



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**EVALUACIÓN DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE  
HIF-1 $\alpha$  Y GENES GLUCOLÍTICOS EN BIOPSIAS DE  
CÁNCER DE MAMA.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

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

**SILVIA CECILIA PACHECO VELÁZQUEZ**



**DIRECTOR DE TESIS:  
Dr. JUAN CARLOS GALLARDO PÉREZ  
Dra. SARA RODRÍGUEZ ENRÍQUEZ**

**2012**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **Agradecimientos a:**

### **Mis tutores;**

Dr. Juan Carlos Gallardo Pérez

Dra. Sara Rodríguez Enríquez

Son tutores, guías, gurús, padres, maestros, jefes y amigos.

### **Los investigadores que aportaron consejos, críticas y enseñanzas para realizar mi proyecto;**

Dr. Alvaro Marín Hernández

Dr. Rafael Moreno Sánchez

Tod@s los investigador@s del departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”

**Banco de tumores del Instituto Nacional de Cancerología**

**Programa de Becas de Inicio a la Investigación (PROBEI)**

**CONACYT**

**STUNAM**

**Dedicatoria a:**

**Mi familia;**

M. Silvia Velázquez Miranda  
Ramón Pacheco Ladrón de Guevara  
Cristina A. Pacheco Velázquez  
Elvira Sanabria Ortega †  
Ujur

**Mi HIF-1 $\beta$  y complejo p300/CBP;**

Yamil Villalba Villareal

**Mis amig@s de la vida;**

Valentina  
Akatzin  
Betsy  
Ale  
Mitzy  
Karla

**Mis camaradas de cardio;**

Edna  
Nadia  
Sayra  
Andrei

**Diana Caballero...FOCUS!**

**Todos los que han sido parte de mi vida...**

¿Por qué la tierra es mi casa? ¿Por qué la noche es oscura?  
¿Por qué la luna es blanca que engorda como adelgaza?  
¿Por qué una estrella se enlaza con otra, como un dibujo?  
Y ¿por qué el escaramujo es de la rosa y del mar?

Yo vivo de preguntar, saber no puede ser lujo.

El agua hirviendo en puchero suelta un ánima que sube  
a disolverse en la nube que luego será aguacero.  
Niño soy tan preguntero, tan comilón del acervo,  
que marchito si le pierdo una contesta a mi pecho.

Si saber no es un derecho, seguro será un izquierdo.

Yo vine para preguntar flor y reflujo.  
Soy de la rosa y de la mar, como el escaramujo.

Soy aria, endecha, tonada, soy Mahoma, soy Lao-Tsé,  
soy Jesucristo y Yahvé, soy la serpiente emplumada.  
Soy la pupila asombrada que descubre como apunta  
Soy todo lo que se junta para vivir y soñar.

Soy el destino del mar, soy un niño que pregunta.

*-Silvio Rodríguez-*

Examinen fragmentos de pseudociencia y encontrarán un manto de protección, un  
pulgar que chupar, unas faldas a las que agarrarse.

Y, ¿qué ofrecemos nosotros a cambio?  
¡Incertidumbre! ¡Inseguridad!

*-Isaac Asimov-*

## Índice

Agradecimientos .....	1
Dedicatoria.....	2
Abreviaturas.....	5
Resumen .....	6
Introducción .....	8
1. Epidemiología del cáncer de mama.....	8
2. Empleo de biomarcadores en Cáncer de Mama .....	9
2.1. Biomarcadores y detección del cáncer de mama.....	10
2.2. La búsqueda de nuevos biomarcadores.....	14
3. El cáncer como un proceso multifactorial para la búsqueda de biomarcadores .....	15
4. Hipoxia y el Factor Inducido por Hipoxia, HIF-1 $\alpha$ .....	16
5. Metabolismo glucolítico en cáncer y su relación con el factor inducido por hipoxia (HIF-1 $\alpha$ ).....	20
5.1. Enzimas glucolíticas reguladas por HIF-1 $\alpha$ .....	21
5.2. Metabolismo mitocondrial relacionado con HIF-1 $\alpha$ .....	23
6. HIF-1 $\alpha$ y el metabolismo energético en biopsias de cáncer de mama.....	25
Justificación .....	27
Hipótesis .....	28
Objetivos.....	29
Principal.....	29
Particulares .....	29
Materiales y métodos.....	30
Resultados .....	33
Expresión proteica de HIF-1 $\alpha$ y enzimas glucolíticas .....	35
Análisis de actividades de HK y LDH .....	38
Expresión proteica de enzimas mitocondriales.....	39
Expresión proteica de biomarcadores canónicos .....	42
Tumor filoides benigno.....	44
Discusión .....	46
Conclusiones .....	57
Referencias.....	58
Apéndices .....	65

## Abreviaturas

**ADP**, Adenosin difosfato; **ANT**, Traslocasa de Nucleótidos de Adenina (siglas en ingles); **ATP**, Trifosfato de adenosina; **ATP-asa**, ATP-sintasa; **COX**, Citocromo oxidasa; **ADN**, Ácido desoxirribonucleico; **DTT**, Ditioneitol; **EDTA**, Ácido etilendiaminotetraacético; **FO**, Fosforilación oxidativa; **GA**, Glutaminasa; **GLUT**, Transportador de glucosa; **Her-2**, Receptor del factor de crecimiento epidérmico en humano tipo 2; **HIF-1 $\alpha$** , Factor inducible por hipoxia-1 alpha; **HK**, Hexocinasa (siglas en inglés); **ERH**, Elementos de respuesta a hipoxia; **INC**, Instituto Nacional de Cardiología; **INCAN**, Instituto Nacional de Cancerología; **LDH**, Lactato Deshidrogenasa; **mRNA**, Ácido ribonucleico mensajero; **NADH**, Forma reducida del dinucleótido de nicotinamida adenina; **NAD<sup>+</sup>**, Forma oxidada de la dinucleótido de nicotinamida; **DDO**, Dominio de degradación dependiente de oxígeno; **PAS**, dominio PER ARNT SIM; **HPs**, -Hidroxilasas de residuos de prolina; **PDH**, Complejo Piruvato Deshidrogenasa; **PDK**, Cinasa del complejo piruvato deshidrogenasa (siglas en inglés); **pVHL**, Proteína Von Hippel-Lindau; **RE**, Receptor de estrógeno; **ROS**, Especies reactivas de oxígeno; **RP**, Receptor de progesterona; **SBR**, Escala Scarf Bloom Richardson; **succinil-CoA**, Succinil coenzima A; **2-OGDH**,  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa.

## Resumen

En nuestro país, el cáncer de mama es la primera causa de muerte por cáncer en mujeres entre 35-65 años. Aunque la causa aparente no es clara se ha identificado que la edad, la obesidad, la menopausia tardía y la menarca temprana pueden estar relacionadas a la alta incidencia de este padecimiento, por lo que es importante establecer mejores métodos de detección y tratamiento. En México, el análisis clínico posterior al diagnóstico inicial, se basa en la detección en la expresión de los receptores de estrógeno (RE), de progesterona (RP) y del factor de crecimiento epidérmico humano tipo 2 (Her-2) los cuales no siempre están sobre-expresados en un tejido mamario sano. Sin embargo, estas proteínas pueden no expresarse, expresarse en diferente intensidad, o bien pueden expresarse independientemente de la enfermedad, ocasionando falsos positivos y falsos negativos, disminuyendo la eficacia del ensayo (se reporta un 19% de falsos positivos para RE y una respuesta positiva del 27% a tratamiento con hormonas para pacientes positivos a RE; por último hay un 20% de pacientes que no presentan una sobre-expresión de Her-2, RE y RP (fenotipo triple negativo)). Un análisis más detallado del estudio de estos biomarcadores revela que la mayoría de los estudios clínicos se centran en la detección de una sola proteína o un solo proceso celular sin tener en consideración que el cáncer es un proceso multifactorial. Por lo tanto, la búsqueda de nuevos biomarcadores que puedan detectar eficientemente la presencia de células cancerosas sigue siendo un tópico de interés, siempre y cuando sean validados por los biomarcadores canónicos ya conocidos

Debido a que el cáncer es una enfermedad multifactorial, se pretende analizar de manera simultánea, diferentes biomarcadores que integren la gama de procesos metabólicos involucrados en el origen y progresión del cáncer. Al parecer, la baja tensión de oxígeno (hipoxia) encontrada en regiones alejadas de los vasos sanguíneos en los tumores sólidos, conlleva a un cambio en el metabolismo energético, condición característica de todos los tipos de cáncer estudiados. La limitación de oxígeno estabiliza a un factor transcripcional llamado factor inducido por hipoxia-1 alfa (HIF-1 $\alpha$ ) cuya activación regula positivamente diversas proteínas involucradas en proliferación celular, la angiogénesis y la apoptosis, pero además proteínas que integran la glucólisis y la fosforilación oxidativa. Se ha observado que HIF-1 $\alpha$  regula la sobre-expresión de todas las enzimas involucradas en la glucólisis, favoreciendo el incremento del flujo de la vía glucolítica en los tumores. Además de ésta regulación se ha observado que la sobre-expresión de ésta proteína está relacionado con fenotipos más malignos. Por ello,

HIF-1 $\alpha$  se ha propuesto como biomarcador en diversos tipos de cáncer como son mama, colon y próstata. El empleo de HIF-1 $\alpha$  y su efecto sobre el metabolismo energético como biomarcadores es una propuesta novedosa ya que no se ha propuesto su expresión conjunta como biomarcador ni se ha realizado un análisis con los biomarcadores canónicos o clásicos establecidos para cáncer de mama.

