratar el cáncer de mama suele consistir en una combinación de fármacos que dañan al ADN. Estos pueden ser administrados oralmente o bien, por una inyección intravenosa o a través de un catéter. En cualquiera de los casos, la quimioterapia es un tratamiento sistémico, porque los fármacos entran a la circulación sanguínea y viajan por todo el cuerpo.
- c) La hormonoterapia fue el primer tratamiento que se propuso para enfermedades neoplásicas desde 1986, sin embargo continúa teniendo una función muy importante en el tratamiento del cáncer de mama además de

desempeñar un papel clave en el tratamiento adyuvante de las etapas tempranas del mismo. El tamoxifeno (TAM) es un claro ejemplo de un fármaco más utilizado en el tratamiento hormonal por un lapso de dos a cinco años. El TAM es un modulador selectivo del receptor de estrógenos usado comúnmente durante las dos últimas décadas para el tratamiento y prevención del cáncer de mama (Osborne, 1998) teniendo una eficacia demostrada en la reducción del riesgo de cáncer de mama del 50% (Vogel *et al.*, 2006). Además, en 1998, la FDA (*Food and Drug Administration*) americana también aprobó el uso de TAM para la prevención de cáncer de mama en mujeres con alto riesgo de desarrollar la enfermedad (Fisher *et al.*, 1998). TAM actúa como antiestrogénico en tejido mamario interfiriendo con la actividad de los estrógenos, hormonas femeninas que promueven el crecimiento de las células cancerosas en la mama. Debido a su efecto agonista parcial, el TAM ejerce efectos beneficiosos sobre el metabolismo lipídico y óseo.

- d) La terapia con anticuerpos consiste en la producción de éstos a partir de un tipo único de células del sistema inmunitario, los anticuerpos pueden identificar sustancias en las células cancerosas o sustancias normales del cuerpo que pueden ayudar a crecer las células cancerosas. El Trastuzumab es un anticuerpo monoclonal derivado de ADN recombinante humano, dirigido de forma selectiva al sitio de acción extracelular de la proteína del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2). Este anticuerpo es una IgG1 que contiene regiones estructurales humanas que se complementan con las regiones determinantes de un anticuerpo anti-p185-HER2 murino que se enlaza al receptor HER2. El protooncogen *HER2* o *c-erbB2* codifica para una única proteína transmembranal receptora de 185 kDa, que se encuentra estructuralmente relacionada con el receptor del factor de crecimiento epidérmico. En 25-30% de los cánceres de mama primarios se ha encontrado sobreexpresión del gen *HER2*. Una consecuencia de la amplificación del gen *HER2* es un incremento en la expresión de la proteína HER2 en la superficie de las células tumorales, lo

cual da como resultado un receptor HER2 constitutivamente activo. Los estudios indican que las pacientes cuyos tumores presentan una amplificación o sobreexpresión de HER2 tienen una supervivencia, libre de enfermedad, más corta que la de aquellos que presentan tumores sin amplificación o sobreexpresión de HER2. Tanto en los estudios *in vitro* como en la experimentación animal, se ha comprobado que el Trastuzumab inhibe la proliferación de las células tumorales humanas con sobreexpresión de HER2. Se ha demostrado *in vitro* que la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos mediada por el Trastuzumab afecta más a las células cancerosas con sobreexpresión de HER2 que a las células cancerosas sin sobreexpresión de HER2 (INCU).

#### **1.1.9. Microarreglos de ADN usados en la detección del cáncer de mama**

La tecnología de microarreglos de ADN (TMA), se describió por primera vez en 1998 (Vieira *et al.*, 2008), constituyendo una de las herramientas más versátiles y poderosas que nos permiten medir en una escala global, los cambios en los patrones de expresión génica de distintos tipos celulares en diversas condiciones, tales como salud y enfermedad. Gracias a esta tecnología, se ha mejorado el diagnóstico y la posibilidad de tratar de manera adecuada a muchos pacientes, se han identificado nuevos marcadores potenciales para terapia y existe un mejor entendimiento en los mecanismos moleculares de las enfermedades, especialmente del cáncer.

Los tratamientos actuales como la radioterapia y quimioterapia no toman en cuenta la actividad de genes específicos para cada paciente y no permiten abatir satisfactoriamente los efectos de esta enfermedad. Por ende, es necesario recurrir a tecnologías alternas como la determinación de los perfiles de expresión génica empleando microarreglos para identificar marcadores relevantes en la patogénesis que serán de gran valor para el diagnóstico, pronóstico y terapia dirigida contra el cáncer de mama desde una perspectiva molecular.

Gracias a la determinación de perfiles de expresión génica, se ha podido llegar a una nueva clasificación y subclasificación molecular del cáncer, así

como a una predicción clínica y diagnóstico de muchos tipos de cáncer (Wadlow y Ramaswamy 2005). Asimismo, mediante los microarreglos de ADN se han identificado nuevos marcadores potenciales para terapia y existe un mejor entendimiento de los mecanismos moleculares del cáncer (Clarke *et al.*, 2004). Hay estudios clásicos donde se ha demostrado el potencial de la tecnología de los microarreglos; el primero de ellos se hizo para la clasificación molecular precisa de las leucemias agudas mediante un patrón de expresión de 50 genes (Golub *et al.*, 1999). Un excelente ejemplo del uso de los perfiles de expresión génica se ha demostrado en el pronóstico del cáncer de mama. Por medio de un microarreglo de 25,000 oligonucleótidos y 78 muestras de tumores primarios de mama obtenidos de pacientes con estado de nódulos linfáticos negativo a metástasis, se identificó una firma de “mal pronóstico” con tan solo 70 genes (van't Veer *et al.*, 2002). Esta firma corresponde a una alta probabilidad de desarrollar metástasis a corto plazo y muy probablemente morir por esta enfermedad. Lo interesante de este estudio radica en que los tumores no se hacen “buenos o malos” conforme progresa la enfermedad, como se proponía hace pocos años con el modelo del desarrollo clonal, sino que una célula maligna desde muy temprano está predestinada a provocar metástasis. Gracias a dicha firma génica, se puede decidir qué pacientes deben tomar la terapia adyuvante que puede consistir en tamoxifeno. Este mismo estudio fue validado con 217 muestras nuevas, en las que reconfirmaron que la firma de 70 genes es el mejor criterio para decidir si una paciente requiere terapia adyuvante o no (van de Vijver *et al.*, 2002). En el presente existen “kits” comerciales que sirven para tomar esta decisión aunque no han sido aprobados del todo y su precio es alto (Garber, 2004). Aunque esta tecnología ha permitido definir al menos cinco distintos subgrupos de cáncer de mama: Luminal A, luminal B, sobreexpresión de HER-2, basal y normal, también existen distintas plataformas de microarreglos de DNA que permiten tratar, de una forma personalizada, a pacientes con cáncer de mama (Weigelt *et al.*, 2005).

### **1.1.10. ¿Puede el cáncer de mama tener un origen viral?**

La idea de que el cáncer humano es originado por un virus, nació a principios del siglo XX cuando se conoció que la leucemia en las aves era producida por un virus. En relación con el cáncer de mama, la participación de un agente viral en su etiología obedece a que se sabe que un virus es el agente causal del cáncer de mama en el ratón y que otro virus fue identificado, en el mismo padecimiento en el primate, los virus asociados con el cáncer de mama pertenecen a los oncornavirus y pertenecen a la familia de los retrovirus. Se clasifican en seis tipos que van del A al F, el tipo B es el que produce el cáncer de mama en ratón y el D, en el primate. En 1936, Bittner encontró en la leche de ratones un virus que lleva su nombre y es el prototipo del oncornavirus B, agente que convierte ratones con reducida frecuencia de cáncer de mama (C57 BL) en cepas de frecuencia aumentada al ser amamantados por madres con cepas de frecuencia incrementada de cáncer de mama (C3).

Estudios con microscopía electrónica han mostrado la presencia ocasional de partículas virales en el tejido de mama y en la leche humana, que no han permitido un estudio bioquímico por su escasa magnitud y por la dificultad para diferenciarlas de los restos celulares; sin embargo no se han establecido diferencias significativas entre los hallazgos en tejido de mama tumoral y normal, así como entre la leche de mujeres de alto riesgo comparadas con pacientes de riesgo bajo de cáncer de mama .

Las pruebas actuales señalan que los oncornavirus del tipo A y B se encuentran dentro del complejo etiológico multifactorial del cáncer de mama en el ratón y en algunos primates, pero falta por determinar el papel preciso de estos virus en la etiología del cáncer humano.

## 1.2. Proteómica

A pesar de la existencia de los microarreglos existen otras técnicas dedicadas a la lucha contra el cáncer de mama, tal es el caso de la tecnología proteómica que ha permitido realizar varios estudios para combatir el cáncer de mama.

La proteómica que es una tecnología poderosa e indispensable en la biología molecular, ha entrado en los archivos de la biomedicina con claras esperanzas para la identificación de marcadores patológicos y blancos terapéuticos. Actualmente las herramientas proteómicas permiten el alto rendimiento de los análisis para la detección, identificación e investigación funcional de proteínas (Hondermarck, 2003).

La tecnología Proteómica es usada para identificar los componentes de pequeños complejos proteicos y de grandes organelos, se basa principalmente en las técnicas de separación de proteínas mediante métodos electroforéticos y cromatográficos, preparación de las muestras para su análisis y finalmente el análisis e identificación de las proteínas por espectrometría de masas (MS) (Batista, 2000).

Algunas de las mayores ventajas de la proteómica es que puede trabajar con mezclas complejas, tan complejas como extractos celulares totales, necesita sólo de un análisis parcial de las secuencias de las proteínas y hace énfasis en la identificación de las proteínas mediante la comparación de las secuencias parciales de péptidos en una base de datos de proteínas, es por esto que se han desarrollado otras técnicas complementarias para alcanzar dichos objetivos como la cromatografía líquida de alta resolución combinada con la espectrometría de masas en tándem (HPLC 2D-MS/MS), la cual permite analizar cientos o miles de proteínas directamente a partir de mezclas proteicas ("*shot gun*") (Aebersold y Goodlett, 2003; Washburn *et al.*, 2001).

La identificación analítica de una proteína mediante proteómica está basada en el hecho fundamental de que aún cuando muchas proteínas comparten

dominos, la mayoría de las secuencias de péptidos de aproximadamente seis o más aminoácidos son en su mayoría únicas en el proteoma de un organismo. Por consiguiente, si podemos obtener la secuencia de un péptido o si podemos medir con suficiente exactitud su masa molecular, entonces es factible identificar la proteína de donde procede en una base de datos de secuencias de proteínas. Sin embargo, es necesario identificar varios polipéptidos para tener certeza sobre la proteína identificada. Si las secuencias de varios péptidos caen dentro de una secuencia de un mismo polipéptido, entonces estas secuencias son suficientes para la identificación de la proteína de la cual se generaron los péptidos. Entre más péptidos se identifiquen para un polipéptido determinado (porcentaje de la secuencia cubierta) mayor certeza se tendrá en la identificación de la proteína (Luna y Orozco, 2008).

### **1.3. Espectrometría de masas**

La MS es un método utilizado para la identificación de proteínas y es la base tecnológica fundamental para la proteómica.

La clave de la tecnología proteómica basada en esta técnica es la secuenciación de péptidos, ya que el espectrómetro de masas tiene más sensibilidad en péptidos que en proteínas, debido a que las proteínas son más difíciles de manejar, no todas son solubles bajo las mismas condiciones y pueden ser modificadas o alteradas provocando efectos de combinación determinando la masa de diversas isoformas (Steen y Mann 2004).

La espectrometría de masas, también llamada espectroscopia de masas, utiliza el movimiento de iones en campos eléctricos y magnéticos para clasificarlos de acuerdo a su relación masa/carga ( $m/z$ ). De esta manera es una técnica analítica por medio de la cual las sustancias químicas se identifican separando los iones gaseosos en campos eléctricos y magnéticos. Los instrumentos usados en estos estudios se llaman espectrómetros de masas los cuales realizan esta operación y utiliza medios eléctricos para detectar los iones clasificados (Simpson, 2003).

La MS brinda información cualitativa y cuantitativa acerca de la composición atómica y molecular de materiales orgánicos e inorgánicos.

Los espectrómetros de masas consisten en un conjunto de componentes modulares esenciales (Figura 5):

a) Fuente de ionización

La fuente de iones (o fuente de ionización) es el elemento del espectrómetro que ioniza el material a ser analizado (*el analito*). Luego los iones son transportados a través de los campos magnéticos o eléctricos al analizador total.

Las técnicas para la ionización han sido las dominantes para determinar qué tipos de muestras se pueden analizar por espectrometría de masas. La ionización del electrón y la ionización molecular se utilizan en los gases y los vapores.

Existen diversas fuentes de ionización como son: ESI, MALDI, APCI, APPI, DESI y SELDI, así que me enfocaré a los dos más utilizados:

### 1.3.1 ESI (Ionización por Electrospray)

En el sistema de ionización por electrospray o aerosol, la muestra que contiene péptidos o proteínas en solución (generalmente acetonitrilo, ácido acético, agua, etc.) se inyectan a un HPLC a través de una aguja con un diámetro muy pequeño (un capilar de 2-5 cm de diámetro interno) en la presencia de un campo eléctrico alto (típicamente de 3 a 5 kVoltios) para formar pequeñas gotitas (spray o aerosol) que contienen a los iones cargados los cuales, son desolvatados, es decir, se les elimina el solvente con la ayuda de un gas inerte como el nitrógeno que fluye en contracorriente al desplazamiento de los iones. Cuando la densidad de carga en la superficie de las gotitas supera el límite de estabilidad de *Rayleigh* entonces se produce una repulsión de cargas produciéndose una explosión de la gota (explosión coulombica) lo cual genera que los iones estén ahora en una fase gaseosa. Una característica del sistema de ionización por *electrospray* es que se forman especies multicargadas. Por lo general, para el caso de péptidos (<2 kDa) tenemos especies iónicas con una o dos cargas, mientras que en el caso de proteínas (>2 kDa) se producen especies iónicas multicargadas (Luna y Orozco, 2008) (Fig. 3).



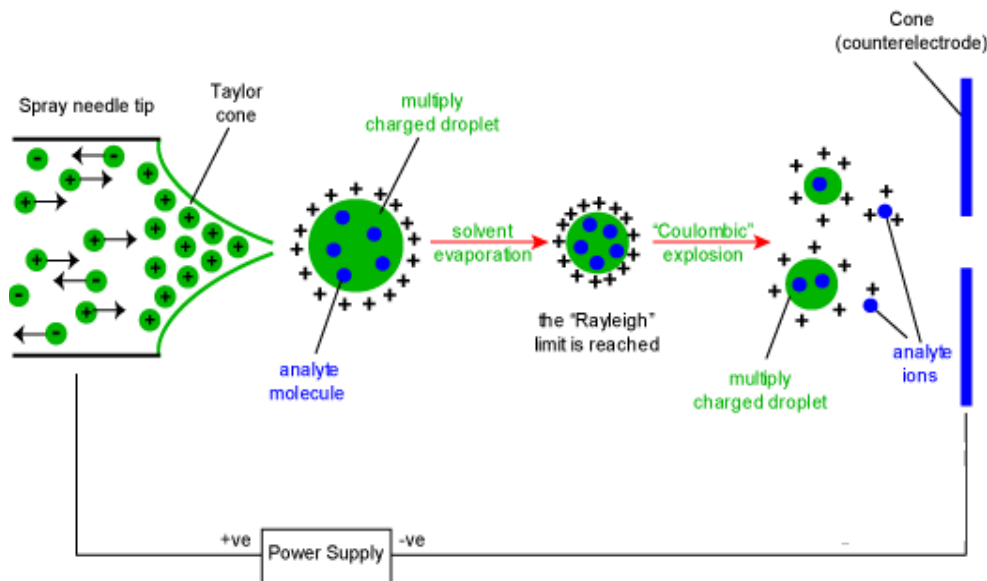


Figura 3. Ionización *Electrospray* (ESI) en donde se generan gotas multicargadas (péptidos) que son desolvatadas por un gas en contra flujo (nitrógeno) dándose la explosión de Coulomb, la cual generará partículas más pequeñas, listas para su análisis.