Por lo tanto este trabajo propone que el contraste en los niveles de expresión de genes glucolíticos, mediado por la estabilización de HIF1- $\alpha$ , en tumores mamarios y tejido mamario sano servirá junto con otros biomarcadores canónicos para proponer posibles alternativas en la detección del cáncer de mama. Bajo esta perspectiva se analizaron un total de 23 muestras tumorales y 5 muestras no tumorales proporcionadas por el Banco de Tumores del Instituto Nacional de Cancerología (INCAN). El análisis densitométrico por western blot reveló que las 23 muestras analizadas presentaron un aumento considerable en el nivel de expresión de HIF-1 $\alpha$  así como de sus genes glucolíticos blanco HKI, HKII y LDH-A (0.6, y 4 veces para HKI y LDH-A) con respecto a la muestra de tejido no tumoral. Sin embargo, el aumento en la expresión de HKI, HKII así como de LDH-A del tejido tumoral no correlacionó con un aumento substancial en la actividad de dichas enzimas. De hecho, no se encontró diferencia significativa entre las actividades tumorales y no tumorales. Para HK, la actividad en ambos tejidos fue alrededor de 13-22 mU/mg proteína, mientras que para la LDH-A, la actividad de ambos tejidos osciló alrededor de 307-474mU/mg proteína. El análisis de enzimas mitocondriales reveló que los niveles de expresión de COX-IV, 2OGDH y GA de muestras tumorales fueron similares a las muestras no tumorales; mientras que la ATP-asa aumentó (80%) y el ANT disminuyó considerablemente (98%) con respecto a las muestras no tumorales. El aumento en la expresión de HIF-1 $\alpha$ , LDH-A, HKI y HKII en tejido tumoral correlacionó con una expresión significativa de los biomarcadores canónicos Her-2, ki67 y C-Myc (80-130% de incremento contra el control de carga) *versus* un 0% de expresión respecto a la muestra no tumoral.

Con los resultados obtenidos es posible sugerir un perfil de expresión proteico de cáncer de mama en pacientes mexicanas del INCAN el cual es la suma de los siguientes biomarcadores: HIF-1 $\alpha$  + HKI + HKII + LDH + Her-2 + Ki67 + C-Myc. Este perfil puede ser útil para mejorar la detección y diagnóstico del de cáncer de mama.

## **Introducción**

### **1. Epidemiología del Cáncer de Mama.**

El concepto de cáncer integra a un conjunto de enfermedades dependientes del órgano o tejido de origen cuyas principales características son mantener una proliferación celular descontrolada y presentar capacidad de invasión a otros tejidos [Vogelstein y Kinzler, 2004]. Los ductos lactíferos, los lóbulos lactíferos y el tejido conectivo son los tejidos mamarios más susceptibles de presentar cáncer [Martínez-Tlahuel, 2007], dando como resultado un tumor con potencial para invadir tejidos adyacentes a la mama, comprometer ganglios linfáticos y metastatizar a órganos distantes del cuerpo [Martínez-Tlahuel, 2007].

Las estadísticas mundiales señalan al cáncer como una de las principales causas de muerte en las mujeres. En el año 2008, 7.6 millones de personas murieron a causa de esta enfermedad, lo que corresponde al 13% de las defunciones mundiales [WHO, 2011]. A nivel nacional, el cáncer fue la tercera causa de muerte en el mismo año [INEGI, 2011]. El cáncer de mama, entre todos los tipos de cáncer, representó la principal causa de muerte por cáncer (con un 13.4%) entre mujeres de 35-65 años [INEGI, 2011], lo que lo coloca como un problema de salud pública en México.

Dada su alta incidencia y alta tasa de mortalidad [INEGI, 2011], se han buscado nuevas estrategias para mejorar el diagnóstico y pronóstico del cáncer de mama. Se han caracterizado factores pronósticos propios del tumor y de las pacientes, se ha implementado el manejo multimodal, que incluye terapias neoadyuvantes, adyuvantes, radioterapia y el empleo de nuevos fármacos dirigidos hacia blancos moleculares aplicados tanto en etapas tempranas, como avanzadas de la enfermedad [Zeichner y Candelaria, 2006]. Si bien existen nuevas metodologías empleadas para detectar y combatir el cáncer de mama, su incidencia actual y su porcentaje de defunciones indica que las estrategias de tratamiento han sido poco exitosas y por lo tanto es necesaria la búsqueda de nuevos biomarcadores que permitan una eficiente detección y posteriormente un tratamiento adecuado de la enfermedad.

## 2. Empleo de biomarcadores en Cáncer de Mama.

Un biomarcador se define como alguna alteración o modificación celular, bioquímica o molecular, que puede ser medida y evaluada como indicador de un proceso biológico, patogénico o de respuesta farmacológica a una intervención terapéutica [Mayeux, 2004]. Esta definición también incluye a las herramientas y tecnologías que puedan asistir en la forma del diagnóstico, predicción y el descubrimiento de posibles causas de una enfermedad, a la progresión o regresión de la enfermedad y al resultado del tratamiento clínico sobre ésta [Mayeux, 2004]. En el ámbito del cáncer, los biomarcadores se definen como moléculas biológicas medidas en líquidos corporales o tejidos que representen un síntoma de procesos normales, anormalidades, condiciones especiales o enfermedades [Mayeux, 2004]. De igual forma un biomarcador se puede utilizar para observar la respuesta ante un tratamiento específico contra una condición patológica [Madu, 2010].

Los biomarcadores moleculares en la clínica para el cáncer de mama han sido empleados para la prognosis, la predicción y la farmacodinamia de la enfermedad [Sawyers, 2008]. Los biomarcadores pronósticos permiten a) predecir el comportamiento natural de un cáncer en un individuo; b) distinguir los tumores con "buen pronóstico" *versus* los de "mal pronóstico", (*i.e.* en tumores positivos a los receptores de estrógeno (RE) la esperanza de vida a 5, 10 y 15 años es del 93%, 80% y 69% respectivamente, definiéndose como buen pronóstico; mientras que los tumores negativos a RE la esperanza de vida es de 86%, 60% y 38% respectivamente, definiéndose como mal pronóstico [EBCTCG, 2005]); y, c) ayudar a decidir el tratamiento clínico a seguir. Por otra parte los biomarcadores predictivos (o de respuesta) evalúan la probabilidad de obtener beneficios a largo plazo ante un tratamiento particular. Por último los biomarcadores farmacodinámicos miden los efectos de un fármaco o tratamiento a corto plazo en el tumor o en el huésped y pueden ser utilizados para seleccionar la dosis de la droga en las primeras etapas de desarrollo clínico [Sawyers, 2008].

## 2.1 Biomarcadores y detección del cáncer de mama.

Para detectar el cáncer de mama y establecer el diagnóstico inicial (el estadio en el cual se encuentra el tumor) se evalúan características clínico-patológicas de la enfermedad mediante análisis morfológicos e histológicos [Fitzgibbons *et al.*, 2000].

El análisis morfológico consta de la inspección ocular y la palpación en la mama para detectar bultos o crecimientos irregulares. Tras la identificación de un abultamiento (nódulo) en la mama se realiza una mamografía (análisis por rayos X) o un ultrasonido para determinar la forma y el tamaño del crecimiento irregular [ACS, 2010]. Con estas técnicas, además, se puede detectar si el cáncer presenta dispersión hacia nódulos linfáticos o ganglios axilares [ACS, 2010]. Para el análisis histológico es necesario extraer una fracción del tejido mamario con sospecha de ser tumoral (biopsia) para determinar el conteo mitótico (la cantidad de células dividiéndose), las anomalías nucleicas (núcleos irregulares o de diferente tamaño respecto a núcleos controles) y el número de túbulos formados *de novo* [ACS, 2010]. Sin embargo, la identificación de células cancerosas por medio de análisis histológico o inmunohistoquímico presenta un alto porcentaje de falsos negativos (19%; [revisado en Regil-Hallmann *et al.*, 2008]) debido a que: 1) la selección de un punto de corte (*i.e.* la intensidad de la tinción, el conteo mitótico o la morfología) queda a criterio de la inspección ocular del patólogo y 2) la intensidad de la señal inmunohistoquímica será mayor o menor dependiendo del sitio donde fue obtenida la muestra (la señal será más débil conforme se aleje del tumor) [revisado en Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2011]. Tras haber establecido el diagnóstico de cáncer de mama, es necesario determinar la presencia de factores pronósticos y predictivos para la toma de decisiones sobre el manejo, evolución y tratamiento de la enfermedad.

El grupo de Fitzgibbons (2000), clasificó varios biomarcadores (los cuales hasta ese momento, servían como indicadores pronósticos y predictivos en cáncer de mama) en tres categorías, de acuerdo con su utilidad clínica (Tabla 1) [Fitzgibbons *et al.*, 2000]. Sin embargo, la mayoría de éstos biomarcadores moleculares son analizados inmunohistoquímicamente, por lo que el resultado dependerá de la calidad de muestra (tejido fresco o fijado en parafina lo cual impide la interacción antígeno-anticuerpo), la dilución y la especie en la que se generó el anticuerpo que se emplee, la pericia y experiencia del patólogo que analice la muestra y el punto de corte que se le asigne al

biomarcador en el ensayo [Fitzgibbons *et al.*, 2000], lo que puede llevar a diagnósticos o elección de tratamientos incorrectos o incompletos (Tabla 2).

Tabla 1. Categorías de los principales biomarcadores empleados en cáncer de mama [revisado en Fitzgibbons *et al.*, 2001].

<b>Biomarcadores pronósticos y predictivos en cáncer de mama</b>		
<b>Categoría I</b>	<b>Categoría II</b>	<b>Categoría II</b>
<u>Biomarcadores clínicos</u>	<u>Biomarcadores validados</u>	<u>Biomarcadores en proceso de validación</u>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tamaño del tumor</li> <li>• Conteo de ganglios axilares y nódulos linfáticos invadidos por el cáncer</li> <li>• Conteo mitótico</li> <li>• Grado y tipo histológico</li> <li>• Presencia de micrometástasis</li> <li>• Sobre-expresión del receptor de estrógeno (RE) y de progesterona (RP)</li> <li>• Sobre-expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano tipo 2 (Her-2).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Factor de transcripción p53</li> <li>• Factor de proliferación Ki-67</li> <li>• Marcadores de síntesis de ADN: ciclinas D1 y E,</li> <li>• Oncogenes BRCA 1 y 2, C-Myc</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Evaluación de angiogénesis intratumoral,</li> <li>• Ploidía del ADN,</li> <li>• Proteína asociada al cáncer: pS2</li> <li>• Proteína pro-apoptótica Bcl-2,</li> <li>• Proteína proteolítica: Catepsina D</li> </ul>

En México los biomarcadores para cáncer de mama que se emplean rutinariamente en la clínica son el factor de crecimiento epidérmico en humano tipo 2 (Her-2), y los receptores de estrógeno (RE), y de progesterona (RP), como auxiliares en la elección de un tratamiento para combatir el cáncer [Pérez-Sánchez *et al.*, 2008; Ceballos-Cancino, 2008]. A partir de ellos se han descrito tres clasificaciones del

fenotipo de cáncer de mama: 1) los positivos a RE y RP y negativos a Her-2, 2) los positivos a Her-2 y negativos a ER y PR, y 3) la ausencia de la expresión de los tres, conocida como cáncer triple negativo [Anders y Carey, 2009; Loi, 2008]. Aunque en la clínica también se emplean otros biomarcadores clásicos o canónicos como son Ki-67, H-Ras y C-Myc [Lari y Kuerer, 2011] algunos tumores malignos los expresan independientemente del estadio en el que se encuentre el tumor (*i.e.* Ki-67 muestra una expresión semejante entre diferentes grados de malignidad tumoral [Burcombe *et al.*, 2005]) y algunos tejidos sanos muestran expresiones similares de algunos biomarcadores al compararse con el tumor (la expresión de p53 es semejante en el carcinoma de vejiga como en su tejido sano [revisado en Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2011]). Además el análisis de un biomarcador de manera individual reporta resultados contradictorios. Por ejemplo, Her-2 es una tirosina cinasa transmembranal que activa diversos factores transcripcionales involucrados en la proliferación celular, supervivencia, diferenciación, tanto en células normales como tumorales [King *et al.*, 1985; reportado en Gutierrez y Chiff, 2011]. Debido a que Her-2 se encuentra altamente amplificada y expresada durante la progresión del cáncer de mama (20% en muestras tumorales *versus* no tumorales) es considerado como un biomarcador pronóstico relativamente confiable [King *et al.*, 1985; Slamon *et al.*, 1987; Citri y Yarden, 2006; Moasser, 2007; Graus-Porta *et al.*, 1997; reportado en Gutierrez y Chiff, 2011]. Sin embargo, se han encontrado inconvenientes al evaluar únicamente a este biomarcador en cáncer de mama. Por ejemplo, algunos tumores pierden la expresión de Her-2 luego del tratamiento con trastuzumab (un anticuerpo monoclonal específico para Her-2) pero mantienen su fenotipo tumoral [Mitterdorf *et al.*, 2009, reportado en Gutierrez y Chiff, 2011], y el análisis inmunohistoquímico es variable dependiendo del patólogo, y del punto de corte que éste seleccione para indicar un cambio significativo (Tabla 2). En este sentido se hace evidente la necesidad de buscar nuevos biomarcadores en vías características del desarrollo tumoral, con técnicas más sensibles y cuantitativas, para mejorar la eficiencia en la identificación de células cancerosas. Adicionalmente estos análisis demuestran que la selección de un solo biomarcador o una sola vía de señalización para detectar la presencia de células cancerosas, no explica completamente el fenómeno multifactorial que es el cáncer y por lo tanto derivará en un diagnóstico deficiente. Por lo tanto, los estudios actuales se deben enfocar al análisis de diferentes factores en vías tumorales (de señalización y/o metabólicas) para la búsqueda de biomarcadores más eficientes del cáncer de mama.

Tabla 2. Biomarcadores moleculares empleados en la clínica para el cáncer de mama y sus consideraciones.

<b>Biomarcador (Rango de expresión en %)</b>	<b>Relacionado a:</b>	<b>Inconvenientes</b>	<b>Referencias</b>
<b>Her-2 (9-67)</b>	Regulación de la supervivencia y proliferación tumoral	75% de los tumores metastásicos con Her-2 sobre-expresado no responden positivamente al trastazumab	Lari y Kuerer, 2011 Gutierrez y Schiff, 2011 Vogel <i>et al.</i> , 2002 Burcombe <i>et al.</i> , 2005
	Respuesta positiva al tratamiento con trastazumab	Expresión semejante de Her-2 ante tratamientos de: trastazumab+quimioterapia+cirugía v.s. quimioterapia+cirugía  Her-2 no disminuye significativamente ante el tratamiento cirugía+quimioterapia.	
<b>RE (49-81)</b>	Regulación de la supervivencia y proliferación tumoral	El 27% de los tumores RE positivos y RP negativos responden positivamente al tratamiento hormonal	Lari y Kuerer, 2011 Gutierrez y Schiff, 2011 Mohammed <i>et al.</i> , 1986 Butler <i>et al.</i> , 1985
	Terapia hormonal		
<b>RP (41-83)</b>	Terapia hormonal	El 46% de los tumores RE negativos y RP positivos responden positivamente al tratamiento hormonal	Lari y Kuerer, 2011 Pérez <i>et al.</i> , 2008 Mohammed <i>et al.</i> , 1986 Butler <i>et al.</i> , 1985.
<b>BRCA1/ BRCA2 (20)</b>	Mutaciones de éste oncogen en tumores con el fenotipo triple negativo.	No hay un tratamiento específico contra este biomarcador validado clínicamente	Lari y Kuerer, 2011 Mangia <i>et al.</i> , 2011 Calvert y Azzariti 2011
	Cáncer hereditario.		
<b>Ki-67 (17-50)</b>	Marcador de proliferación.	Ki-67 no disminuye significativamente ante el tratamiento cirugía+quimioterapia.	Lari y Kuerer, 2011 Pérez <i>et al.</i> , 2008 Burcombe <i>et al.</i> 2005 Yerushalmi <i>et al.</i> , 2011
		No se ha logrado correlacionar un cambio en la expresión de este biomarcador con terapias adjuvantes o neoadjuvantes	

## 2.2 La búsqueda de nuevos biomarcadores.

En la actualidad, el descubrimiento de nuevos marcadores bioquímicos y genéticos ha impulsado el desarrollo (y mejoramiento) de nuevas terapias antineoplásicas personalizadas. Hoy en día, para la detección del cáncer de mama se utiliza la llamada “firma de expresión genética”, donde se analiza la expresión de mRNA de diversos genes involucrados en el desarrollo del fenotipo tumoral [van 't Veer *et al.*, 2008]. Por ejemplo, el MammaPrint® y el OncotypeDX® son dos análisis genéticos comerciales ampliamente utilizados en la clínica. El MammaPrint® es un análisis en tejido fresco, que comenzó con un escrutinio de 25,000 genes para finalmente seleccionar 70 cuya expresión está incrementada o disminuida respecto a tejido mamario sano. Con lo anterior se intentó clasificar a pacientes con cáncer de mama en alto y bajo riesgo de padecer metástasis [van 't Veer *et al.*, 2002].