### 1.3.2. MALDI (Desorción/Ionización por láser asistida por matriz)

En el sistema MALDI, la muestra que se va a analizar se mezcla con una matriz química (aproximadamente en una relación molar analito/matriz de 1/1,000), el cual está formado por moléculas orgánicas pequeñas que contienen un fluorocromo que absorbe luz a una longitud de onda específica. Las matrices más utilizadas son el ácido 2,5-dihidroxi-benzoico, el ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico (ácido sinapínico) y el ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico. Una vez hecha la mezcla, se deposita en pequeños discos y se deja que seque. La evaporación del solvente permite la formación de una matriz cristalina que contiene a las proteínas o a los péptidos. Posteriormente, el disco se coloca en un soporte del equipo para que se haga incidir un haz de luz (generalmente de un láser) para que la matriz absorba los fotones y se excite electrónicamente. Los electrones generados se transfieren entonces a los péptidos o proteínas presentes en la muestra formándose iones los cuales son extraídos a una fase gaseosa y

acelerados hacia el analizador de masas con la ayuda de un campo eléctrico alto (típicamente de alrededor de 30 kV) aplicado entre el soporte de la muestra y un orificio del analizador de masas. El proceso de ionización genera iones positivos y negativos, dependiendo de la naturaleza de la muestra. En el caso de péptidos y proteínas, los iones que se forman tienen carga positiva debido a la transferencia de un protón. Al tener un péptido con una masa molecular  $M$  de 1566.9 Da, la especie con una carga  $[M+H]^+$  (que significa que ha ganado un protón) tendrá una relación  $m/z$  de 1567.9 (1566.9 Da del péptido más 1 dalton correspondiente al protón, que al dividirse entre un valor de  $z = 1$  produce el valor de 1567.9) y para la especie con dos cargas  $[M+H]^{2+}$  tendrá un valor  $m/z$  de 784.7 (que se obtiene de sumar 1566.9 Da más 2 daltones por los dos protones ganados, dividido entre  $z = 2$ , para producir el valor de 784.45, el cual es muy cercano al valor calculado experimentalmente de 784.7) (Fig. 4).

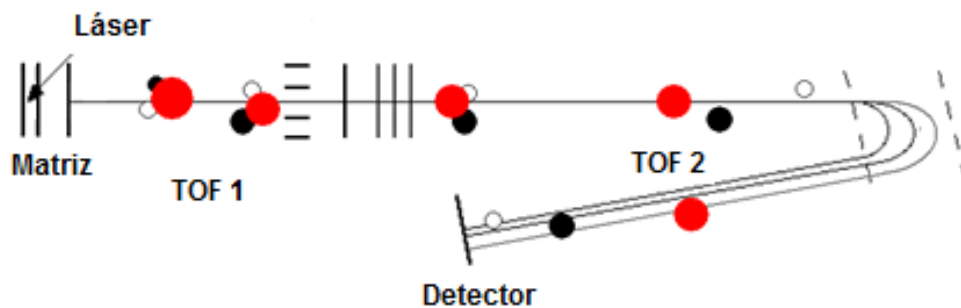


Figura 4. En la ionización MALDI (Desorción/ionización por láser asistida por matriz) los analitos cocristalizados con una matriz apropiada son convertidos en iones mediante la acción de un láser. Esta fuente de ionización suele asociarse a un analizador de tiempo de vuelo (TOF, Time-Of-Flight) en el que los iones se separan en función de su relación masa-carga tras ser acelerados en un campo eléctrico.

#### b) Analizador de masas

El analizador de masa es la pieza más flexible del espectrómetro de masa. Utiliza un campo eléctrico o magnético para afectar a la trayectoria o velocidad de las partículas cargadas de una cierta manera. Existen diversos analizadores como: cuadrupolo, cuadrupolo trampa de iones, trampa de iones lineal, TOF, TOF-TOF, sector magnético y resonancia magnética de ciclotrón.

#### c) Detector

Los iones de un valor de  $m/z$  en particular pasan del analizador de masas al detector, siendo este último la parte final del espectrómetro de masas. La magnitud de la corriente producida al detector como una función de tiempo es usada para determinar la intensidad (abundancia) y el valor de  $m/z$  del ión. En general las abundancias relativas de iones generados en la fuente de ionización son medidas en el detector, y los resultados son manifestados en valores de  $m/z$  como abscisa y la abundancia de iones como ordenada.

#### d) Procesador y Registrador de datos

Los espectrómetros de masas pueden producir dos tipos de información: la masa de una molécula y la masa de los iones derivados de la molécula principal que permitió la fragmentación, datos que son especialmente valiosos para determinar la secuencia de algún péptido u otras biomoléculas.

La MS es muy sensible (alcanzando niveles de femtomoles y de subfemtomoles) y puede fragmentar los péptidos en segundos permitiendo así una mayor eficiencia en el manejo de la muestra y resultados mucho más rápidos.

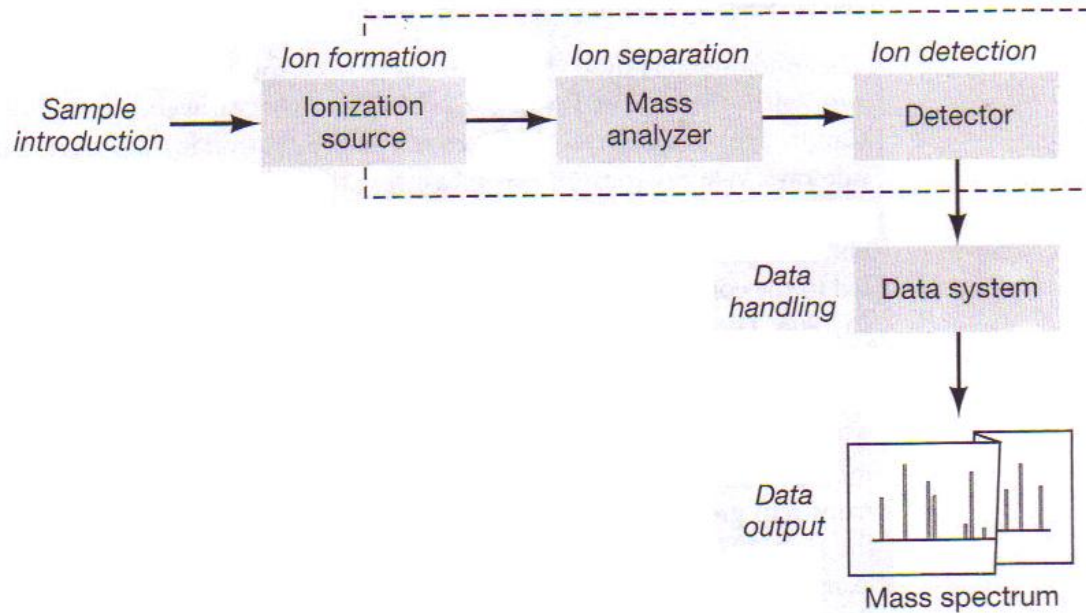


Figura 5. Componentes modulares de un espectrómetro de masas.

#### 1.4. Biomarcadores

El análisis del patrón proteómico ha sido desarrollado como una manera de identificar novedosos biomarcadores (Abramovitz y Leyland-Jones, 2006), definidos como cualquier molécula que proporcione una correlación con un fenotipo particular o perturbación de un sistema biológico. El término *biomarcador* (o marcador tumoral, para el caso de tumores) ha llegado a descubrir una variedad de moléculas o procesos que difieren entre células normales a malignas, así como en tejidos o fluidos de pacientes sanos y con enfermedades. Varios estudios de proteómica han permitido la identificación de biomarcadores, como el que realizó Unwin y col. en el 2003 en donde encontró la timidina fosforilasa, anexina I y II, y cofilina como biomarcadores para carcinoma renal y Whiteaker y col. en el 2007 encontraron la fibulina2 y la ostiopontina como bioarcadores de plasma en cáncer mamario en ratón.

Los marcadores tumorales pueden incluir cambios en el nivel genético (p.ej. mutaciones, deleciones, amplificaciones), en el nivel transcripcional (p.ej. sobre o mínima expresión), en el nivel de traducción o postraducción (p.ej. incremento o decremento en las cantidades de proteína o glucolisación anormal de proteínas)

y/o en el nivel funcional (p.ej. descripción histológica de un grado celular o presencia de neovascularización) (Bronchud *et al*, 2004).

La respuesta diferente a los tratamientos y la evolución de las pacientes con tumores clínica y patológicamente similares, con probabilidad se debe a diferencias moleculares de esos tumores. De aquí la hipótesis de que un análisis molecular detallado de los cánceres pueda llevarnos a desarrollar pruebas diagnósticas más seguras que los modelos disponibles hasta ahora, o bien, que los complementen. Así se han definido dos tipos de marcadores: de *pronóstico* (para identificar pacientes con buen pronóstico y altas probabilidades de curarse y terapias locorregionales) y de *predicción* (pruebas que nos permiten detectar individuos que se pueden beneficiar con un fármaco o un esquema específico de tratamiento (Rodríguez-Cuevas y Luna, 2007).

Las proteínas como biomarcadores han impactado drásticamente el cuidado del paciente con cáncer, conduciendo al desarrollo y uso directo de blancos hormonales y terapias con anticuerpos (Whiteaker *et al*, 2007), ya que los biomarcadores pueden ser usados para desarrollar herramientas de exploración con suficiente sensibilidad y especificidad para detectar el cáncer en la población en general, ayudando al diagnóstico clínico, pronóstico e identificación del cáncer para pacientes con una enfermedad constante o metastásica (Bronchud *et al*, 2004), es por esto que el interés en las estrategias proteómicas para la identificación de biomarcadores se aumentó en los últimos años, abriendo grandes expectativas para el tratamiento del cáncer de mama.

## CAPÍTULO II

### JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama es considerado una de las enfermedades de mayor importancia en nuestro país por sus altos índices de mortalidad y por los elevados gastos económicos que provoca en la atención hospitalaria pública a las familias y porque constituye un reto para la investigación el combatirla.

Hoy en día se cuenta con el avance científico que ha permitido diagnósticos en fases tempranas de la enfermedad, generando así, bajas en el índice de mortalidad y la mejora en los tratamientos; entre ellos existen los amplios análisis moleculares, los cuales, dan la posibilidad de encontrar marcadores específicos del cáncer de mama, en especial los marcadores de carácter proteico, ya que sirven para el análisis más directo de la expresión celular, además de que debido a las modificaciones postraduccionales que sufren las proteínas, muchas de ellas podrían estar implicadas en esta enfermedad.

Es por esto que para aplicar este tipo de análisis directamente a muestras de pacientes mexicanas, en el presente estudio primero se pretende encontrar una mejor estrategia de extracción proteica desde líneas celulares de cáncer de mama, para una determinación más específica de las proteínas que se encuentran expresadas en ciertas líneas celulares elaborando un listado o "*mining*", y así poder valorar más y mejores marcadores patológicos asociados que nos ayudarán a tener un mejor diagnóstico y pronóstico del cáncer mamario, esto, con la ayuda de la tecnología proteómica. Así, posteriormente, se podrá plantear el objetivo de que a través de un diagnóstico molecular se pueda clasificar y valorar los subtipos de cáncer de mama que afectan a la población femenina mexicana y obtener terapias más adecuadas.

## **CAPÍTULO III**

### **OBJETIVO GENERAL.**

Identificar proteínas totales de las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y SK-BR-3 por espectrometría de masas, a partir de extractos totales y fracciones subcelulares.

## CAPITULO IV

### OBJETIVOS PARTICULARES.

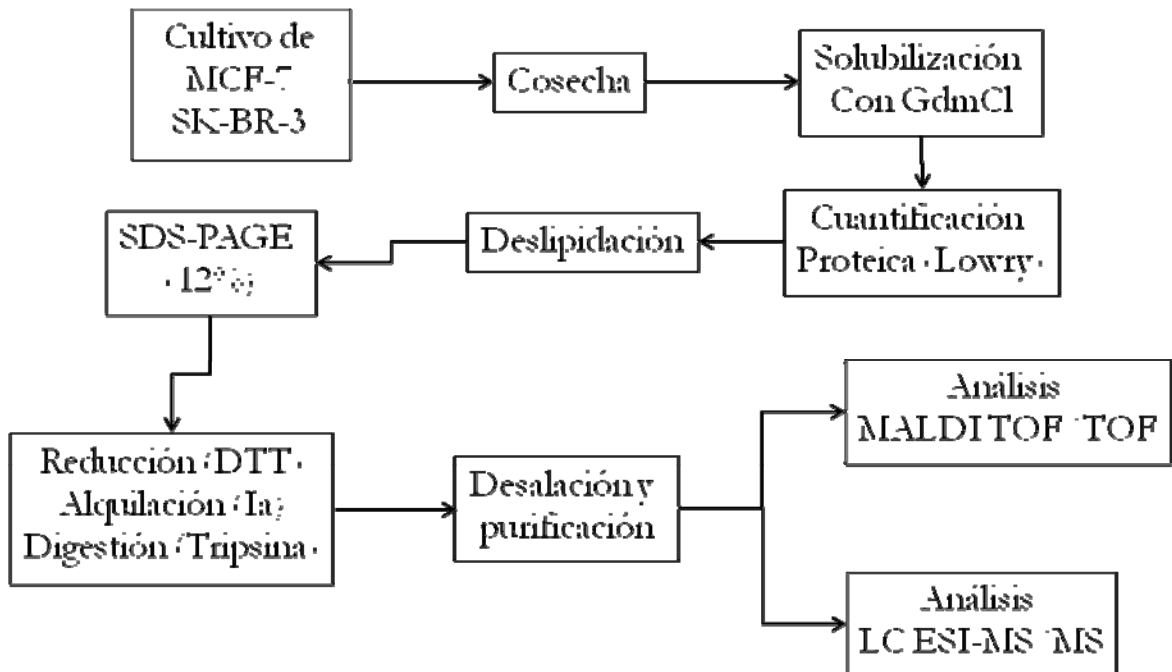
- 1.-Cultivar las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y SK-BR-3.
- 2.-Implementar la metodología adecuada para la extracción total de proteínas de SK-BR-3 y MCF-7.
- 3.-Identificar las proteínas que se expresan en una línea en particular (*“mining”*).
- 4.-Realizar el fraccionamiento subcelular de ambas líneas celulares por DDF para la identificación de las proteínas que se expresen en cada fracción.



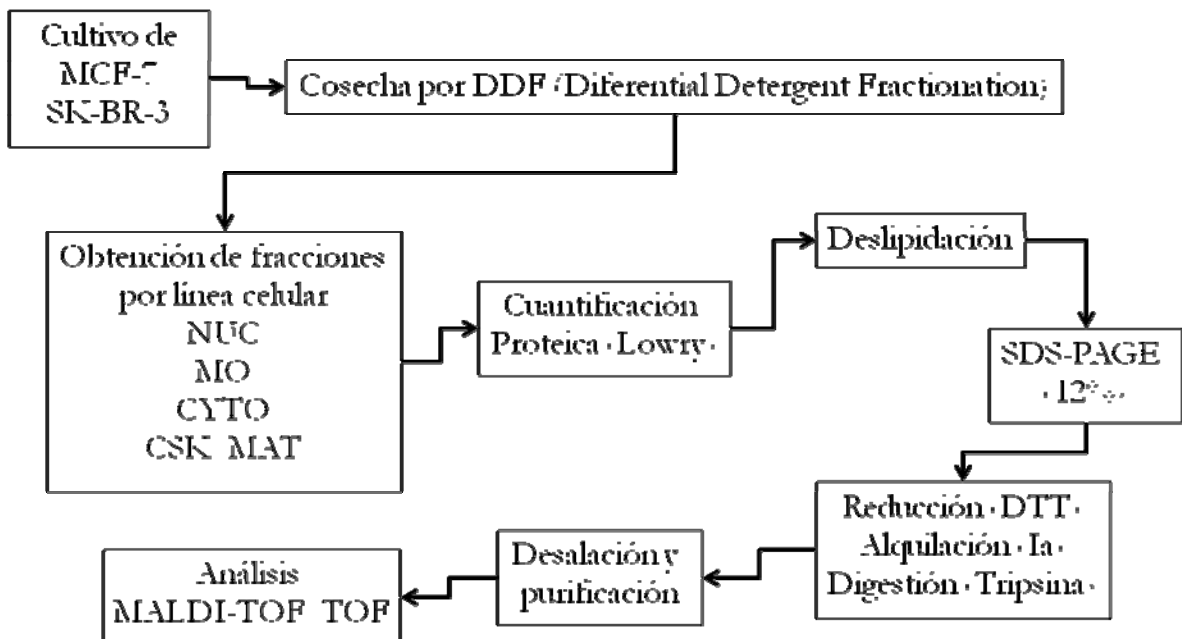
## CAPÍTULO V

### MATERIAL Y MÉTODOS

#### -Extractos totales-



#### -Fracciones Subcelulares-



Diagramas de flujo representando la metodología empleada (descrita más adelante).

## **5.1. CULTIVO DE LAS LÍNEAS CELULARES SK-BR-3 Y MCF-7**

Para resembrar células de un cultivo en confluencia del laboratorio.

1.1.- Se retiró el medio (5 ml) dejando sólo la monocapa para lavar con PBS o con el respectivo medio sin suero de cada línea celular.

1.2.- Se adicionó 1 ml de tripsina al 1.5% procurando bañar toda la pared, se retiró casi inmediatamente dejándola actuar de 10-30 segundos, se incubó a 37°C por 5-15 minutos, revisando que el desprendimiento de la monocapa se estuviera realizando.

1.3.- Se adicionaron 2 ml de medio fresco McCoy's 5a con 1.5 mM L-glutamina y 2.2 g/L de bicarbonato de sodio para la línea celular SK-BR-3, y para la línea celular MCF-7 se adicionó medio esencial mínimo (Eagle) con 2 mM de L-glutamina y Earle's ajustado que contenía 1.5 g/L bicarbonato de sodio, 0.1 mM de amino ácidos no esenciales, 1 mM de piruvato de sodio y suplementado con insulina de bovino, 90%; suero fetal de bovino, al 10% .

1.4.- Se agitó vigorosamente para desagrupar totalmente las células.

1.5.- Se tomó una alícuota de 1:2 ó 1:3 y de 1:3 ó 1:6 de las líneas SK-BR-3 y MCF-7 respectivamente y se cambió al medio fresco correspondiente (5 ml) para posteriormente incubar a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire (Barker, 1998).

Nota: Ambas líneas celulares fueron cultivadas en cajas P100 Corning.

## **5.2. COSECHA DE LAS LÍNEAS CELULARES SK-BR-3 Y MCF-7**

Al tener los cultivos celulares en una confluencia de 80%, se retiró el medio y se añadieron 3 ml de verseno (C<sub>10</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>) preparado con PBS, se incubó de 5-10 min para desprender las células; posteriormente se recuperó el verseno ya con algunas células en un tubo de 15 ml y se añadieron 2 ml de verseno para rescatar las que no se habían despegado con anterioridad y se recuperó en el mismo tubo, se centrifugaron a 1,500 rpm por 15 minutos y se desechó el sobrenadante obteniendo la pastilla celular, la cual se congeló a -80°C para su posterior tratamiento.

### 5.3. EXTRACCION DE PROTEÍNAS TOTALES

Se utilizaron dos métodos para la extracción proteica, el método A fue aplicado para el “*shot gun*” de la línea celular SK-BR-3 y consistió en la solubilización de proteínas con Urea 6 M + Tris HCL 100 mM pH 7.5 + NP-40 0.05% y el método B para la solubilización de la línea celular MCF-7, en donde se utilizó GdmCl 6 M + NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 0.2 M.

#### a) Método A

A la pastilla celular obtenida por el método anterior se le adicionaron 300 µl de la solución urea 6 M, 100 mM buffer tris pH 7.8 y NP-40 al 0.05%, se tomaron 20 µl para hacer la cuantificación de proteínas por el método de Lowry.

#### b) Método B

A la pastilla celular obtenida de la cosecha de las líneas celulares se le adicionaron 300 µl de la solución GdmCl 6 M + NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 0.2 M, se tomaron 5 µl para precipitar las proteínas y retirar el GdmCl 6M + NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 0.2M para determinar la cantidad de proteína por el método de Lowry, ya que estas sustancias interfieren para la cuantificación con dicho método.

#### 5.3.1. PRECIPITACIÓN PROTEICA Y ELIMINACION DE GdmCl 6 M + NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 0.2 M.

- 1.- Los 5 µl tomados de la mezcla anterior se llevaron a 10 µl con H<sub>2</sub>O.
- 2.- Se añadieron del volumen anterior 1/9 µl de TCA al 100% (1.11 µl con [TCA]f igual al 10%).
- 3.- Se incubó en hielo por 30 minutos.
- 4.- Se centrifugó a 12,000 x g por 10 minutos a TA en una biofuga Heraeus.
- 5.- Se lavó la pastilla con EtOH al 70% (dos veces)
- 6.- Se centrifugó a 12,000 x g por 5 minutos a TA en una biofuga Heraeus.
- 7.- Se retiró el sobrenadante.
- 8.- Se añadieron 10 µl de Urea 6 M y se sonicó durante 10.
- 9.- Se tomaron alícuotas de 1, 2 y 3 µl por triplicado para determinar la cantidad de proteína por el método de Lowry (ver más adelante).

## **5.4. FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR POR DDF**

Se realizó el fraccionamiento subcelular según el método Richard J. Simpson (2003), que consistió en:

### **5.4.1. Preparación de las células.**

a) Se enfriaron los cultivos celulares en una capa de hielo y se lavaron con PBS.

### **5.4.2. Fraccionamiento por detergentes en cultivos crecidos en monocapa.**

Todas las extracciones fueron realizadas con agitación en frío.

a) Se adicionaron 3 ml de buffer de extracción de digitonina (Disolver 9.375 mg de digitonina en agua hirviendo con 5 ml de buffer 4X PIPES, agitar. Adicionar 0.5 ml de PMSF 100 mM mientras el buffer está caliente. Combinar con 7.5 ml de buffer PIPES 4X y 2.5 ml de EDTA 100 mM. Enfriar a 4°C y ajustar pH a 6.8, adicionar agua para un volumen final de 50 ml, mantener en hielo hasta su uso) directamente a las células en monocapa en cajas P100 Corning.

b) Se incubaron las células en hielo con suave agitación durante 10 minutos.

c) Se inclinó la caja y se decantó el líquido en un tubo nuevo (fracción citosólica). Se guardó a -80°C hasta su uso.

d) Se adicionó 1 ml de buffer Tritón X-100 (Combinar 12.5 ml de buffer 4X PIPES, 0.5 ml de PMSF 100 mM, 3 ml de EDTA 100 mM y 5 ml de 10% tritón X-100 fresco (recién preparado), enfriar a 4°C y ajustar pH a 7.4, adicionar agua para un volumen final de 50 ml, mantener en hielo hasta su uso), agitar sobre hielo durante 1 h.

e) Se decantó el líquido en un tubo nuevo (fracción membranal y de organelos). Se guardó a -80°C hasta su uso.

f) Se extrajeron las monocapas con 0.5-1 ml de buffer de extracción Tween-20/desoxicolato (disolver 0.25 g de DOC in 1.25 de buffer PIPES 10X, a parte disolver 0.5 ml de Tween-20 en 1.25 ml de buffer PIPES 10X. Combinar ambas soluciones y después adicionar 2.5 ml de buffer PIPES 10X y 0.5 ml de PMSF 100 mM. Enfriar a 4°C, ajustar pH a 7.4 y adicionar agua para un volumen final de 50 ml, mantener en hielo hasta su uso).

g) Se decantó el líquido en un tubo nuevo (fracción nuclear). Se guardó a -80°C hasta su uso.

- h) Se enjuagaron las monocapas *in situ* con PBS.
- i) Se adicionaron de 1-3 ml de buffer de solubilización de citoesqueleto sin  $\beta$ -mercaptoetanol (disolver 0.5 g de SDS en 5 ml de buffer de fosfato de sodio 20 mM pH 7.4, adicionar agua para un volumen final de 10 ml) obteniendo la fracción de citoesqueleto y matriz celular.

Buffer 4X PIPES: Disolver 103 g de sacarosa y 5.8 g de NaCl en 150 ml de agua. Disolver 3 g de PIPES en un volumen pequeño de NaOH 1 M. Mezclar la solución de PIPES con la solución sacarosa/NaCl. Adicionar 0.64 g de  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  a la mezcla. Ajustar el volumen final a 250 ml y filtrar a través de un filtro estéril de 0.45  $\mu$ m. Guardar en oscuridad a 4°C.

Buffer 10X PIPES: Disolver 0.58 h de NaCl en 50 ml de agua, a parte disolver 3 g de PIPES en un volumen pequeño de NaOH 1 M. Mezclar la solución de PIPES con la solución de NaOH. Adicionar 0.2 g de  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  a la solución y ajustar el volumen final a 100 ml con agua. Filtrar y guardar como el buffer PIPES 4X.

### **5.5. CUANTIFICACION DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE LOWRY (1951)**

- a) En una placa de *ELISA Corning Incorporated Costar 3526* de 96 pozos se distribuyó la proteína estándar (albúmina 1 mg/ml) en cantidades de 0,1,2,3,-10  $\mu$ l/pozo en columna 1 A-H.
- b) Se completó a un volumen de 20  $\mu$ l con agua.
- c) Se hicieron diluciones de 1:5, 1:10, 1:20 y 1:40 de la muestra problema y se colocaron en otros pozos por triplicado en concentraciones de 5 y 10  $\mu$ l.
- d) Se completó el volumen a 20  $\mu$ l con agua.
- e) Se adicionaron 160  $\mu$ l de solución A a cada pozo y enseguida 20  $\mu$ l de solución B, posteriormente, se mezcló bien.
- f) Se midió la absorbencia a 690 nm en lector de *ELISA labsystems Multiskan MCC/340*, 30 min después.

SOLUCIÓN A: 100  $\mu$ l de sulfato de cobre 1.25 %; más 100  $\mu$ l de tartrato de sodio 2.5%: adicionar 10 ml de reactivo alcalino. Mezclar bien.

Reactivo Alcalino: 40 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 8 g de NaOH aforar a 2 litros con  $\text{H}_2\text{O}$  bidestilada

SOLUCIÓN B: Preparación fresca de 2 ml de reactivo Folin Ciocalteau; más 2 ml de agua, mezclar.

Una vez obtenida la cantidad de proteína se continuó con la deslipidación de la muestra.

## 5.6. DESLIPIDACIÓN

Se realizó la deslipidación de la muestra según el método revisado por Pro-Q © Diamond Phosphoprotein Gel Stain, 2005, en donde:

- a) Se tomó muestra de 150  $\mu\text{l}$  con 150-300  $\mu\text{g}$  de proteína.
- b) Se adicionaron 600  $\mu\text{l}$  de metanol y se agitó con Vórtex.
- c) Se adicionaron 150  $\mu\text{l}$  de cloroformo y se agitó con Vórtex.
- d) Se adicionaron 450  $\mu\text{l}$  de agua y se agitó con Vórtex.
- e) Se centrifugó a 12,000 x g por 10 minutos.
- f) Se retiró el sobrenadante.
- g) Se adicionaron 450  $\mu\text{l}$  de metanol y se agitó con Vórtex.
- h) Se centrifugó a 12,000 x g por 10 minutos.
- i) Se retiró el sobrenadante.
- j) Se secó la pastilla en *Speed Vac*.
- k) Se resuspendió la pastilla en 150  $\mu\text{l}$  de una solución de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  [0.2 M] + GdmCl [6 M]
- l) Se sonicó en hielo durante 10 s.
- m) Se repitió desde el paso 2 al 12, tres veces para proceder con el SDS-PAGE al 12% y la digestión proteica de la muestra.

## 5.7. GEL DE ACRILAMIDA-BISACRILAMIDA SDS-PAGE aL 12%

Se prepararon los reactivos y se elaboró un gel de 30% acrilamida-0.8% Bisacrilamida al 12% según Sambrook y Russell (2001) en Molecular cloning a laboratory manual .

### 5.7.1. Preparación de marcadores.

- a) Se tomaron 2.5 µl de marcador y se adicionaron 2.5 µl de buffer de muestra.
- b) Se hirvieron durante 10 s.
- c) Se cargó un pozo con los 5 µl resultantes.

#### **5.7.2.** Preparación de la muestra.

- a) Se tomaron 980 µl de Buffer de Laemli 2X y se adicionaron 20 µl de β-mercaptoetanol.
- b) Se tomaron 50 µl de la mezcla anterior y se adicionaron 50 µg de la muestra con las proteínas.
- c) Los 100 µl resultantes se hirvieron por 2 min.
- d) Se cargaron 3 pozos con 5, 10 y 15 µg de proteína respectivamente.

Finalmente se corrió el gel a 100V y 15 mA por 2 horas.

#### **5.7.3.** Tinción del SDS-PAGE con azul de Coomassie.

Para el “*shot gun*” de las líneas celulares SK-BR-3 y MCF-7 el gel se tiñó durante 30 min en azul de Coomassie. Posteriormente se destiñó con solución desteñidora (7% ác. acético y 5% metanol) y se secó durante 1 hr.

Para las fracciones subcelulares de ambas líneas celulares se tiño con nitrato de plata.

#### **5.7.4.** Tinción del SDS-PAGE con AgNO<sub>3</sub>

El método que se empleó para visualizar las bandas polipeptídicas de las fracciones subcelulares fue el de tinción con AgNO<sub>3</sub> modificado a partir del método descrito por Heukeshoven y Dernick (1988), desarrollado para el sistema de electroforesis *PhastSystem*. Este método tiene una sensibilidad de 50-100 pg de proteína por banda.

1.- Se fijaron las proteínas con una mezcla de etanol-ácido acético-agua en la relación 3:1:6 durante 15 min. (100ml)

- 2.- Se continuó la fijación con la mezcla antes mencionada durante otros 15 min (100 ml).
- 3.- Se realizó una fijación adicional y una reducción con glutaraldehído 0.5% y  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0.1% respectivamente, en una solución de etanol al 30% en tampón  $\text{NaCH}_3\text{COO}$  0.4 M, pH 6.0, durante 30 min (100 ml).
- 4.- Se lavó sucesivamente con agua desionizada toda la noche.
- 5.- Se tiñó con una solución de  $\text{AgNO}_3$  0.1% en metanol 3%, conteniendo 25  $\mu\text{l}$  de formaldehído por cada 100 ml, durante 30 min.
- 6.- Se enjuagó rápidamente con agua desionizada (100 ml)
- 7.- Se reveló con una mezcla de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2.5%, conteniendo 40  $\mu\text{l}$  de formaldehído por cada 100 ml, durante 30 seg (100 ml).
- 8.- Se continuó el revelado con la solución de carbonato antes mencionada, durante 6-10 min (100 ml).
- 9.- Se detuvo la reacción con  $\text{CH}_3\text{COOH}$  al 5% durante 10 min (100 ml).
- 10.- Se realizaron dos lavados adicionales con agua desionizada, durante 10 min en cada caso (100 ml).
- 11.- Se secó el gel, previo tratamiento con glicerol al 20% durante 15 min y lavado con agua desionizada durante 5-10 min (100 ml), a 80°C durante 2-3 horas.

## **5.8. DIGESTIÓN PROTEICA**

Se realizó la digestión de proteínas de la muestra según el método de Kinter y Sherman (2000), que consistió en:

Día 1

- 1.- Se tomaron 100  $\mu\text{l}$  con 100  $\mu\text{g}$  de la muestra problema.



- 2.- Se adicionaron 5  $\mu\text{l}$  de agente reductor (DTT 200 mM) y se agitó suavemente en Vórtex.
- 3.- Se dejó 1 h a temperatura ambiente.
- 4.- Se le adicionaron 20  $\mu\text{l}$  de agente alquilante (Iodoacetamida -Ia- 200 mM) y se agitó suavemente en Vórtex.
- 5.- Se dejó 1 h a temperatura ambiente.
- 6.- Se adicionaron 20  $\mu\text{l}$  de agente reductor (DTT) y se agitó suavemente en Vórtex.
- 7.- Se dejó 1 h a temperatura ambiente.
- 8.- Se redujo la concentración de urea con agua hasta 0.6 M y de GdmCl 6 M hasta 0.85 M para que la tripsina pudiera actuar.
- 9.- Se adicionaron 100  $\mu\text{l}$  a una solución con 20  $\mu\text{g}$  de tripsina. Se mezcló la muestra en Vórtex y se dejó toda la noche a una temperatura de 37°C. Esta cantidad de tripsina da un rango proteasa-sustrato de 1-50.