Por otra parte, el OncotypeDX® analiza la expresión transcripcional de 21 genes con el propósito de pronosticar la respuesta del tumor al tratamiento con quimioterapia [Paik *et al.*, 2004]. Desafortunadamente, estas firmas subestiman el potencial de genes cuya regulación es a nivel transcripcional, post-transcripcional o post-traducciona. En efecto, una crítica a los análisis genéticos es que la expresión del gen, medida como el incremento en el contenido de mRNA, no garantiza la estabilidad ni mucho menos la funcionalidad de la proteína [ter Kuile y Westerhoff, 2001]. Asimismo, en la actualidad se asume erróneamente que el análisis por Northern blot, PCR en tiempo real (para medir la expresión del mensajero) o western blot (para medir la cantidad o nivel de expresión de la proteína) reflejará simultáneamente la actividad y la función de las enzimas metabólicas, las cinasas, los factores de transcripción, los receptores de membrana o los transportadores que puedan ser usados como biomarcadores en cáncer. Sin embargo, los cambios en la transcripción genética no siempre correlacionan con la función biológica y las proteínas pueden ser reguladas por procesos pos-traduccionales independientes del nivel de proteína o el nivel de expresión del ARN mensajero (mARN) por lo que resulta en un análisis incompleto [revisado en Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2011; Subramanian y Simon, 2010]. Se recomienda, por lo tanto, medir en paralelo la función o actividad de la proteína que se proponga como biomarcador, con el objeto de identificar el estatus funcional de la proteína y proponer una correlación con su nivel de expresión.

De acuerdo con los inconvenientes que presenta el análisis genómico y las desventajas que presentan el empleo de los biomarcadores canónicos actuales (Tabla 2), la propuesta de un análisis global (donde se realice un análisis simultáneo de un grupo de biomarcadores involucrados en diferentes vías que promuevan el fenotipo tumoral) es un requisito indispensable en la búsqueda de biomarcadores con un rango de certidumbre mayor [Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2011]. A pesar del empleo novedoso de las firmas genéticas los resultados actuales denotan la necesidad de profundizar en los estudios y llevar el análisis a un nivel más integral, donde se incluya un perfil molecular de genes, y/o proteínas específicas de distintas vías alteradas del tumor que mejore la detección del cáncer. El enfoque tradicional en la clínica actual involucra un grupo reducido de proteínas en una vía específica que suponen ser las únicas responsables del desarrollo tumoral [revisado en Lari y Kuerer, 2011; Pérez-Sánchez *et al.*, 2008]. Por ejemplo una vía fuertemente analizada es la proliferación celular, sin embargo (y mayoritariamente) sólo se analizan algunas ciclinas (A, D y E) y proteínas reguladoras del ciclo celular (16, p21 y p27) [Lari y Kuerer, 2011]. Esta aproximación resulta ser incorrecta e incompleta debido a la alta cantidad de proteínas modificadas en un tumor [Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2011]. Por ello, es esencial enfocarse al diseño de un perfil de biomarcadores donde se incluyan proteínas de diferentes vías (*ej.* metabolismo+ proliferación+ resistencia a drogas+ metástasis+ hipoxia+ angiogénesis) para tener un mejor entendimiento del cáncer, su progresión y su posible tratamiento [Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2011]. Lo anterior representa un modelo a seguir en nuestro grupo de investigación (Apéndice 1).

### **3. El cáncer como un proceso multifactorial para la búsqueda de biomarcadores.**

Los tumores sólidos presentan diferentes vías metabólicas y de señalización alteradas [Sawyers, 2008]. Hanahan y Weinberg (2000) identificaron 6 sellos (hallmarks) característicos presentes en la mayoría de los tumores, estos incluyen: el mantenimiento de señales proliferativas, la evasión a los supresores de crecimiento, la resistencia a la muerte celular, la inmortalidad replicativa, la angiogénesis y la metástasis activa [Hanahan y Weinberg, 2000]. Sin embargo, en la última década se incluyeron 4 características adicionales que han ayudado a definir el aspecto molecular y bioquímico del fenotipo tumoral: la inestabilidad genómica, la inflamación crónica, los mecanismos de evasión contra el sistema inmune y, de manera importante, la reprogramación del

metabolismo energético [Hanahan y Weinberg, 2011]. Ésta última característica conocida también como el *Efecto Warburg* se define como la aceleración de la glucólisis tumoral en condiciones aeróbicas [Warburg, 1959]. Hasta la fecha, todos los tumores estudiados mantienen activa la glucólisis debido a la presencia de oncogenes, proteínas tumorales y factores transcripcionales que actúan activando la vía glucolítica [Moreno-Sánchez *et al.*, 2007; Semenza, 2008]. Al respecto, uno de los mecanismos moleculares involucrados en la reprogramación del metabolismo energético es la proteína HIF-1 $\alpha$ , un factor de transcripción estabilizado por la hipoxia intratumoral y que es responsable de la transcripción de todos los genes dentro de la vía glucolítica [Marín-Hernández *et al.*, 2009; Semenza, 2010].

#### **4. Hipoxia y el Factor Inducido por Hipoxia, HIF-1 $\alpha$ .**

Los tumores sólidos se caracterizan por tener áreas de baja irrigación sanguínea y por la presencia de vasos sanguíneos caóticos e irregulares. El bajo abastecimiento de nutrientes y de oxígeno conlleva al desarrollo de regiones hipóxicas [Höckel y Vaupel, 2011; dos Santos *et al.*, 2004]. En tejidos no tumorales las regiones alejadas de los vasos sanguíneos mantienen concentraciones de O<sub>2</sub> alrededor de 30  $\mu$ M; por el contrario en normoxia la [O<sub>2</sub>] oscila de 30-90  $\mu$ M dependiendo del tejido (Fig. 1). En los tumores, dichas áreas hipóxicas registran [O<sub>2</sub>] menores a 14 $\mu$ M. Adicionalmente, una hipoxia severa, a la que pueden llegar a estar sometidas las células tumorales, ocurre cuando la concentración de oxígeno llega a 3 $\mu$ M [Vaupel *et al.*, 2007], esto debido a la incrementada proliferación de las células cancerosas y a la fragilidad de los vasos sanguíneos tumorales, su acomodo caótico y su constante creación y destrucción [Vaupel *et al.*, 1989]. La baja tensión de oxígeno altera la homeostasis de la célula y conduce a la estabilización de la isoforma 1 $\alpha$  del factor inducido por la hipoxia (HIF-1 $\alpha$ ).