Día 2

Se detuvo la reacción de la tripsina adicionando 20  $\mu\text{l}$  de ácido acético glacial o concentrado el cual baja el pH a  $>6$ . Se midió el pH colocando muestra de 1  $\mu\text{l}$  en bandas para medir pH.

## **5.9. DESALACIÓN Y PURIFICACIÓN**

Se utilizaron *PepClean<sup>TM</sup> C-18 Spin Columns* de PIERCE según las indicaciones de proveedor, con la finalidad de purificar y concentrar las muestras.

## **5.10. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA ESI-MS/MS**

Esta preparación se realizó para el “*shot gun*” de la línea celular SK-BR-3.

- 1.- Se tomaron 105  $\mu\text{l}$  de muestra conteniendo 1 mg de proteína para su posterior análisis en el ESI-MS/MS, para esto fue necesaria la previa digestión proteica, purificación y concentración como se describe anteriormente.
- 2.- Se adicionaron 1.05  $\mu\text{l}$  de ácido acético (1:100) a la muestra para mantener el pH entre 3 y 4 y asegurar que los aminoácidos se cargaran.

Finalmente se realizó el análisis por HPLC acoplado a espectrometría de masas en tándem.

### **5.11. LC ESI-MS/MS E IDENTIFICACION PROTEICA**

El análisis en LC-ESI MS/MS fue corrido en un sistema LC-MS/MS que consiste de una cromatografía líquida de alta resolución en un sistema nano serie 1200 de Agilent (Palo Alto, CA) acoplado a un espectrómetro de masas en tándem QTRAP 3200 de Applied Biosystems (Foster City, CA) equipado con una fuente de ionización Nano<sup>TM</sup>, todo el equipo esta ubicado en los laboratorios centrales del CINVESTAV-IPN y se encuentra bajo la dirección de la Dra. Cecilia Silva Sánchez.

-1D HPLC: La cromatografía de intercambio catiónico fue realizada con una columna ZORBAX BIO-SCX II de Agilent a un flujo de 30 µl/min. La fase estacionaria fue Agua/Acetonitrilo 95/5 más 0.1% de ácido fórmico y la fase móvil fue acetato de amonio 100 mM en Agua Acetonitrilo 95/5 más 0.1% de ácido fórmico. Se inyectaron 50 µl de la muestra a la columna. Los péptidos fueron eluidos de la columna SCX por medio de un gradiente discontinuo de acetato de amonio usando 6 pasos de fuerza iónica de 0, 5, 10, 20, 50 y 100 mM. La elución de los péptidos se realizó por 15 min y estos fueron atrapados en un cartucho C18 (Holder trap Cartridges 5mm Agilent). Después de la elución de los péptidos el cartucho fue lavado con 100% de fase estacionaria durante 15 min para eliminar restos de sales. Los péptidos retenidos en el cartucho C18 fueron inyectados a la cromatografía de fase reversa.

- HPLC 2D: La separación cromatográfica fue realizada con una columna ZORBAX 300SB C18 (150 X 0.075, 3.5 µm de diámetro). Los buffer fueron:  
Buffer A: 98% agua, 2% acetonitrilo y 0.01% de ácido fórmico.  
Buffer B: 98% acetonitrilo, 2% agua y 0.01% de ácido fórmico. Se equilibró la columna durante 30 min con 90% de buffer A. Se inyectaron 10µl de la muestra a la columna, los péptidos fueron eluidos directamente en la fuente de ionización con un gradiente de 60% a 80% de buffer B a una velocidad de 400 nl/min. La identificación de los péptidos fue realizada usando MASCOT (Matrix Sciences, <http://www.matrixscience.com/>).

## 5.12. MALDI-TOF/TOF E IDENTIFICACION PROTEICA

Los espectros de masas fueron generados en *Applied Biosystem (Framingham, MA)* 4800 plus MALDI-TOF/TOF. El plus 4800 fue equipado con un láser de 355 nm Nd:YAG. Los espectros fueron obtenidos en reflector en un rango de m/z de 800 a 4000. Las adquisiciones MS/MS se llevaron a cabo usando aire a presión de  $1.3 \times 10^{-6}$  torr y una energía de colisión de 2 kV. Cada muestra fue “espoteada” cinco veces en la placa MALDI y los espectros fueron obtenidos. Por cada “spot”, los picos más intensos con un s/n >10 fueron retenidos para los experimentos MS/MS. Para evitar el agotamiento de la muestra y considerando que los cinco spots mostraran el mismo patrón, los 60 picos más intensos fueron analizados divididos en cinco grupos. Este proceso fue repetido para cada muestra. Los espectros MS/MS fueron analizados por el algoritmo de Paragon del programa *Protein Pilot (Applied Biosystems)* en contra de la base de datos de contaminantes proteicos *Uniprot Uprot Plus* para *Homo sapiens*. El parámetro para la búsqueda fue la alquilación de cisteínas con Iodoacetamida. En la identificación proteica se consideraron cuantas posibles modificaciones biológicas a las que puedan estar sujetas las proteínas, el software considera una gran lista de estas y la sustitución de amino ácidos. El intervalo de confiabilidad con el cual se realizó la identificación proteica fue de 95%.

## **CAPÍTULO VI**

### **RESULTADOS**

Para poder cumplir con los objetivos planteados en este proyecto, en el trabajo experimental se utilizaron diferentes técnicas para la extracción, solubilización y cuantificación de proteínas como:

- a) Dos métodos para el “*shot gun*” de las líneas celulares SK-BR-3 y MCF-7.
- b) DDF para la extracción y/o solubilización de cada fracción celular de ambas líneas celulares.
- c) Estandarización del método de Lowry.

Lo anterior con el fin de que se evalúen las técnicas a) y b) y saber si son éstas las adecuadas para seguir empleándolas en trabajos de esta índole o descartarlas y en un futuro emplear otras técnicas que pudieran ser adecuadas para cumplir con el objetivo principal de este proyecto.

#### **6.1. CULTIVO DE LAS LÍNEAS CELULARES SK-BR-3 Y MCF-7**

Para evaluar las técnicas mencionadas arriba procedimos a realizar los cultivos celulares de ambas líneas celulares los cuales fueron utilizados cuando ambas líneas celulares se encontraban de un 80% de confluencia (Fig. 6).

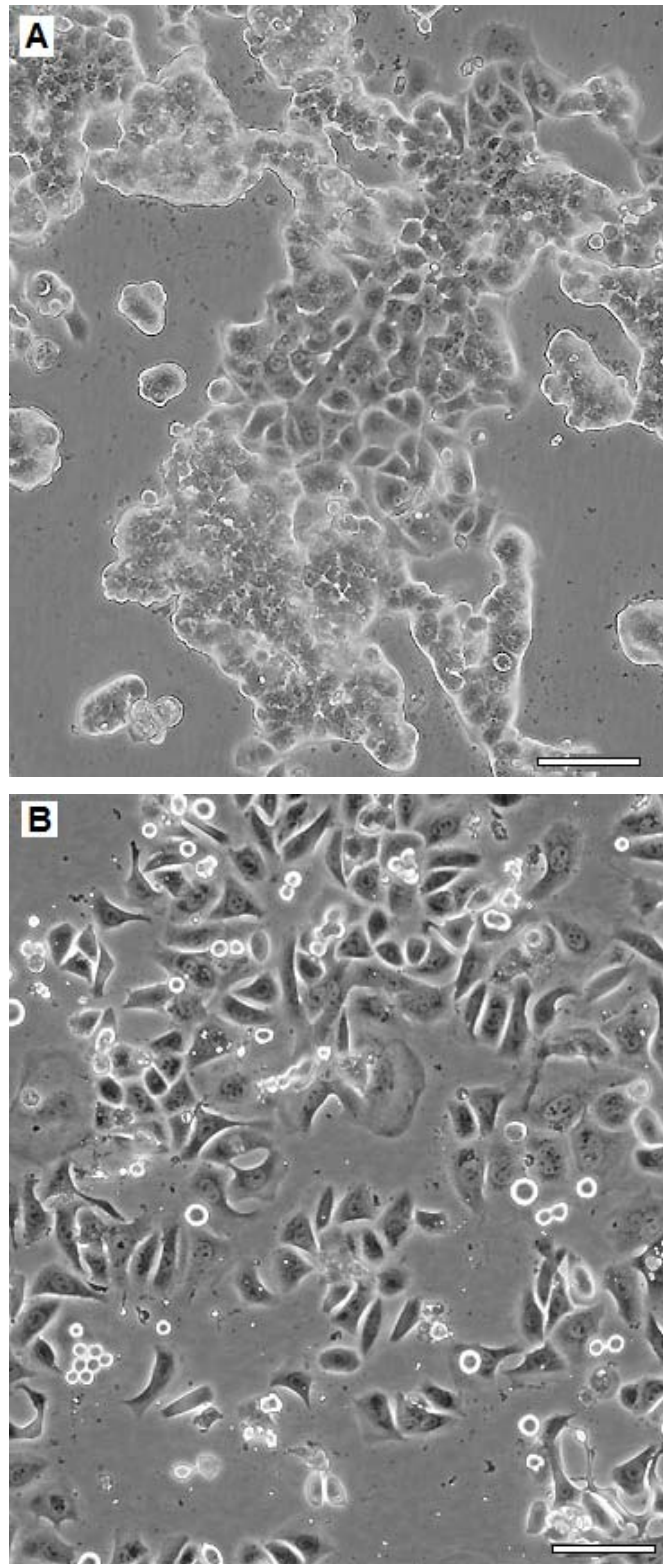


Figura 6. Líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 (A) y SK-BR-3 (B) observadas con una escala de 100 µm. (Tomadas de ATCC).

Ambas líneas celulares crecen en adherencia a la superficie (monocapa). Se manejaron con mucha delicadeza debido a que en nuestro laboratorio la línea celular MCF-7 es difícil de mantener en cultivo. Las células SK-BR-3 en cultivo se caracterizan por tener características ultraestructurales como microvellosidades y desmosomas, gránulos de glicógeno, grandes lisosomas y por expresar el gen *HER2/erb-2*.

Las células MCF-7 en cultivo se caracterizan principalmente por formar domos como podemos observar en la Figura 6A (pequeños agregados celulares).

## **6.2. SOLUBILIZACIÓN DE PROTEÍNAS**

De cada cultivo en confluencia se realizó la solubilización y/o extracción de la mayor cantidad de proteínas posibles, obteniendo el “shot gun” de las líneas celulares. Se utilizó el Método A para el “shot gun” de SK-BR-3 y el Método B para el “*shot gun*” de MCF-7 obteniendo patrones similares en la expresión proteica.

Dichos patrones son visibles en los SDS-PAGEs realizados para SK-BR-3 (Fig. 7) y MCF-7 (Fig. 8) a concentraciones de 5, 10 y 15  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de proteína (descrito en el paso 3) asegurándonos que con éstos métodos se solubilizaron las proteínas, además de que éstas se encontraban en excelente integridad en ambas líneas celulares.

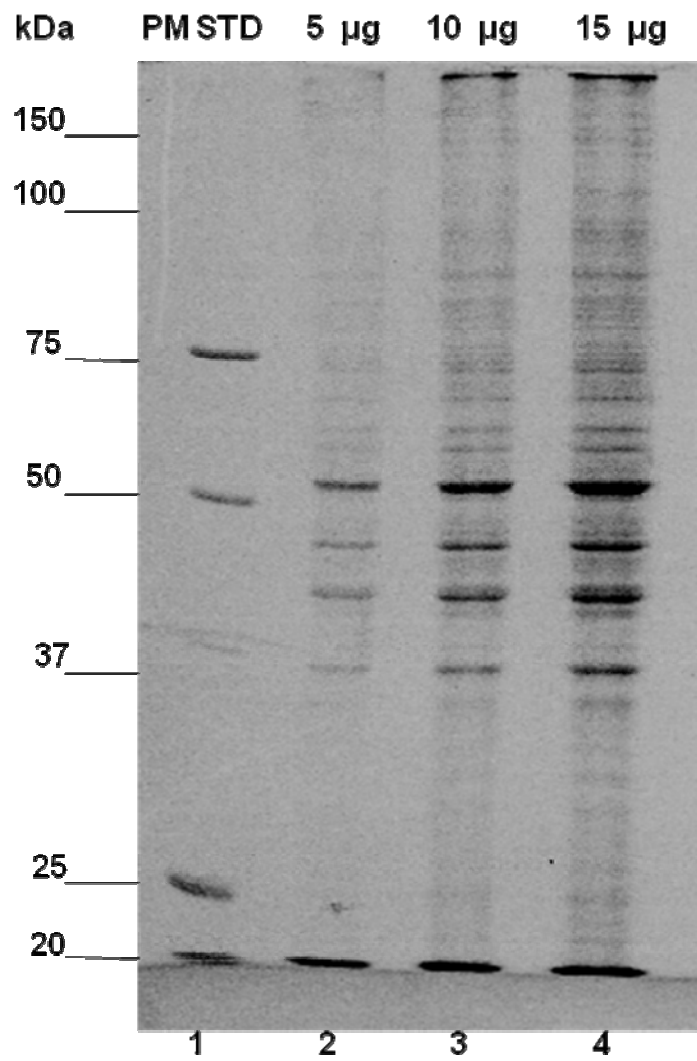


Figura 7. SDS-PAGE al 12% de la línea celular SK-BR-3, teñido con azul de Coomassie.

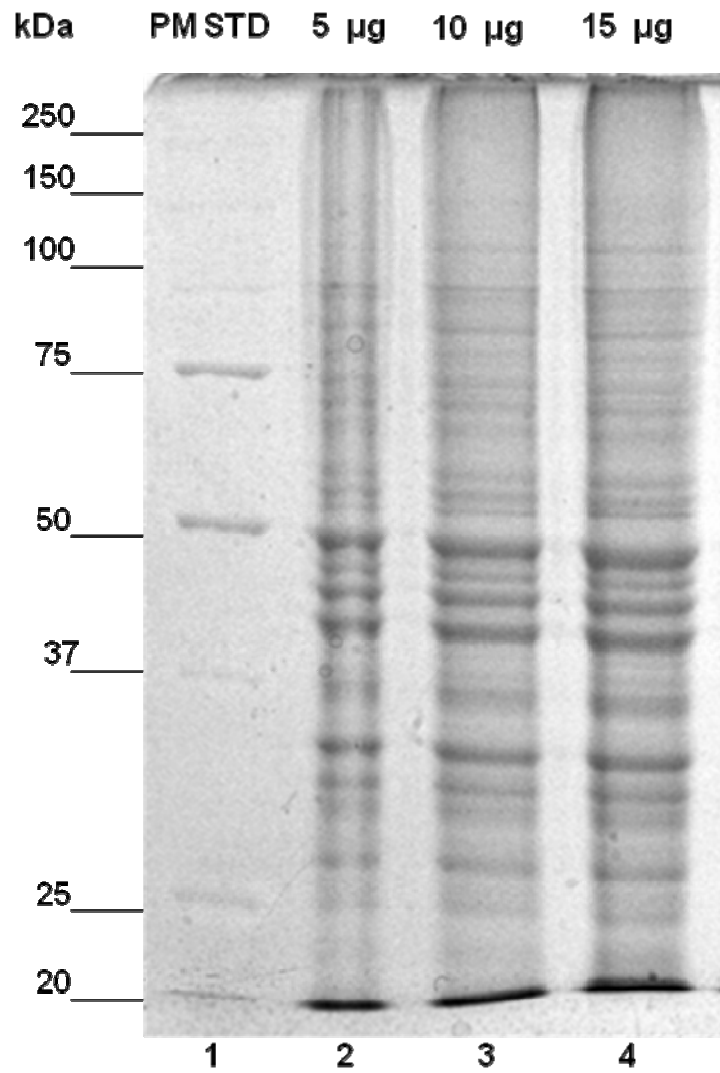


Figura 8. SDS-PAGE al 12% de la línea celular MCF-7, teñido con azul de Coomasie.

### 6.3. DETERMINACIÓN PROTEICA POR EL MÉTODO DE LOWRY



Se estandarizó la técnica del método de Lowry realizando una curva patrón con la proteína albúmina obteniendo un error de 0.99 lo que nos dice que la cuantificación se realizó correctamente, dando como resultado una concentración de proteína total para ambas líneas celulares de 1 µg/µl. De esta concentración se partió para realizar los SDS-PAGE (antes mencionado) y todos los procedimientos detallados en el Capítulo V.

#### **6.4. OBTENCION DE LOS ESPECTROS GENERALES**

Todas las muestras tanto del “*shot gun*” como las fracciones subcelulares fueron depuradas (desalación y purificación, detalladas en el Capítulo V) para asegurarnos que ninguna otra molécula (como lípidos) fuera a intervenir con nuestros resultados y arrojara falsos positivos.

Para el “*shot gun*” de SK-BR-3 se obtuvo el espectro general de los péptidos generados por HPLC (a través de la columna C18) y el sistema ESI-MS/MS, en donde la mayor cantidad de péptidos fueron localizados entre los 30 y 50 minutos (Fig. 9). El total de iones contables (TIC) se visualizó con el programa *Analyst* (Versión 1.4.2), estos iones fueron usados para la identificación proteica con el programa *Protein pilot*. Otro espectro general obtenido de la línea celular SK-BR-3 se muestra en la Figura 10 (panel a) en donde se observa la elución total de los péptidos (15-60 min.) con acetato de amonio 100 mM y se resalta el rango del minuto 34.87 al 35.88, en donde se muestran los péptidos en ese rango en relación a su m/z (panel b), seguido de los demás péptidos con menor intensidad en esos minutos (panel c,d,e y f).

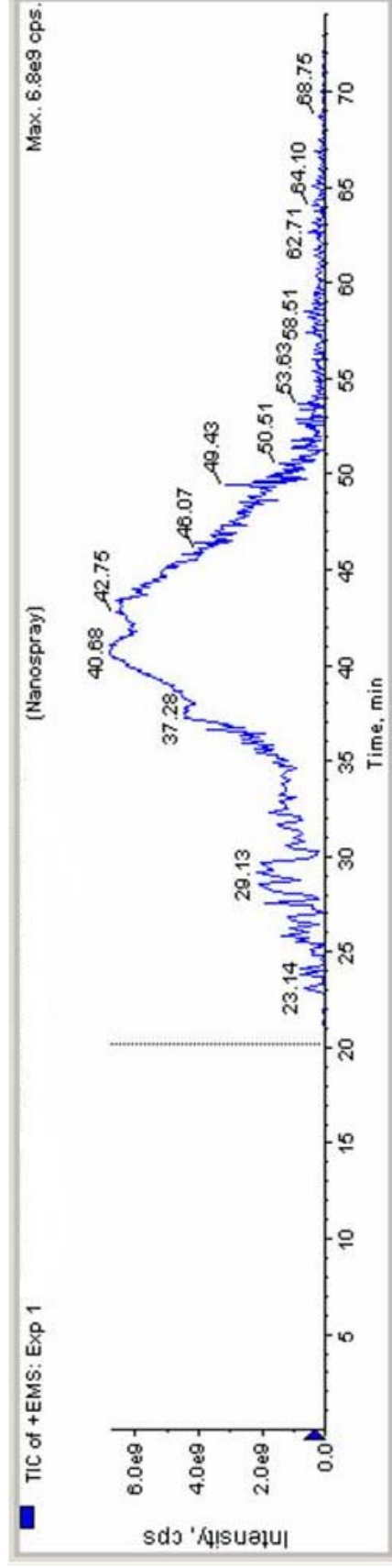


Figura 9. Espectro del Total de iones contables (TIC) del “shot gun” de la línea celular de cáncer de mama SK-BR-3 generados por ESI-MS/MS y visualizados con el programa *Analyt* (versión 1.4.2).

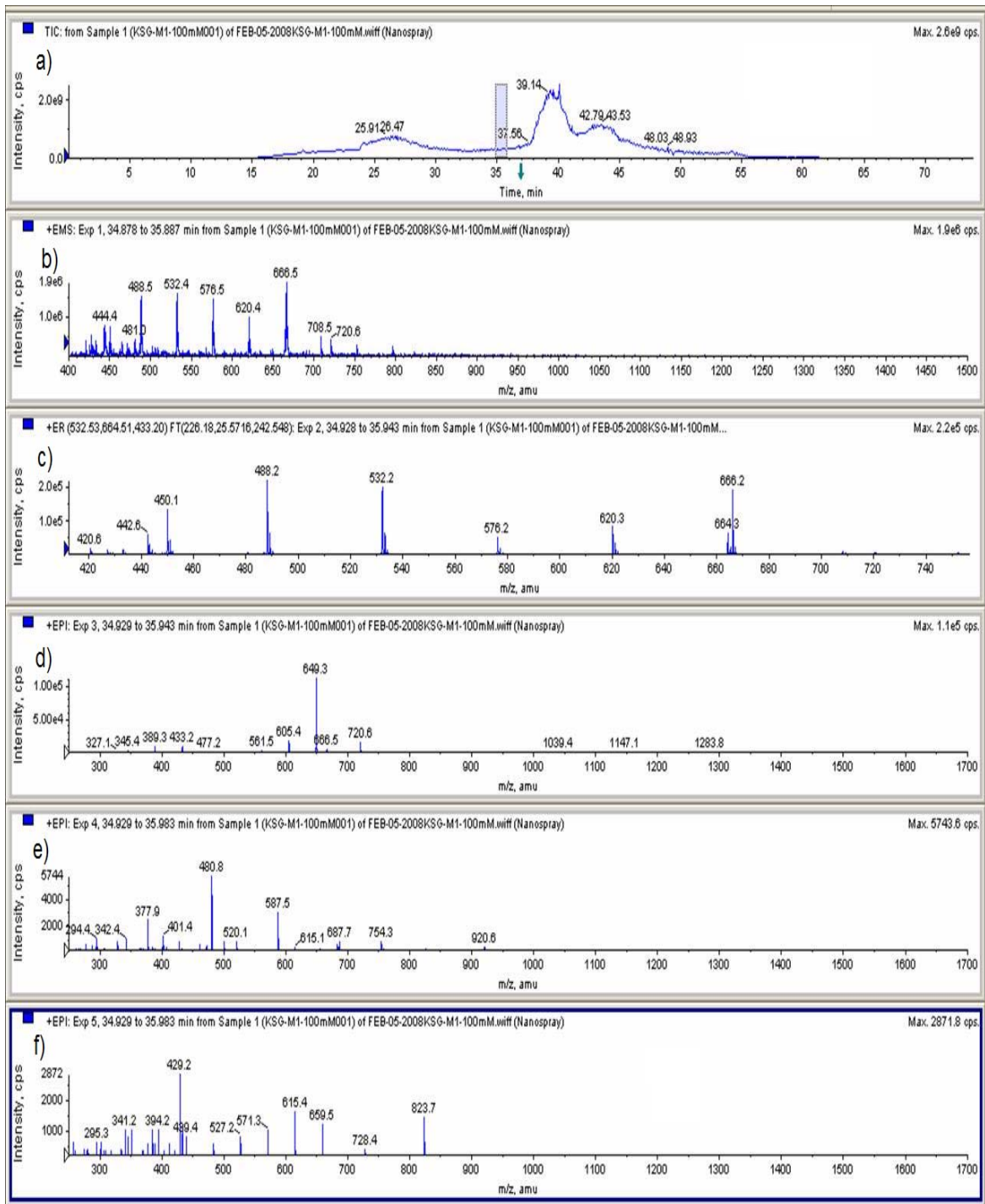


Figura 10. Espectro del Total de iones contables (TIC) de la línea celular de cáncer de mama SK-BR-3 generado por ESI-MS/MS y visualizado en el programa *Analyst* (Versión 1.4.2).

En el caso del “*shot gun*” de la línea celular MCF-7 se muestran varios péptidos con relación m/z, los cuales se también se usaron para la posterior identificación proteica, mostrando que la mayor cantidad de péptidos fue encontrada en el rango de 1441.8 m/z a 3370.2 m/z. (Fig. 11).

Todos los iones generados tanto en el ESI-MS/MS como en MALDI-TOF/TOF fueron después analizados en el software *Protein pilot* (Versión 1.0).

## **6.5. PROTEÍNAS OBTENIDAS DE LOS “SHOT GUN” DE AMBAS LÍNEAS CELULARES**

Para en “*shot gun*” de la línea celular SK-BR-3 se determinaron 21 proteínas con una eficiencia del 95%. La Tabla 1 nos indica el número de proteína, el unused que se refiere a la cantidad de péptidos encontrados de dicha proteína, el porcentaje de cobertura que ocupan esos péptidos, el número de acceso en la base de datos *Swiss Prot e IPI\*\** y el nombre de la proteína. Algunas de las funciones de las proteínas se describen a continuación:

- a) Citoqueratina 19, tipo 1, la cual esta involucrada en la organización de las miofibrillas.
- b) Citoqueratina 18, tipo 1, que cuando se fosforila juega un papel importante en la reorganización de los filamentos.
- c) Citoqueratina 8, tipo II, que junto con la citoqueratinas 19 ayuda a unir el aparato contráctil de distrofina en los costameros del músculo estriado (Stone *et al.*, 2005)
- d) LAMINA A/C, que es componente de la lámina nuclear, una capa fibrosa del lado nucleoplásmico en el interior de la membrana nuclear, la cual se sabe que provee un armazón para la envoltura nuclear y que también puede interactuar con la cromatina.
- e) Thiorredoxina-dependiente de la peroxisoreductasa, que está involucrada en la regulación redox de la célula, protege algunas enzimas del daño oxidativo (Masaki *et al.*, 2003).
- f) Proteína “Zinc finger” 41, que puede estar involucrada en la regulación transcripcional.
- g) Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, que independientemente de su actividad glicolítica también esta involucrada en el tráfico vesicular en una vía de secreción temprana (Tisdale, 2002).

- h) Histona H2B, miembro E; Histona H4 e Histona H2B tipo 1-M que son componentes del nucleosoma, juegan un papel central en la regulación de la transcripción, reparación y replicación del ADN así como de la estabilidad cromosómica.
- i) Proteína R, grupo de alta movilidad, pueden estar actuando en el proceso de terminación de los transcritos de ARNm, también pueden estar involucrada en la regulación de la transcripción de genes contenidos o próximos a regiones ricas en T y A.
- j) Ribonucleoproteína heterogénea nuclear A1, involucrada en el empaquetamiento del pre-ARN dentro de las partículas hnRNP, transporta la cola poli adeninas del ARNm del núcleo al citoplasma y puede modular la selección de sitios de splicing.
- k) Proteína de choque térmico beta-1 (HspB1), involucrada en la resistencia al estrés y la organización de la actina.

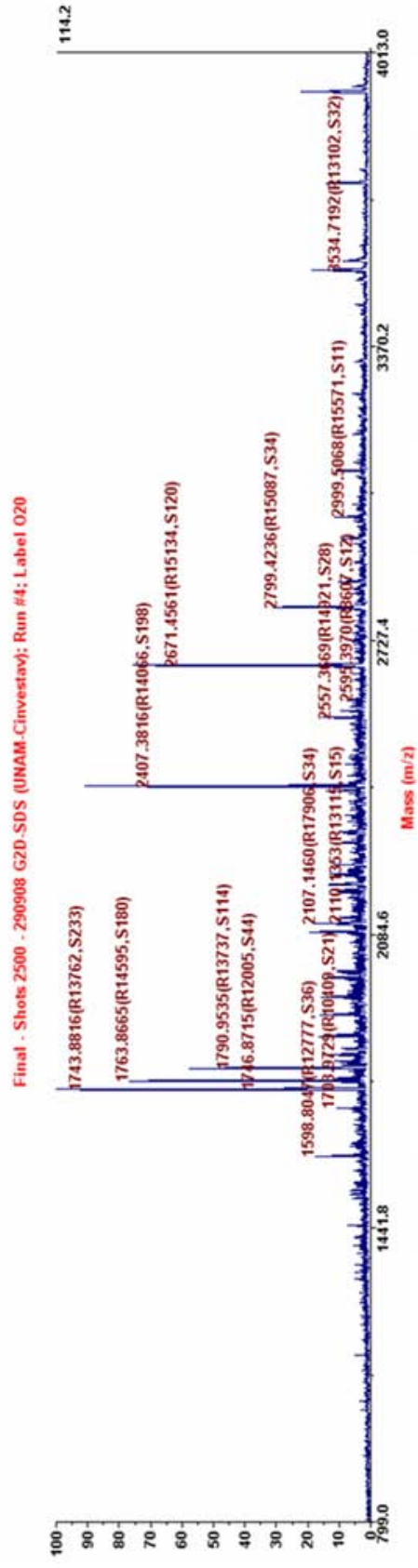


Figura 11. Espectro del “shot gun” de la línea celular de cáncer de mama MCF-7 generados por el programa *Protein Pilot*.

Tabla 1. Proteínas del “*shot gun*” de la línea celular SK-BR-3 obtenidas por LC ESI-MS-MS. Obtenidas de las bases de datos Swiss-prot e \*\*IPI.

N°	Unused	% Cov	# Acceso	Proteína
1	6.01	29.5	P08727	Citoqueratina 19, tipo I (CK-19)
2	2.00	10.5	P02545	Lamina A/C (70 kDa lamin)
3	0.52	8.9	P05783	Citoqueratina 18, tipo I (CK-18)
4	0.47	9.0	P30048	Thioredoxin-dependiente de peroxisoreductasa, (Peroxiredoxin 3) (Proteína antioxidante 1) (AOP-1)
5	0.89	3.8	P51814	Proteína Zinc finger 41
6	3.87	13.5	P05787	Citoqueratina 8, tipo II (Fragmento)
7	2.00	8.1	P04406	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
8	0.54	4.0	CAD34989	Secuencia 297 de patente WO0222660
9	4.00	54.0	Q99879	Histona H2B, miembro E.
10	2.00	18.4	P17096	Proteína R, grupo de alta movilidad
11	0.55	30.9	P46778	Proeína ribosomal 60S L21
12	2.03	47.2	Q99878	Histona H2A tipo 8
13	2.00	16.2	P09651	Ribonucleoproteína heterogénea nuclear A1
14	0.68	13.4	P14602	Proteína de choque térmico beta-1 (HspB1)
15	6.07	34.2	**IPI:IPI00554648.	Citoqueratina 8, tipo II (CK-8)
16	3.40	29.1	**IPI:IPI00453473.6	Histona H4
17	3.00	29.9	**IPI:IPI00021439.1	Actina
18	4.00	57.1	**IPI:IPI00554798.2	Histona H2B tipo 1-M
19	2.00	26.2	**IPI:IPI00744851	DSP 40S Proteína ribosomal S3
20	2.00	30.5	**IPI:IPI00877002.1	PPIA Peptidil-prolil cis-trans isomerasa
21	2.00	12.7	**IPI:IPI00291006.1	Malato deshidrogenasa

En el “*shot gun*” de la línea celular MCF-7 se determinó la proteína Triosafosfato isomerasa en MALDI-TOF/TOF (Tabla 2); una de sus funciones principales es la de tener una participación en la actividad catalítica de las vías de gluconeogénesis y glucólisis.

Tabla 2. Proteína del “*shot gun*” de la línea celular MCF-7 obtenidas por MALDI-TOF/TOF.

N°	Unused	% Cov	# Acceso	Proteína
1	1.3	8	P60174	Triosafosfato isomerasa

#### **6.6. PROTEÍNAS OBTENIDAS DE LAS FRACCIONES SUBCELULARES DE AMBAS LÍNEAS CELULARES**

Al igual que las proteínas del “*shot gun*” de ambas líneas celulares, en cada fracción subcelular obtenida por el método de DDF pudimos obtener proteínas en su completa integridad, esto se puede observar en las Figuras 12 y 13 en donde se muestran las cuatro fracciones subcelulares obtenidas en SK-BR-3 y MCF-7 respectivamente.