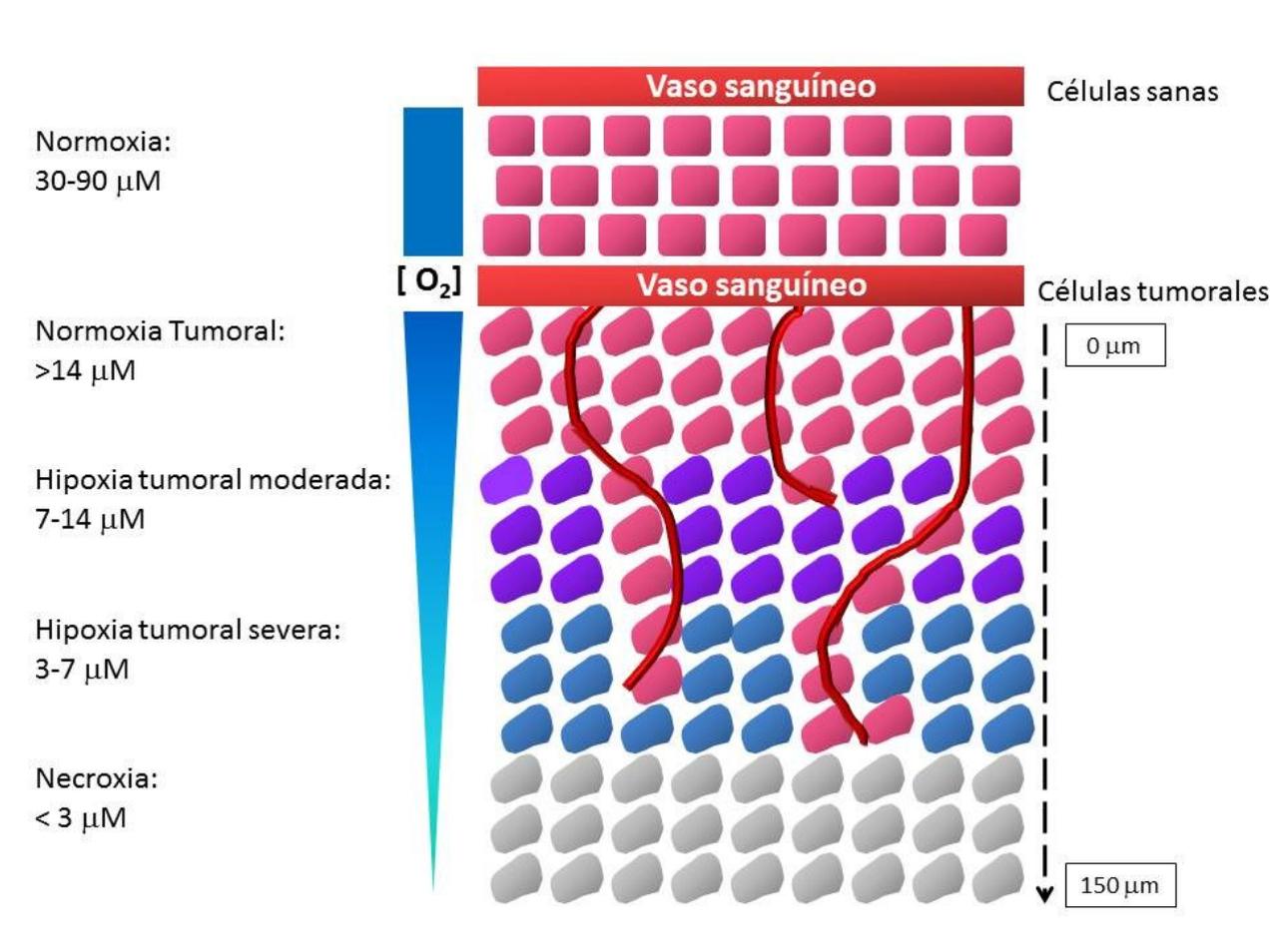


Figura 1. Cambios en las concentraciones (reportadas en micromolar  $\mu M$ ) de oxígeno en tumores sólidos respecto a su distanciamiento de los vasos sanguíneos.

*El Factor Inducido por Hipoxia (HIF).* Estructuralmente, HIF es una proteína heterodimérica constituida por dos subunidades pertenecientes a la superfamilia de factores transcripcionales hélice-asa-hélice básicos (bHLH): la subunidad HIF-1 $\alpha$  de 120 KDa y la subunidad HIF-1 $\beta$  de 94KDa (Fig. 2). El dominio bHLH permite su unión al ADN en sitios específicos (los llamados elementos de respuesta a hipoxia (ERH)) para actuar como factor de transcripción (Fig. 2). La subunidad más estudiada es HIF-1 $\alpha$  y su regulación está estrechamente relacionada con la concentración de oxígeno celular. HIF-1 $\alpha$  en condiciones normóxicas es hidroxilado por enzimas específicas ( hidroxilasas de residuos de prolina (HPs)) en dos distintos residuos de prolina: el 402 localizado dentro del dominio dependiente de la degradación por oxígeno (DDO) y, el 564 localizado dentro del dominio de trans-activación amino terminal (TAD-N), promoviendo su asociación con la proteína von Hippel-Lindau (VHL), una ligasa de ubiquitina E3 que favorecerá la degradación deHIF-1 $\alpha$  por el proteosoma (Fig. 2). Además en condiciones

normóxicas, las asparaginil hidroxilasas hidroxilan a la asparagina 803 localizada dentro del dominio de trans-activación carboxilo terminal (TAD-C). Esta hidroxilación promueve su interacción con el factor inhibitorio de HIF evitando que HIF-1 $\alpha$  se asocie con su co-activador transcripcional p300/CBP.

Por el contrario en condiciones hipóxicas (de 3 a 14  $\mu$ M de oxígeno) la actividad de las HPs disminuye debido a que la concentración de su sustrato es limitante ( $K_{m_{\text{Oxígeno}}}$  de la HPs es de 90 $\mu$ M), [Ehrismann *et al.*, 2007]. La disminución en la hidroxilación de HIF-1 $\alpha$ , promueve su posterior translocación y estabilización nuclear. De igual forma las HPs encargadas de hidroxilar a HIF-1 $\alpha$  requieren de  $\alpha$ -cetoglutarato y son reguladas por sustratos mitocondriales (succinato, fumarato, oxoglutarato y piruvato) garantizando la estabilización de HIF-1 $\alpha$  aún en condiciones normóxicas [revisado en Marín-Hernández *et al* 2009]. En el núcleo, HIF-1 $\alpha$  forma un complejo con su homodimero HIF-1 $\beta$ , (mediante un dominio conservado llamado PER ARNT SIM (PAS)). HIF-1 $\beta$  es constitutivo, reside en el núcleo en condiciones basales [Brahimi-Horn y Pouysségur, 2009; Marín-Hernández *et al.*, 2009], (Fig. 2). El complejo HIF-1 $\alpha$ -HIF1 $\beta$  se asocia con su co-activador transcripcional p300/CBP para favorecer su unión a los sitios ERH localizados en la región 5'promotora de sus genes blancos (glucolíticos, angiogénicos, inflamatorios, eritropoyéticos, etc) [Semenza, 2009; Marín Hernández *et al.*, 2009] y así iniciar la cascada transcripcional.

HIF-1 $\alpha$  regula la expresión de la gran mayoría de los genes glucolíticos, (Fig. 3) permitiendo de esta manera que los tumores adquieran una glucólisis elevada (2-17 veces vs tejido no tumoral [Moreno-Sánchez *et al.*, 2007], aún en la presencia de condiciones normales de oxígeno.