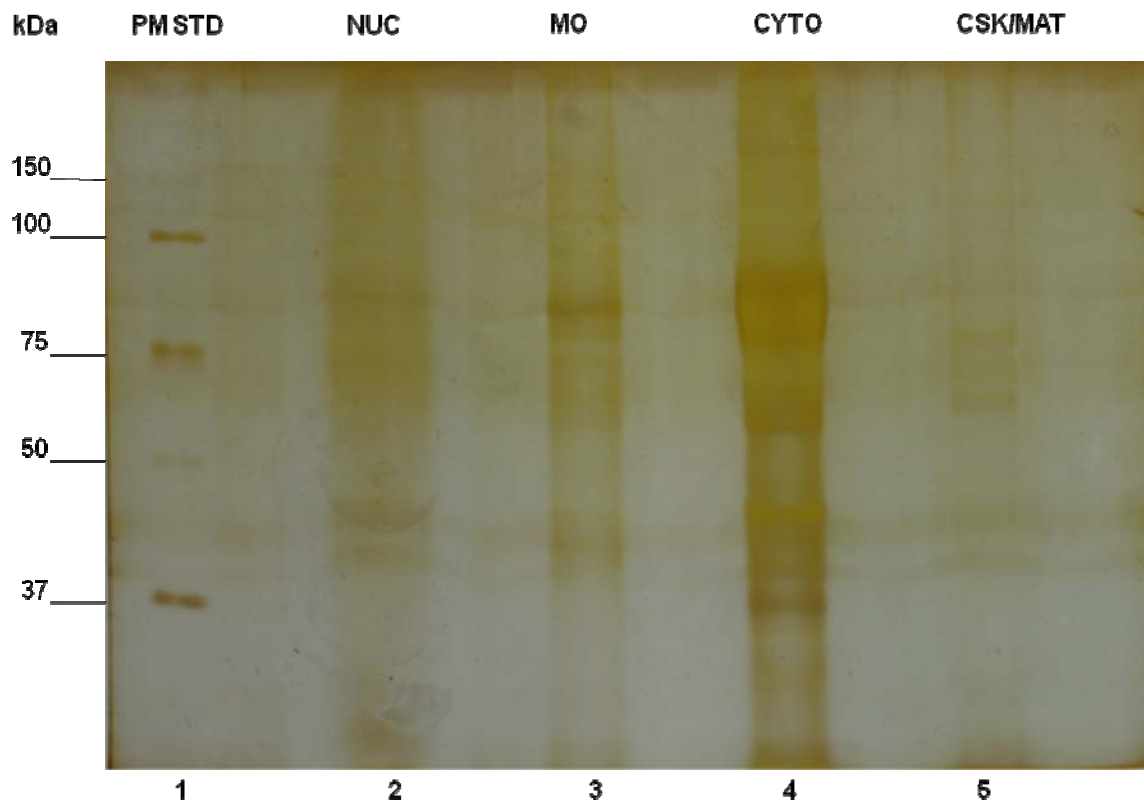


Figura 12. SDS-PAGE al 12% de las cuatro fracciones subcelulares obtenidas de la línea celular SK-BR-3, donde se muestra la fracción nuclear (NUC), membranal (MO), citoplasmica (CYTO) y citoesqueletica (CSK/MAT). Teñido con nitrato de plata.

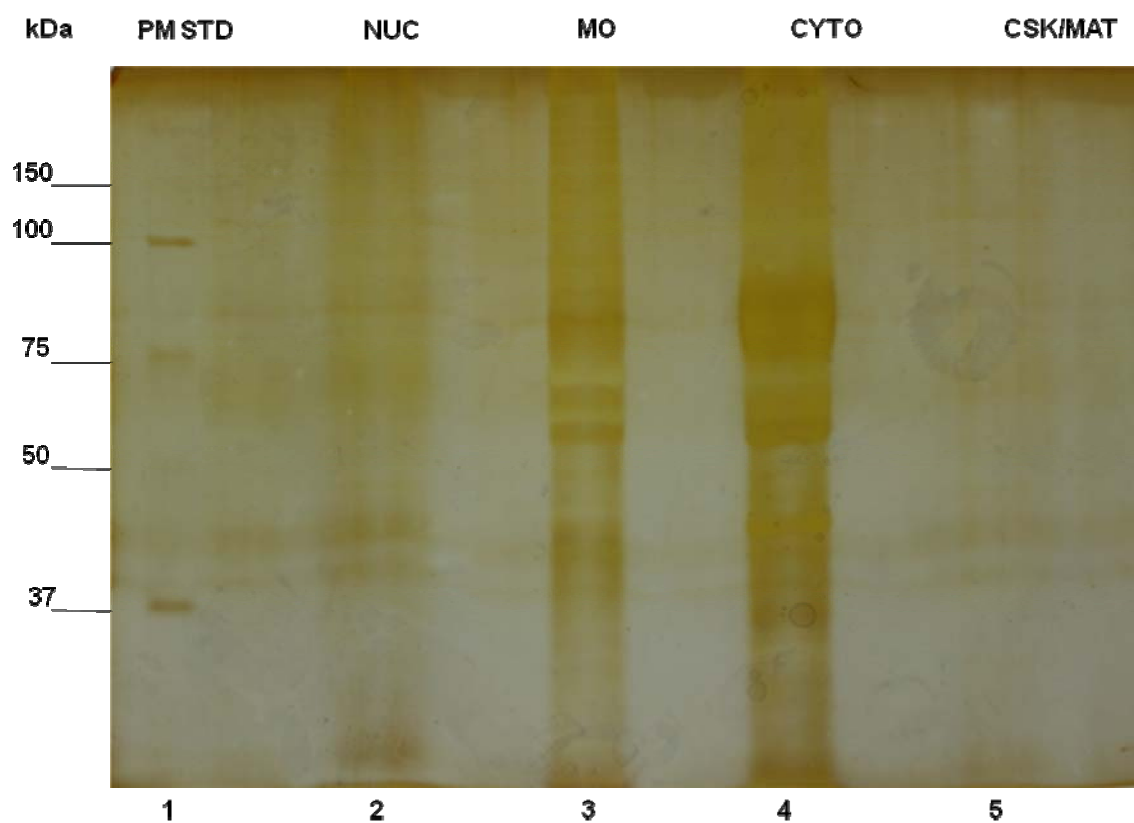


Figura 13. SDS-PAGE al 12% de las cuatro fracciones subcelulares obtenidas de la línea celular MCF-7, donde se muestra la fracción nuclear (NUC), membranal (MO), citoplasmica (CYTO) y citoesqueletica (CSK/MAT). Teñido con nitrato de plata.

## 6.7. ESPECTROS Y PROTEÍNAS OBTENIDOS DE LAS FRACCIONES SUBCELULARES DE AMBAS LÍNEAS CELULARES

En la fracción subcelular NUC de SK-BR-3 encontramos cuatro citoqueratinas entre las cuales están la CK8, CK7, CK19 y CK18 así como también la proteína centrosomal Cep 290 la cual puede jugar un papel en los procesos de transporte (Tabla 3). El espectro correspondiente a esta tabla fue visualizado en el programa *Protein pilot* (Versión 1.0) y se muestra en la figura 14.

Tabla 3. Proteínas de la fracción subcelular NUC de la línea celular SK-BR-3 obtenidas por MALDI-TOF/TOF.

N°	Unused	% Cov	# Acceso	Proteína
1	6	53.6	P05787	Citoqueratina 8, tipo II (CK-8)
2	5.26	52.2	P08729	Citoqueratina 7, tipo II (CK-7)
3	4.54	35.5	P08727	Citoqueratina 19, tipo I (CK-19)
4	3.11	25.8	P05783	Citoqueratina 18, tipo I (CK-18)
5	5.22	20	O15078	Proteína centrosomal Cep290 (Tumor antigen se2-2)

A pesar de que en el patrón de iones de la fracción membranal de la línea celular SK-BR-3 se muestran varios péptidos poco abundantes (Fig. 15) en el análisis para determinar las proteínas sólo pudimos identificar la CK 19 que como mencionamos anteriormente esta involucrada en la organización de las miofibrillas (Tabla 4).

Tabla 4. Proteína de la fracción subcelular MO de la línea celular SK-BR-3 obtenidas por MALDI-TOF/TOF.

N°	Unused	% Cov	# Acceso	Proteína
1	2	5.8	P08727	Citoqueratina 19, tipo I (CK-19)

Figura 14. Espectro general de la línea celular de cáncer de mama SK-BR-3, fracción nuclear (NUC).



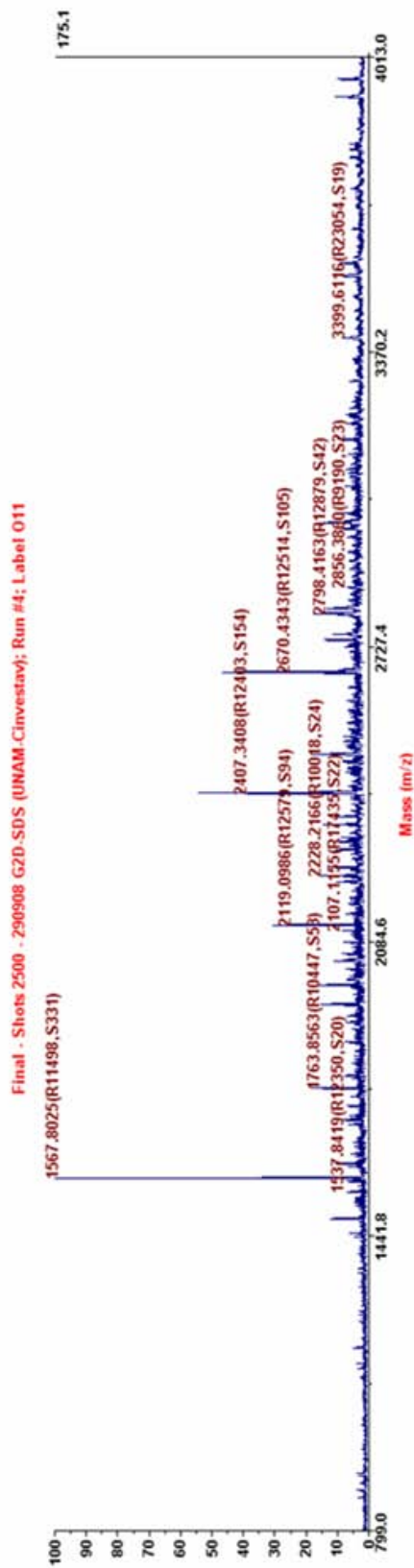


Figura 15. Espectro general de la línea celular de cáncer de mama SK-BR-3, fracción membranal (MO).

En la fracción citoplásmica de la línea celular SK-BR-3 se pudieron determinar dos proteínas: la piruvato deshidrogenasa que contribuye en la regulación del

metabolismo de la glucosa y la proteína de choque térmico (Tabla 5) que está involucrada en la resistencia al estrés y en la organización de la actina; se muestra el espectro general de esta fracción subcelular en la Figura 16 en donde los iones más intensos se encuentran en un rango de 1441.8 a 2084.6 m/z.

Tabla 5. Proteínas de la fracción subcelular CYTO de la línea celular SK-BR-3 obtenidas por MALDI-TOF/TOF.

N°	Unused	% Cov	# Acceso	Proteína
1	2	7.3	Q16654	Piruvato deshidrogenasa
2	1.52	3.2	P04792	Proteína de Choque térmico 27kD

En la fracción de CSK/MAT de la línea celular SK-BR-3 se encuentran las CK8, CK19, CK7 y la CK18 (Tabla 6); comparando su espectro con las otras fracciones, esta fracción muestra tener la mayor cantidad de péptidos tanto intensos como no abundantes además de tener un rango que va desde 799.0 hasta 4013.0 m/z (Fig. 17).

Tabla 6. Proteínas de la fracción subcelular CSK/MAT de la línea celular SK-BR-3 obtenidas por MALDI-TOF/TOF.

N°	Unused	% Cov	# Acceso	Proteína
1	9.86	64.2	P05787	Citoqueratina 8, tipo II (CK-8)
2	4.31	63.3	P08727	Citoqueratina 19, tipo I (CK-19)
3	2.37	40.1	P08729	Citoqueratina 7, tipo II (CK-7)
4	2.14	30.2	P05783	Citoqueratina 18, tipo I (CK-18)

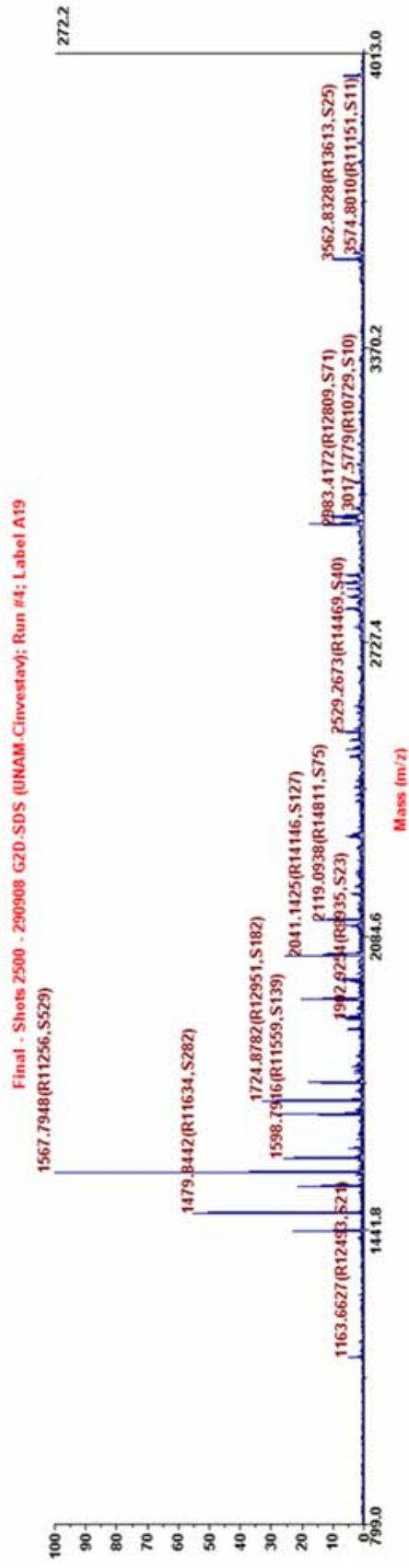


Figura 16. Espectro general de la línea celular de cáncer de mama SK-BR-3, fracción citoplásmica (CYTO).

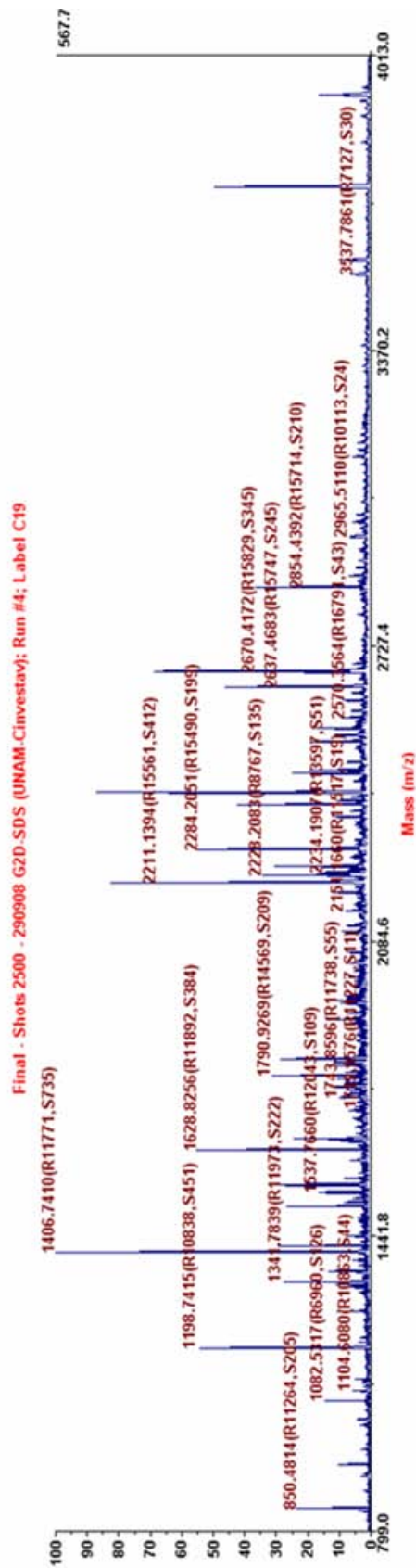


Figura 17. Espectro general de la línea celular de cáncer de mama SK-BR-3, fracción de citoesqueleto (CSK/MAT).