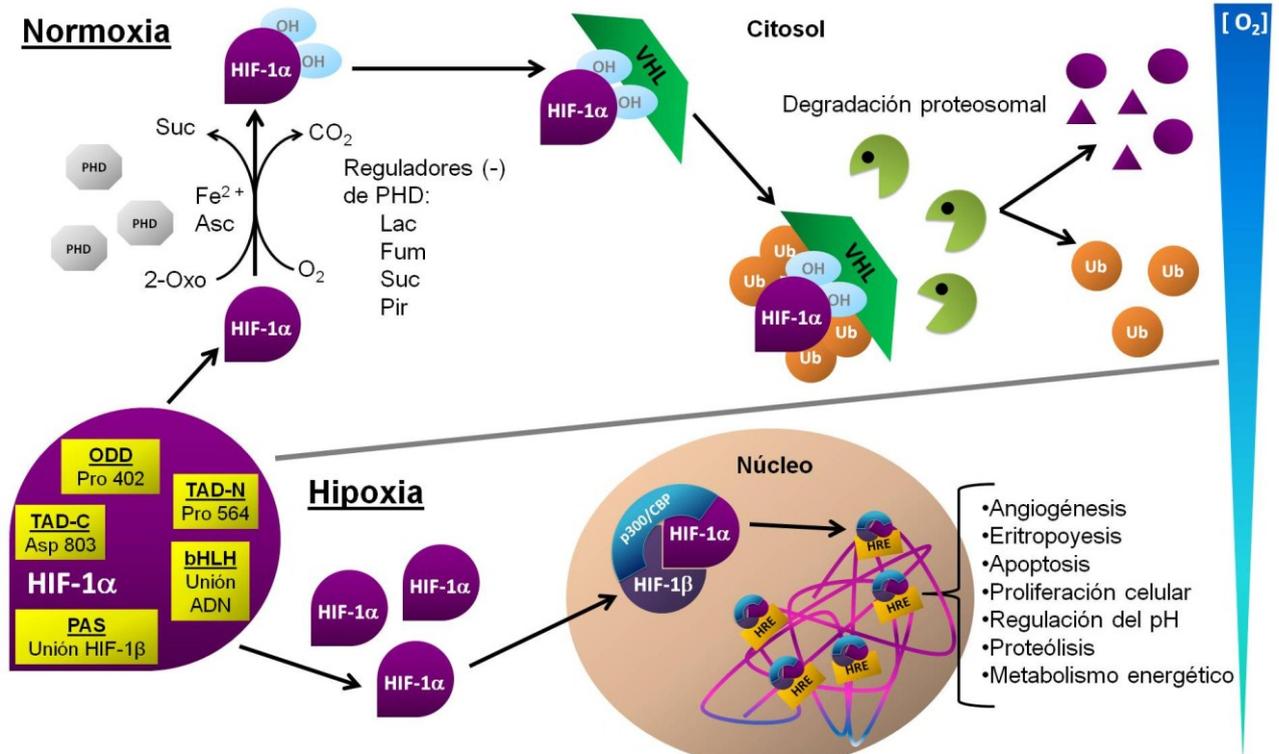


Figura 2. Regulación de HIF-1 $\alpha$  en condiciones normoxicas e hipoxicas. La degradación de HIF-1 $\alpha$  es mediada por las proil hidroxilasas, las cuales hidroxilan sitios específicos en la proteína HIF-1 $\alpha$ , permitiendo su asociación con otras proteínas como VHL y su degradación por el protesoma. Al disminuir la concentración de oxigeno se estabiliza HIF-1 $\alpha$ , se transloca al núcleo e interacciona con HIF-1 $\beta$  y el cofactor p300/CBP. El complejo HIF-p300/CBP se une al DNA en secuencias específicas y actúa como factor transcripcional de diferentes respuestas celulares. Abreviaturas: 2-oxo= 2-oxoglutarato; Suc= succinato; Lac= lactato; Fum= fumarato; Pir= piruvato; Asc= ascorbato, (-)= inhibición; Fe<sup>2+</sup>= Hierro.

## **5. Metabolismo glucolítico en cáncer y su relación con el factor inducido por hipoxia (HIF-1 $\alpha$ ).**

Una de las alteraciones del metabolismo energético mejor caracterizada en el tumor es el aumento en la glucólisis aún en ambientes altamente oxigenados [Revisado en Moreno-Sánchez *et al.*, 2007; 2009]. Se ha reportado que la mayoría de los tumores mantienen alta su glucólisis (de 2 a 17 veces) comparada con los tejidos de origen [Pedersen, 1999; Moreno-Sánchez *et al.*, 2007] la cual provee de metabolitos esenciales para la proliferación (nucleótidos, aminoácidos, coenzimas y esqueletos de carbono) [Hannahan y Weinberg, 2011]. Además, esta estrategia metabólica está relacionada con el desarrollo de fenotipos invasivos en vejiga, mama, cervix y ovario [Semenza 2008].

En células cancerosas, HIF-1 $\alpha$  aumenta la cantidad de todas las proteínas de la vía glucolítica [revisado en Marín-Hernández *et al.*, 2011]. Por lo anterior se ha sugerido una correlación entre el aumento de HIF-1 $\alpha$ , el aumento en el contenido y actividad de varias enzimas y transportadores, y el incremento en el flujo glucolítico [Marín-Hernández *et al.*, 2009]. Algunas de estas características se han evaluado en tumores proliferativos metastásicos (mama, páncreas e hígado) [revisado en Marín-Hernández *et al.*, 2011]. Sin embargo su aplicación clínica como biomarcadores potenciales aún no ha sido evaluada de manera sistemática.

### 5.1 Enzimas glucolíticas reguladas por HIF-1 $\alpha$ .

La estabilización de HIF-1 $\alpha$  favorece el incremento de isoformas particulares para cada enzima en la vía glucolítica [Marín-Hernández *et al.*, 2009] (Fig. 3).

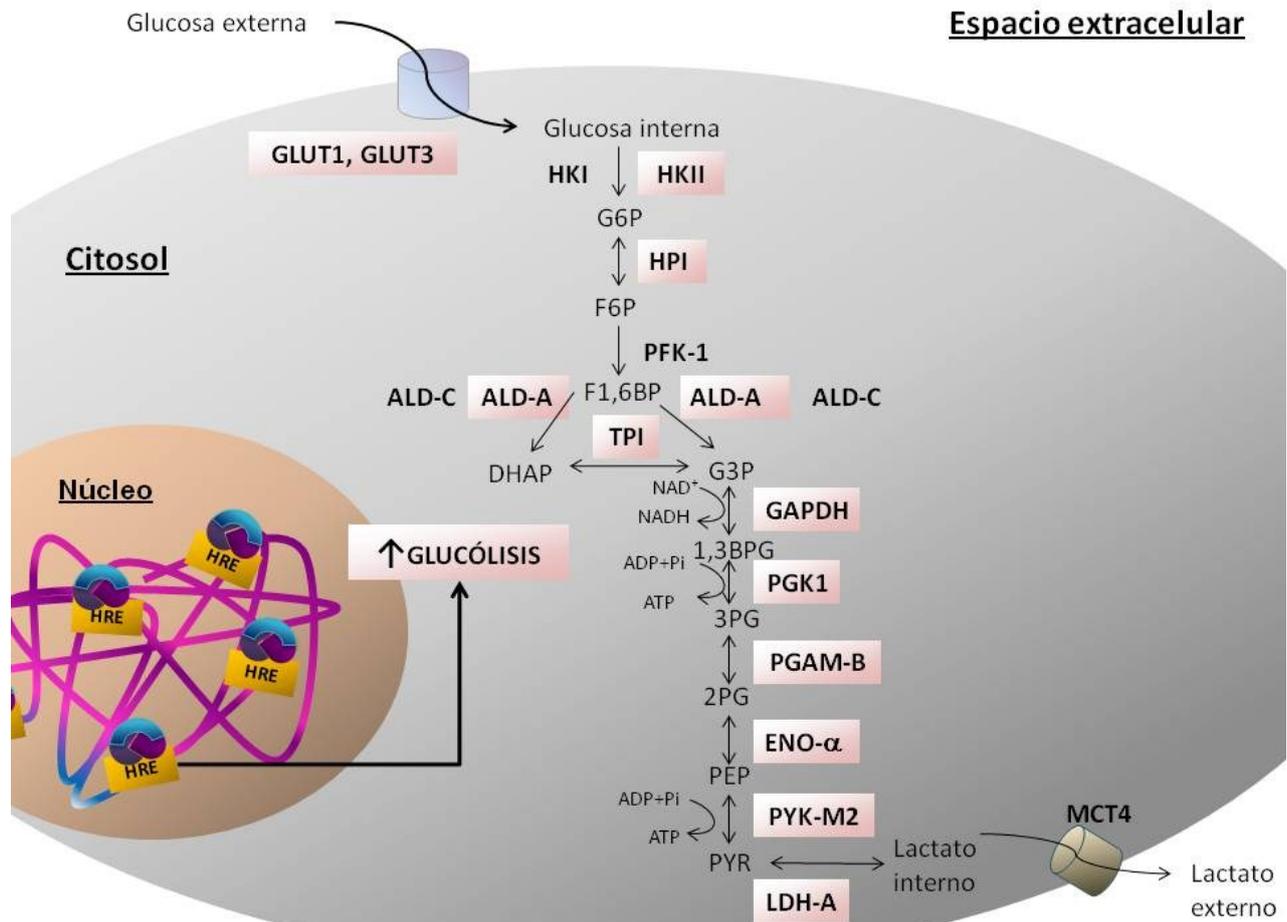


Figura 3. En diversos tipos de cáncer, como el de mama, la estabilización de HIF-1 $\alpha$  conlleva a la sobre-expresión de la mayoría de los transportadores y enzimas de la vía glucolítica (enzimas resaltadas en cuadros) [Modificado de Marín-Hernández *et al.*, 2009].

**Transportadores de glucosa (GLUTs).** En células tumorales GLUT-1 es el transportador de glucosa con mayor sobre-expresión, particularmente en tumores altamente proliferativos y malignos como es el cáncer de mama [Macheda *et al.*, 2005]; por su parte GLUT-3 se encuentra sobre-expresado en tumores de pulmón, colon, ovario, laringe y glándulas mamarias por lo que ambos GLUTs se ha considerado indicadores de mala prognosis [Macheda *et al.*, 2005]. La isoforma GLUT-3 es la que presenta mayor afinidad por glucosa ( $K_m=1.8-10\mu M$ , [revisado en Marín-Hernández *et al.*, 2011]) y se sobre-expresa en condiciones hipóxicas e hipoglucémicas, [Burant y Bell

1992]. Además, los GLUTs son las proteínas glucolíticas que controlan substancialmente (arriba del 60%) la vía glucolítica en tumores de rápido crecimiento (hígado y cérvix) [Marín Hernández *et al.*, 2010]. Aun que no se ha explorado si los GLUTs también controlan el flujo glucolítico en condiciones hipoxicas, se ha observado que la disminución en [O<sub>2</sub>] induce la sobre-expresión de algunas isoformas (GLUT-1) en tumores mamarios y colorectales [Brown *et al.*, 2002; Burt *et al.*, 2001; Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2010].

*Hexocinasas (HKs)*. La HK presenta cuatro isoformas (I-IV). La isoforma -III es la que muestra mayor afinidad por glucosa (0.003mM) seguida de las isoformas-I (0.03 mM) y -II (0.3 mM) [revisado en Marín-Hernández *et al.*, 2009]. Las isoformas -I y -II son sobre-expresadas por HIF-1 $\alpha$  [Rankin y Giaccia, 2008] y son capaces de integrarse en la membrana externa mitocondrial [Wilson, 2003] lo cual favorece la inhibición de la apoptosis y asegura el uso del ATP mitocondrial para la fosforilación de hexosas y generación de ATP glucolítico [Marín-Hernández *et al.*, 2011]. Además, la sobre-expresión de las HKs junto con los GLUTs, ejercen el control principal (71%) sobre la vía glucolítica en células tumorales [Marín-Hernández *et al.*, 2011].

*Lactato deshidrogenasas (LDHs)*. La LDH es una enzima que cuenta con dos isoformas principales: LDH-A es abundante en musculo esquelético y LDH-B está presente en corazón [Marín-Hernández *et al.*, 2009]. HIF-1 $\alpha$  regula la expresión de LDH-A, y su sobre-expresión se correlaciona con formas agresivas de tumores (cáncercolonrectal) [Koukourakis, 2005]. La disminución de la LDH-A propicia una restricción en el crecimiento tumoral y una menor adaptación ante la hipoxia [Fantin, 2006]. Asimismo un aumento en la producción y expulsión de lactato favorece la acidificación del medio extracelular para que el tumor continúe en crecimiento y expansión [Semenza, 2008].

Debido al control que ejercen particularmente los GLUTs y las HKs en la vía glucolítica de células tumorales y el hecho de que se sobre-expresen en todos los tipos de cáncer evaluados hasta el momento [Moreno-Sánchez *et al.*, 2007] resulta necesario evaluar a estas proteínas como potenciales biomarcadores o blancos terapéuticos en tumores hipóxicos y altamente glucolíticos [Marín-Hernández *et al.*, 2011; Fantin, 2006] junto con HIF-1 $\alpha$ .

## 5.2 Metabolismo mitocondrial relacionado con HIF-1 $\alpha$ .

El metabolismo mitocondrial es un proceso activo en cáncer, y en algunos tumores es el principal aporte de ATP [Zu y Guppy, 2004], contradiciendo la hipótesis de Warburg [Zu y Guppy, 2004; Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2010; Moreno-Sánchez *et al.*, 2007]. En este sentido es importante analizar el comportamiento mitocondrial. Una de las vías metabólicas mitocondriales, la fosforilación oxidativa (FO), es regulada en gran medida por la disponibilidad de oxígeno [Papandreou, 2006], por lo que la hipoxia es una condición que regula a la FO [Fukuda *et al.*, 2007; Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2010]. Aun así durante la hipoxia la baja concentración de oxígeno (3-14  $\mu\text{M}$ ) no es una limitante para la FO debido a que la  $K_m$  de la citocromo oxidasa (COX) por el  $\text{O}_2$  es de  $1\mu\text{M}$  [Moreno-Sánchez *et al.*, 2007]; en consecuencia la hipoxia representa una concentración saturante de oxígeno para la FO [Moreno-Sánchez *et al.*, 2007]. Por otra parte, la hipoxia parece jugar un rol crucial en el manejo del consumo de  $\text{O}_2$  para mantener el balance del ATP y la producción de ROS [Semenza, 2010]. A pesar de eso, el papel de la hipoxia y de HIF-1 $\alpha$  sobre el metabolismo mitocondrial se ha explorado en menor proporción en comparación con el metabolismo glucolítico. Se han analizado proteínas cuya regulación por HIF-1 $\alpha$  está documentada como la piruvato deshidrogenasa cinasa (PDK), que bloquea la actividad del complejo piruvato deshidrogenasa (PDH) [Kim *et al.*, 2006] y la isoforma 2 de la COX-IV [Fukuda *et al.*, 2007). Por otro lado se ha observado que las HPs, encargadas de hidroxilar a HIF-1 $\alpha$ , requieren  $\alpha$ -cetoglutarato como sustrato y son reguladas por otros sustratos mitocondriales (succinato, fumarato y oxoglutarato) [Marín-Hernández *et al.*, 2009]. Por lo tanto, resulta de interés evaluar si algunas enzimas mitocondriales importantes en el metabolismo del tumor (*i.e.*, glutaminasa, 2-oxoglutarato deshidrogenasa, citocromo c oxidasa) se sobre-expresan en tumores de manera que puedan ser empleados como biomarcadores.

*Citocromo oxidasa (COX)*. Es la última enzima de la cadena de transporte de electrones, y su función es recibir un electrón de cada una de las cuatro moléculas de citocromo c para transferirlos a una molécula de oxígeno, reduciéndola a dos moléculas de agua [Lehninger *et al.*, 2008]. Acoplado a este proceso, se produce una translocación de protones a través de la membrana, lo cual genera un gradiente electroquímico que la enzima ATP sintasa emplea para sintetizar ATP [Lehninger *et al.*, 2008]. Se ha observado que HIF-1 $\alpha$  disminuye indirectamente la expresión de la isoforma COX-IV-1,

mediante la proteasa mitocondrial LON, e incrementa la expresión de COX-IV-2 [Fukuda *et al.*, 2007].

*ATP-Sintasa (ATP-asa)*. Es la enzima responsable de catalizar la fosforilación del ADP en el último paso de la FO donde la síntesis de ATP se lleva a cabo hacia el lado interno de la mitocondria [Solaini *et al.*, 2010]. Se ha observado una regulación negativa en la expresión de esta proteína en tumores de hígado, riñón, pulmón, mama, estómago y colorectales, [Cuezva *et al.*, 2002; Isidoro *et al.*, 2004; Cuezva *et al.*, 2004].

*Traslocasa de Adenín Nucleótidos (ANT)*. Es una proteína que cataliza los procesos energéticos de la exportación de ATP desde la matriz mitocondrial al espacio intermembranal y la importación de ADP desde el espacio intermembranal hacia la matriz [Brenner *et al.*, 2010]. Se encuentra sobre-expresada en diversos tipos de cáncer (mama, colon, cervix e hígado) [Brenner *et al.*, 2010] por lo que puede ser relevante para estudiar las modificaciones metabólicas mitocondriales en células tumorales [Brenner *et al.*, 2010].

*Glutaminasa (GA)*. La función de la GA es la de sintetizar glutamato a partir de l-glutamina [Matés *et al.*, 2009]. Se ha observado que la mayoría de los tumores (hígado, mama y cervix [revisado en Matés *et al.*, 2009]) consumen glutamina por lo que la GA se encuentra sobre-expresada en estos [Matés *et al.*, 2009; Erickson and Cerione, 2010]. Por otra parte se ha identificado una sobre-expresión de la isoforma L en células tumorales de hígado, cerebro, páncreas y mama mientras que la isoforma K se ha observado en células tumorales de corazón, páncreas, riñones, pulmón y mama [Szeliga and Obara-Michlewska, 2009].

*$\alpha$ -cetoglutarado deshidrogenasa (2OGDH)*. Es un complejo multienzimático que emplea varios cofactores para convertir  $\alpha$ -cetoglutarato a succinil-CoA, CO<sub>2</sub> y NADH [McLain *et al.*, 2011]. Debido a que la 2OGDH representa un paso limitante en la producción de NADH, lo que limita el transporte de electrones y la síntesis de ATP, su inhibición puede propiciar una disminución en la FO [McLain *et al.*, 2011]. En cáncer de mama se ha observado un decremento de la actividad de 2OGDH durante una hipoxia prolongada correlacionando con una disminución en su expresión protéica [Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2010].

## 6. HIF-1 $\alpha$ y el metabolismo energético en biopsias de cáncer de mama.

Pocos estudios se han realizado analizando los niveles de HIF-1 $\alpha$  en biopsias de cáncer de mama. Bos y colaboradores (2001) demostraron que el carcinoma mamario muestra altos niveles de HIF-1 $\alpha$  (4 a 14 veces) comparado con el tejido mamario normal donde está ausente [Bos *et al.*, 2001]. En otros estudios se estableció que la alta expresión de HIF-1 $\alpha$  correlacionó con la malignidad tumoral, metástasis y bajo pronóstico de supervivencia en pacientes con cáncer de mama [Patiar, 2006]. De forma general, los niveles de HIF-1 $\alpha$  a nivel proteómico se han descrito como factor pronóstico en el cáncer de mama tanto en pacientes con ganglios positivos como con ganglios negativos [Patiar, 2006]. Sin embargo, ningún estudio analiza el contenido proteico de HIF-1 $\alpha$  junto con la expresión y actividad de proteínas glucolíticas y tampoco se tiene en consideración el metabolismo mitocondrial como biomarcadores potenciales.