En la fracción nuclear de la línea celular MCF-7 se muestra un patrón más amplio de iones intensos y de baja abundancia (Fig. 18) en comparación con la



fracción nuclear de la línea SK-BR-3 además de tener un rango tan amplio como en la fracción CSK/MAT de SK-BR-3; encontrando las CK8, CK19, CK18 y la proteína nuclear: Histona H2B (Tabla 7).

Tabla 7. Proteínas de la fracción subcelular NUC de la línea celular MCF-7 obtenidas por MALDI-TOF/TOF.

N°	Unused	% Cov	# Acceso	Proteína
1	8.48	63.8	P05787	Citoqueratina 8, tipo II (CK-8)
2	2	22.3	P08727	Citoqueratina 19, tipo I (CK-19)
3	2	27.8	P57053	Histona H2B
4	4.12	33	P05783	Citoqueratina 18, tipo I (CK-18)

A pesar de que el espectro de la fracción membranal de MCF-7 es pobre en iones (Fig. 19) pudimos determinar dos citoqueratinas: la CK18 y a CK8 (Tabla 8).

Tabla 8. Proteínas de la fracción subcelular MO de la línea celular MCF-7 obtenidas por MALDI-TOF/TOF.

N°	Unused	% Cov	# Acceso	Proteína
1	1.3	5.3	P05783	Citoqueratina 18, tipo I (CK-18)
2	1.22	9.3	P05787	Citoqueratina 8, tipo II (CK-8)

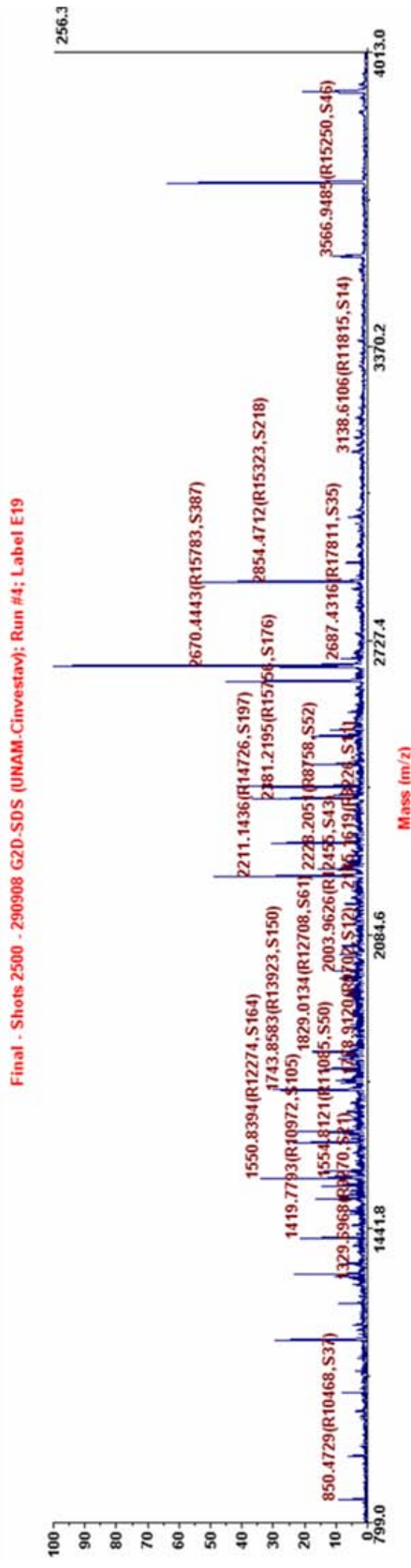


Figura 18. Espectro general de la línea celular de cáncer de mama MCF-7, fracción nuclear (NUC).

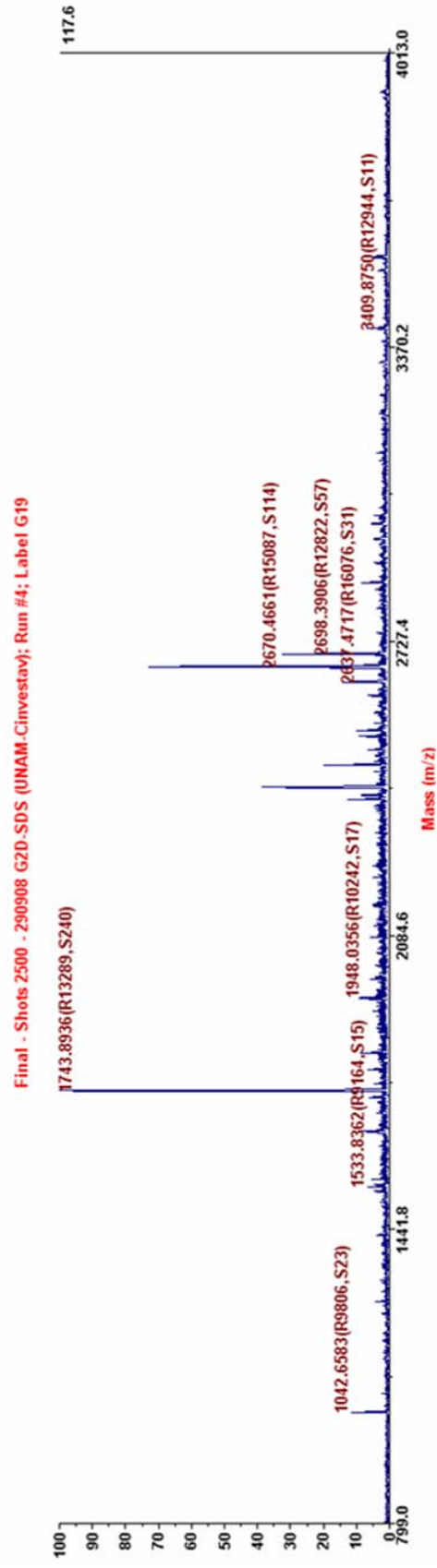


Figura 19. Espectro general de la línea celular de cáncer de mama MCF-7, fracción membranal.

La fracción citoplásmica de MCF-7 muestra tener muy pocos iones (Fig. 20) sin embargo determinamos la proteína albúmina (Tabla 9) que es la proteína más abundante del plasma celular.

Tabla 9. Proteína de la fracción subcelular CYTO de la línea celular MCF-7 obtenida por MALDI-TOF/TOF.

N°	Unused	% Cov	# Acceso	Proteína
1	2.29	4.3	000097	Albúmina

Determinamos dos proteínas dentro de la fracción citoesquelética de MCF-7: (Tabl 10) la CK8 y la actina, a pesar de que el espectro general se encontraba pobre en iones (Fig. 21).

Tabla 10. Proteínas de la fracción subcelular CSK-MAT de la línea celular MCF-7 obtenidas por MALDI-TOF/TOF.

N°	Unused	% Cov	# Acceso	Proteína
1	4.05	40.2	P05787	Citoqueratina 8, tipo II (CK-8)
2	0.76	21.8	P68032	Actina

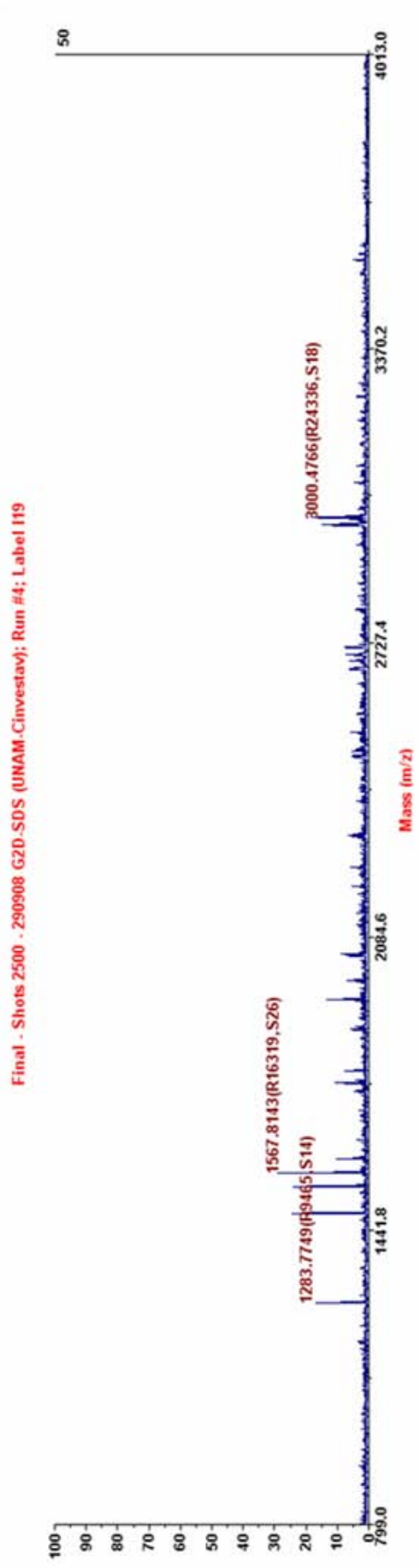


Figura 20. Espectro general de la línea celular de cáncer de mama MCF-7, fracción citoplásmica (CYTO).

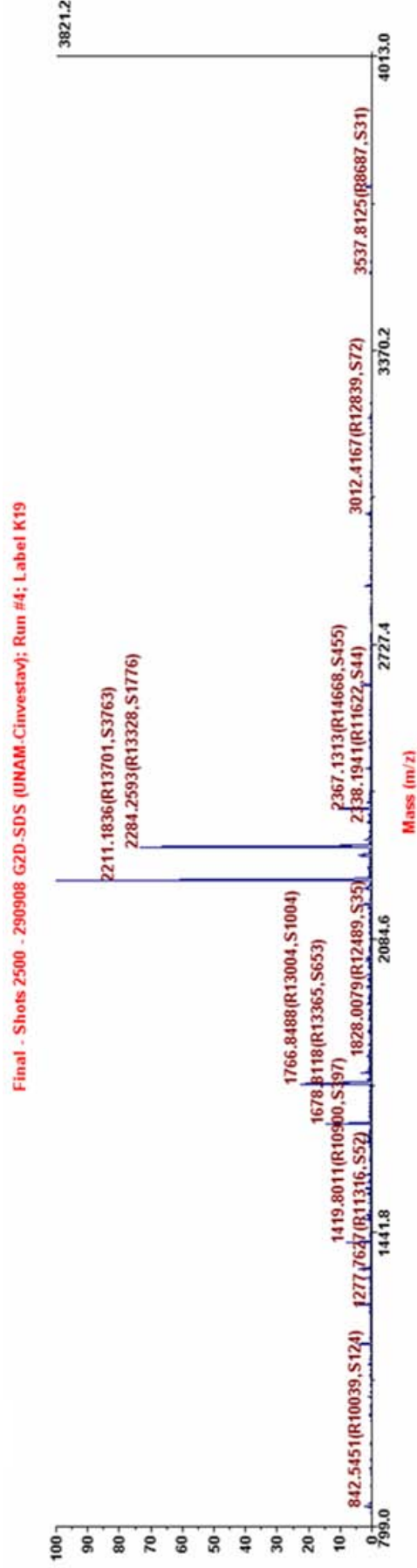


Figura 21. Espectro general de la línea celular de cáncer de mama MCF-7, fracción de citoesqueleto.

## CAPÍTULO VII

### DISCUSIÓN

Este trabajo es uno de los primeros que se elaboraron en nuestro laboratorio probando tecnología proteómica, por lo que primero fue necesario estandarizar las técnicas adecuadas para una obtención considerable de proteínas, los cultivos de las líneas celulares en un 80% de su capacidad y estandarizar la cuantificación proteica. A esto se debe el pequeño número de ellas, puede ser que sea necesario aplicar alguna otra condición para que la obtención de proteínas sea más favorable (p.ej. aumentar para su análisis la cantidad de muestra), sin embargo, al obtener el *mining* de ambas líneas celulares se detectaron varias proteínas que se encuentran directamente relacionadas con cáncer mamario tal es el caso de las citoqueratinas, como la CK19 y la CK20. Uno de los roles más novedosos que se le han atribuido a las citoqueratinas es el de actuar como marcadores tumorales, lo cual se logra por medio de anticuerpos utilizados como marcadores inmunohistoquímicos. En algunos estudios la expresión de CK19 ha sido útil para diferenciar tumores sebáceos, ya sea adenomas, epitelomas o carcinomas basocelulares, cuando el diagnóstico es difícil de realizar; además en tumores neuroendócrinos de páncreas, cáncer de mama, cáncer de células transicionales y adenocarcinoma de colon, las CKs se han encontrado de mayor utilidad, ya que sirven no solo como herramienta diagnóstica, sino como marcadores del tipo de evolución tumoral y del pronóstico (Aquino y Jurado, 2008).

Las CK19 y la CK20 muestran un perfil muy restringido de expresión tisular y han sido exitosamente usados para la detección de células circulantes tumorales en sangre de pacientes con cáncer de mama, cáncer pulmonar y carcinomas gastrointestinales, así como la citoqueratina 16, que ha sido observada en los ductos de la glándula mamaria y la CK18 ha mostrado inducir la proliferación celular, (Roa, *et al*, 2004).

No obstante, algunos reportes han demostrado que la CK19 y la CK20, son expresados en muestras sanguíneas de individuos sanos y algunos investigadores demostraron que las diferencias en la sensibilidad de los

ensayos y en la forma de tomar la muestra podrían producir estas diferencias, incluso de la línea celular de la que se trate.

También ha demostrado claramente que las CK8, CK18 y CK19 son expresadas en la superficie de líneas celulares cancerosas, como es MCF-7 (Godfroid, *et al*, 1991; Gires, *et al*, 2005).

Las proteínas de choque térmico se expresan cuando una célula está en condiciones anormales o de estrés, lo cual explica que hayan sido detectadas en nuestro estudio, ya que pueden estar presentes en concentraciones altas en las células cancerosas. Hoy en día está en estudio el bloqueo de la actividad de una proteína de choque térmico llamada Hsp90 para el tratamiento de cáncer. Otras proteínas de choque térmico, como la Hsp70 y la gp96, están en estudio en vacunas para tratar el cáncer. En las proteínas de choque térmico, se ha demostrado que en células malignas su expresión es constitutiva, es por eso que pueden representar un papel crucial en la supervivencia y crecimiento de células cancerosas, pudiendo servir como un blanco terapéutico efectivo (Pick *et al*, 2007).

En el caso de la Hsp27 se ha mostrado tener una función antiapoptótica interfiriendo con la actividad de otras proteínas (Gruvberger-Saal y Parsons, 2006) pudiendo estar entre éstas la p53, ya que esta proteína conduce a apoptosis en células donde el daño al material genético es irreparable.

En el caso del “*shot gun*” de SK-BR-3 podemos apreciar en los resultados que se obtuvo una cantidad más elevada de proteínas que el “*shot gun*” de la línea celular MCF-7 y para las fracciones subcelulares de ambas líneas celulares, esto se debe a las técnicas proteómicas que se utilizaron en cada caso. Para el caso del “*shot gun*” de SK-BR-3 se utilizó HPLC 2DESI-MS/MS, por lo que la muestra antes de ser analizada pasa por una cromatografía de doble dimensión (intercambio iónico y fase reversa) lo que permite la separación de péptidos, así como la obtención de más resultados con más índice de confianza; para el caso del “*shot gun*” de MCF-7 y de las fracciones subcelulares de ambas líneas celulares, se utilizó la tecnología MALDI-TOF/TOF, es por esto que no se obtuvieron resultados numerosos ya que esta



tecnología no es recomendable para analizar muestras provenientes de extractos totales o mezclas muy complejas, estas muestras presentan mejores resultados siempre y cuando hayan pasado por una cromatografía anterior al MALDI-TOF/TOF.

Al analizar los resultados obtenidos en las fracciones subcelulares pudimos darnos cuenta que algunas de las proteínas obtenidas correspondían a la fracción en cuestión, tal es el caso de las histonas y algunas citoqueratinas que fueron obtenidas en la fracción nuclear (las citoqueratinas se pueden encontrar asociadas a la envuelta nuclear) y proteínas de metabolismo como la Piruvato deshidrogenasa que fue encontrada en la fracción citoplásmica, sin embargo las proteínas no siempre correspondían a la fracción adecuada, esto pudo deberse a que al retirar cada detergente (descrito en el Capítulo V) se pudo arrastrar cierta cantidad de proteína correspondiente al detergente anterior, mezclándose proteínas de cierta fracción con otra. Es por esto que se recomienda hacer muchos más ensayos con la técnica de DDF o utilizar la técnica de centrifugación para el fraccionamiento subcelular.

## **CAPTULO VIII**

### **CONCLUSIÓN**

-Este estudio fue dirigido a corroborar la capacidad de detección de proteínas a través del “*shot gun*”, obteniendo como resultado proteínas importantes para un futuro estudio de biomarcadores para cáncer de mama.

-Se obtuvo proteína con los métodos de solubilización proteica utilizados.

-De la línea celular SK-BR-3 se pudieron identificar un total de 21 proteínas por la tecnología de ESI-MS/MS con una eficiencia del 95%.

-De las fracciones subcelulares de ambas líneas celulares y el “*shot gun*” de MCF-7 se detectaron pocas proteínas debido al uso de la tecnología de MALDI-TOF/TOF (no recomendable para digestión en solución).

-Es necesario utilizar cromatografía líquida de alta resolución combinada con la espectrometría de masas en tándem (HPLC 2D-MS/MS) para mejores resultados, si se trata de una muestra de extractos totales o digestión en solución.

## **CAPÍTULO IX**

### **PERSPECTIVAS**

-Continuar con el desarrollo de estrategias efectivas para el aislamiento y/o purificación de proteínas, seguido de análisis por espectrometría de masas.

-De las proteínas que se sabe tienen alguna relación con el cáncer de mama y que se obtuvieron con en este trabajo, se sugiere realizar estudios exhaustivos para determinar su eficacia como biomarcadores de plasma específicos de esta enfermedad.

-Implementar otra línea celular como control ya sea MDA-MB-231 o MCF-10 A, consideradas como líneas celulares no tumorales, o bien, aislar tejido sano adyacente a un tumor canceroso de la mama para procesarlo y realizar un análisis proteico comparativo.

-Realizar una digestión proteica desde SDS-PAGE tomando en cuenta las proteínas que más se expresan con posterior análisis por espectrometría de masas.

-Implementar la tecnología con iTRAQ, para la obtención de resultados comparativos y mucho más rápidos entre una línea celular sana y una derivada de cáncer de mama.

-Utilizar solo HPLC 2DESI –MS/MS para mezcla de extractos totales o mezclas complejas, así como también HPLC acoplado a MALDI-TOF/TOF.

## **CAPÍTULO IX**

### **PERSPECTIVAS**

-Continuar con el desarrollo de estrategias efectivas para el aislamiento y/o purificación de proteínas, seguido de análisis por espectrometría de masas.

-De las proteínas que se sabe tienen alguna relación con el cáncer de mama y que se obtuvieron con en este trabajo, se sugiere realizar estudios exhaustivos para determinar su eficacia como biomarcadores de plasma específicos de esta enfermedad.

-Implementar otra línea celular como control ya sea MDA-MB-231 o MCF-10 A, consideradas como líneas celulares no tumorales, o bien, aislar tejido sano aledaño a un tumor canceroso de la mama para procesarlo y realizar un análisis proteico comparativo.

-Realizar una digestión proteica desde SDS-PAGE tomando en cuenta las proteínas que más se expresan con posterior análisis por espectrometría de masas.

-Implementar la tecnología con iTRAQ, para la obtención de resultados comparativos y mucho más rápidos entre una línea celular sana y una derivada de cáncer de mama.

-Utilizar solo HPLC 2DESI –MS/MS para mezcla de extractos totales o mezclas complejas, así como también HPLC acoplado a MALDI-TOF/TOF.

## CAPITULO X

### REFERENCIAS

Aebersold, D. Goodlett, R. (2003). *Rapid communications in mass spectrometry*. John Wiley & Sons, Ltd. 17(18):2093 – 2098.

Abramovitz M. Leyland-Jones. (2006). *A systems approach to clinical oncology: Focus on breast cancer*. Proteome Sci.4:5 doi:10.1186/1477-5956-4-5.

Aquino, PCG. Jurado, SCF. (2008). *Citoqueratinas en dermatología*. Dermatología. Rev Mex. 52 (6): 254-62.

Batista, FVC. (2000). *Tecnología proteómica*. Sociedad mexicana de Proteómica A.C.

Barker K. (1998). *At the Bench a laboratory navigator*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. 223-243.

Bertucci F., Birnbaum D. y Goncalves A. (2006). *Proteomics of breast cancer*. Molecular and Cellular Proteomics 5, 1772-1786.

Blot WJ. (1999). *Invited commentary: more evidence of increased risks of cancer among drinkers*. Am J Epidemiol. 150:1138-40.

Boyle P., Leon M.E., Maisonneuve P., Autier P. (2003). *Cancer control in Women. Update 2003*. Int. J. Gynaecol. Obstet. 83, 179-202.

Bronchud MH, Foote M, Giaccone G, Olopade O, Workman P. (2004). *Principles of molecular oncology*. 2°. Humana Press. Totowa, New Jersey. 247-259.

Carvalho, MP. (2004). *Búsqueda de mutaciones en los genes BRCA 1 y BRCA 2, en pacientes con cáncer de mama hereditario*. [En línea] <http://www.conicyt.cl/bases/fondecyt/proyectos/01/2001/1011076.html>

Castaño ME. *Estilo de vida para prevenir el cáncer de mama*. (2006). [En línea] [http://promocionsalud.ucaldas.edu.co/downloads/Revista%2011\\_2.pdf](http://promocionsalud.ucaldas.edu.co/downloads/Revista%2011_2.pdf)

Clarke PA, te Poele R, Workman P. (2004). *Gene expression microarray technologies in the development of new therapeutic agents*. Eur J Cancer; 17:2560-91.

Cnattingius S, Torrång A, Ekblom A, Granath F, et al. (2005). *Pregnancy characteristics and maternal risk of breast cancer*. JAMA 294:2474-80.

FEFOC: Educación pública y Formación Oncológica Continuada. (2001). *Lo que necesita saber sobre cáncer de mama*. Barcelona. 16:12:31

Ferlay J, Bray F, Pisani P & Parkin DM. GLOBOCAN (2002). *Cáncer Incidence. Mortality and Prevalence worldwide*. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. Lyon, IARC Press 2002.

Fisher B, Costantino JP, Wickerman DL, Redmond CK, Kavanah M, Cronin WM et al. (1998). *Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study*. J Natl. Cancer Insts. 90: 1371-88.

FUCAM, Fundación Mexicana de Fomento para la prevención Oportuna del Cáncer de Mama. (2004). [En línea] <http://www.fucam.org>.

Garber K. Genomic Medicine. (2004). *Gene expression tests foretell breast cancer's future*. Science; 303 (5665):1754-5.

Golub TR, Slonim DK, Tamayo P y col. (1999). *Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring*. Science; 286:531-7.

Gires, O; Andratschke, M; Schmitt, B; Mack, B; Schaffrik, M. (2005). *Cytokeratin 8 associates with the external leaflet of plasma membranes in tumour cells*. Biochem Biophys Res Commun. 328:1154–1162.

Godfroid, E; Geuskens, M; Dupressoir, T; Parent, I; Szpirer, C. (1991). *Cytokeratins are exposed on the outer surface of established human mammary carcinoma cells*. J Cell Sci. 99:595–607.

Gruvberger-Saal SK, Parsons R. (2006). *Is the small heat shock protein alphaB-crystallin an oncogene?*. J Clin Invest. 116(1):30-2

Hartmann A, Blaszyk H, Kovach JS, Sommer SS (1997). *The molecular epidemiology of p53 gene mutations in human breast cancer*. Trends. Genet.: 13 (1): 27-33.

Heredia AM, Bautista LS. (2007). *Correlación de factores de riesgo y hallazgos clínicos para cáncer mamario en pre y posmenopáusicas*. Rev Fac Med UNAM. 50(3):110-4.

Hernández MG, Bernardello ETL, y Aristodemo PJ. (1998). *Cáncer de mama*. McGraw Hill. Interamericana de Venezuela, S.A. Venezuela. 550 pp.

Heukeshoven J, Dernick R. (1985). *Simplified method for silver staining of proteins in poly-acrylamide gels and the mechanism of silver staining*. Electrophoresis. 6:103-12.

Hondermarck, H. (2003). *Breast cancer: when proteomics challenges biological complexity*. Mol. Cell. Proteomics. 281-291.

INCEU: Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos. URL: <http://www.cancer.gov/>.

Jee S, Yun J, Park E, Cho E, et al. (2008). *Body mass index and cancer risk in korean men and women*. Int J Cancer. 123(8):1892-6.

Kinter, M. Sherman, NE. (2000). *Protein Sequencing and identification using Tandem Mass Spectrometry*. John Wiley & Sons, Inc. USA. 295.

Kulasingam V. y Diamandis E. P. (2007). *Proteomic Analysis of Conditioned Media from Three Breast Cancer Cell Lines: A Mine for Biomarkers and Therapeutic Targets*.

Lin Y, Kikuchi S, Tamakoshi K, Wakai K, et al. (2008). *Active smoking, passive smoking and breast cancer risk: findings from the Japan Collaborative Cohort Study for Evaluation of Cancer Risk*. J Epidemiol. 18(2):77-83.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL y Randall RJ. 1951. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

Luna, AJP y Orozco, OE. (2008). *La nueva biología del siglo XXI: La proteómica como una parte esencial y como frontera de la biomedicina*. México. CINVESTAV, 41.

Martínez-Abundis G, Cano-Ríos P, González-Hernández S, Rosales-Hernández F. (2004). *Factores predisponentes al cáncer de mama en la Región Lagunera*. Ginecol Obstet Mex 72:525-30.

Masaki M., Ikeda A., Shiraki E., Oka S., Kawasaki T. (2003). *Mixed lineage kinase LZK and antioxidant protein-1 activate NF-kappaB synergistically*. Eur. J. Biochem. 270:76-83.



Mettlin C. (1999). *Global Breast Cancer Mortality Statistics*. CA Cancer. J Clin 49:138-44.

Organización Mundial de la Salud (2009). *Cáncer*. Nota descriptiva N°297, Julio de 2008. URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html>

Osborne CK (1998). *Tamoxifen in the treatment of breast cancer*. N Engl. J Med. 339(22): 1609-1618

Pasquialini, JR. (2002). *Breast cancer, prognosis, treatment, and prevention*. Marcel Dekker, INC. New York. 634.

Pick E; Kluger Y; Giltnane JM; Moeder C; Camp RL; Rimm DL y Kluger HM. (2007). *High HSP90 Expression Is Associated with Decreased Survival in Breast Cancer*. Cancer Res. 67(7):2932-7

Pro-Q ® Diamond Phosphoprotein Gel Stain. 2005.

Rica, EML. (2004). *Cáncer de mama tipos y estadiaje*. Clínica Médico Quirúrgica MONTPELLIER.

Rodríguez-Cuevas SA y Luna, AJP. (2007). *Impacto de las firmas genómicas en la decisión terapéutica del cáncer de mama*. 6(75)415-417.

Rodríguez-Cuevas SA, Labastida AS, Tapia R, Kuri P, Macías C. (1999). *Registro histopatológico de Neoplasias en México. Población derechohabiente del IMSS 1991-1996*. Ciencia y Cultura Latinoamericana, México D.F. 56.

Rodríguez S, Carpuso M. (2006). *Epidemiología del cáncer de mama*. Ginecol Obstet Max ;74(11):585-93.

Sambrook, J y Russell, DW. (2001). *Moleciular cloning a laboratory manual*. 3ª. Coldspring Harbor Laboratory press.

Sandoval GF, Cárdenas SJ. Segunda revisión del Consenso Nacional Sobre el Diagnóstico y Tratamiento del Cáncer Mamario. Colima, México. (2005). [En línea] <[http://www. medigraphic.com/espanol/e-htms/e-revmexmastol/e-ma2006/e-ma06-1/em-ma061e.htm](http://www.medigraphic.com/espanol/e-htms/e-revmexmastol/e-ma2006/e-ma06-1/em-ma061e.htm).>

Singletary SE. (2003). *Rating the risk factors for breast cancer*. Ann Surg 237:474-82

Simpson JR. (2003). *Proteins and Proteomics a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. 91-142 pp.

Simpson JR, Connolly LM, Eddes JS, Pereira JJ, Moritz RL, Reid GE. (2000). *Proteomic analysis of the human colon carcinoma cell line (LIM 1215): development of a membrane protein data-base*. Electrophoresis. 21:1707-1732.

Song Y, Sung J, Ha M. (2008). *Obesity and risk of cancer in postmenopausal Korean Women*. J Clin Oncol. 26(20):3395-402.

Steen H. y Mann M. (2004). *The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing*. Nature reviews. 5: 699-710.

Stone M.R., O'Neill A., Catino D., Bloch R.J. (2005). *Specific interaction of the actin-binding domain of dystrophin with intermediate filaments containing keratin 19*. Mol. Biol. Cell 16:4280-4293.

Tisdale E.J. (2002). *"Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is phosphorylated by protein kinase Ciota /lambda and plays a role in microtubule dynamics in the early secretory pathway."* J. Biol. Chem. 277:3334-3341.

Torres, MS. (1986). *Proteínas de oncogenes y Base Molecular del Cáncer*. 2ª. Prensa científica S.A. España. 86-103.

Torres MG.; Hernández AM. y Romieu I. (2005). *Factores de riesgo de cáncer de mama en México: patrones mamográficos, péptido C y factores de crecimiento. Un estudio multicéntrico.* CONACYT.

Trujillo, TR. (1999). *Tumores de mama.* 2a. McGraw-Hill Interamericana. México. 398.

Unwin RD, Craven RA, Harnden P, Hanrahan S, Totty N, Knowles M, Eardley I, Selby PJ, Banks RE. (2003). *Proteomic changes in renal cancer and co-ordinate demonstration of both the glycolytic and mitochondrial aspects for the Warburg effect.* Proteomics. 3:1620-1632.

van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ y col. (2002). *Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer.* Nature; 415 (6871):530-536.

van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ y col. (2002). *A gene expression signature as a predictor of survival in breast cancer.* N Engl J Med; 347 (25):1999-2009.

Vieira, DS. Dufloth, RM. Schmitt, FC y Zeferino, LC. (2008). *Breast cancer: new concepts in classification.* Rev. Bras Ginecol Obstet. 30(1):42-7.

Vogel VG, Costantino JP, Wickerham DL, Cronin WM, Cecchini RS, Atkins JN, Bevers TB, Fehrenbacher L, Pajon ER, Wade JL, Robidoux A, Margolese RG, James J, Lippman y col (2006). *Effects of tamoxifen vs raloxifen on the risk of developing invasive breast cancer and other disease outcomes.:The NSABP Study of tamoxifen and raloxifen (STAR) P-2trial.* JAMA 295: 2727-2743.

Washburn, y cols, (2001) Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. Nat Biotechnol. 2001 Mar; 19 (3):242-7. PMID: 11231557.

Wadlow R, Ramaswamy S. (2005). *DNA microarrays in clinical cancer research*. *Curr Mol Med*; 5 (1):111-120.

Weigelt B, Peterse JL, van 't Veer LJ. (2005). Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer*; 5 (8):591-602.

Whiteaker JR., Zhang H., Wnag P., Spratt KS., Ivey GR., Piening DB., Feng L., Kasarda E., Gurley EK., Eng KJ., Codos LA., Kemp CJ., McIntosh MW. y Paulovich, GA. (2007). *Integrated pipeline for Mass Spectrometry-Based Discovery and Confirmation of biomarkers Demonstrated in a mouse Model of breast cancer*. *J. Prot. Res.*