Debido a que está ampliamente documentado que la alta velocidad glucolítica en todos los tumores de rápido crecimiento estudiados, es el resultado de la estabilización de HIF-1 $\alpha$  y que este fenotipo está asociado con la tumorigénesis [Lee *et al.*, 2006], resulta conveniente proponer estas características como “biomarcadores” específicos de desarrollo tumoral. En este sentido se ha determinado en algunas biopsias de diferentes carcinomas humanos que GLUT-1 se sobre-expresa de forma significativa [Rudlowski *et al.*, 2004; Goldman *et al.*, 2006; Mori *et al.*, 2007]. De igual forma se han evaluado en biopsias humanas de cáncer mamario, pulmonar y rectal la sobre-expresión de LDH y de HKII correlacionándolas con un aumento en su actividad [Shonk *et al.*, 1965; Bailinski *et al.*, 1983; Bailinski *et al.*, 1984]. Sin embargo, HIF-1 $\alpha$  no se evaluó para establecer una correlación entre ambos. Por otro lado, el análisis en algunos tipos de cáncer se ha limitado a evaluar individualmente los niveles de expresión de HIF-1 $\alpha$  o de alguna enzima del metabolismo glucolítico como GLUT-1 [Lee *et al.*, 2008] y en pocos casos la combinación de HIF-1 $\alpha$  + GLUT-1 [Lee *et al.*, 2008; Chung *et al.*, 2009]. El resto de las enzimas no han sido consideradas, ni han sido evaluados los cambios en la actividad enzimática. Adicionalmente, no se han buscado biomarcadores mitocondriales en cáncer de mama.

Con base en lo anterior resulta novedoso establecer si existe una mayor expresión de HIF-1 $\alpha$  y de algunas proteínas glucolíticas o mitocondriales, en cáncer mamario. En el caso de lograr establecer con claridad una relación positiva entre el nivel de sobre-expresión de HIF-1 $\alpha$ , junto con enzimas y transportadores glucolíticos o

mitocondriales, en un tumor (en comparación con tejido no tumoral) estas proteínas podrían ser potenciales biomarcadores de cáncer.

## **Justificación**

Los biomarcadores actuales en cáncer de mama (Her-2, ER, PR, Ki-67) presentan numerosos falsos positivos que disminuyen su confiabilidad. Siendo el cáncer de mama una de las principales causas de muerte en mujeres en nuestro país, la búsqueda de proteínas alteradas (biomarcadores) en vías metabólicas que favorecen el desarrollo del tumor sólido permitirá la implementación de estrategias para mejorar su detección. Los datos obtenidos de estos estudios en conjunto con los biomarcadores canónicos permitirán establecer una firma fenotípica específica del cáncer de mama en México para su mejor detección y posterior tratamiento.

## **Hipótesis**

El contraste en los niveles de expresión de genes glucolíticos, mediado por la estabilización de HIF1-a, en tumores mamarios y tejido mamario sano servirá junto con otros biomarcadores canónicos para proponer posibles alternativas en la detección del cáncer de mama.

## **Objetivos**

### **Objetivo Principal**

Determinar en un estudio prospectivo el nivel de expresión de HIF-1 $\alpha$  y de proteínas glucolíticas blanco, así como algunos biomarcadores canónicos, para establecer un perfil de expresión en biopsias frescas de cáncer de mama.

### **Objetivos particulares**

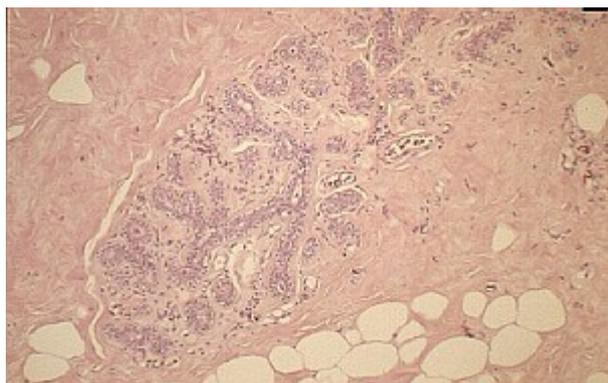
- 1) Determinar por análisis proteómico el nivel de expresión de HIF-1 $\alpha$  y de enzimas del metabolismo energético:
  - I. Transportador de glucosa tipo 1 (GLUT-1),  
Hexocinasa isoforma I y II (HKI, HKII)  
Lactato deshidrogenasa isoforma A (LDH-A)
  - II. Citocromo oxidasa subunidad cuatro (COX-IV)  
ATP-asa subunidad F1  
Transportador de adenín nucleótidos (ANT)  
 $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa (2-OGDH)  
Glutaminasa (GA)
- 2) Determinar la actividad de HK y LDH.
- 3) Determinar por análisis proteómico el nivel de expresión de biomarcadores canónicos.
  - I. Her-2, Ki67, H-Ras, C-Myc
- 4) Determinar los objetivos 1-3 en muestras no tumorales.

## **Materiales y métodos**

### *Obtención de las muestras.*

Una colaboración con el Instituto Nacional de Cancerología (INCAN) permitió la obtención de muestras frescas de pacientes con sospecha de cáncer de mama que acudieron a la Institución por primera vez y que cumplieron con los siguientes criterios de inclusión: ser mujeres mayores de 18 años, presentar mediante confirmación histológica cáncer de mama y haber aceptado participar en el estudio (al firmar la carta de consentimiento informado ofrecida por el INCAN). Para las muestras no tumorales se emplearon muestras almacenadas en el Banco de Tumores del mismo instituto, las cuales el análisis histológico (Fig. 4) determinó que no se trataban de muestras tumorales y los pacientes no desarrollaron cáncer (Fig. 4).

**A**



**B**

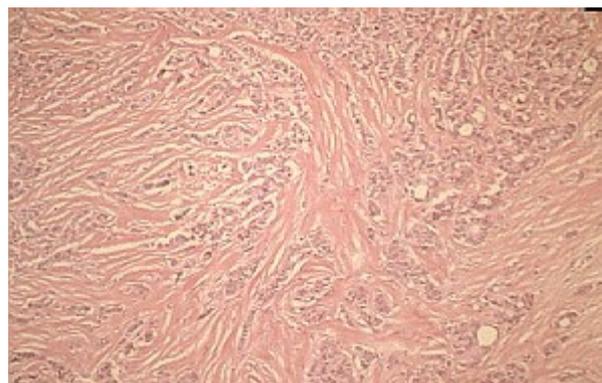


Figura 4. Diferencias histológicas entre tejido mamario sano y de tumor (la escala se encuentra en la parte superior derecha de la imagen). **A.** Tejido mamario sano (tinción con hematoxilina-eosina ampliación 100x) **B.** Carcinoma ductal infiltrante, la neoplasia más frecuente en mama (tinción con hematoxilina-eosina ampliación 100x) [Muniesa, 2011].

La obtención de las muestras se realizó utilizando protocolos previamente aceptados en el INCAN, basados en las normas del tratado de Helsinki para el manejo de muestras y el consentimiento informado del paciente. El protocolo incluyó la recolección de la muestra por un oncólogo utilizando una aguja de corte (tru-cut). Por cada muestra se obtuvieron de 3 a 5 fragmentos tisulares en forma de cilindros con dimensiones aproximadas entre 1.5-3 cm de longitud por 2 mm de diámetro, las cuales fueron almacenadas y canalizadas a tres sitios: 1) Departamento de Patología (INCAN), donde se realizó un análisis histopatológico; 2) Banco de Tumores (INCAN) donde la

muestra se sometió a un sistema de disminución de temperatura por gradientes para su almacenamiento y 3) depósito en N<sub>2</sub> líquido para su posterior análisis proteómico y cinetómico en el Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” (INC) para el estudio prospectivo en la búsqueda de biomarcadores metabólicos.

*Obtención de extractos para análisis proteico y medición de actividades de enzimas glucolíticas por el método de homogenización de tejidos*

Las biopsias obtenidas fueron de 0.1-0.15 mg de peso húmedo total. Las biopsias se picaron finamente con un bisturí en 100 µl de amortiguador de Tris (Tris-HCl 25mM pH 7.6 con DTT 5mM, EDTA 1mM y PMSF 1mM). Posteriormente se homogenizaron en un tubo de vidrio con un vástago de teflón y se añadieron 400 µl extra de amortiguador. Las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm por 30 minutos. Se recuperó el sobrenadante, se determinó proteína por el método de Lowry y se almacenó a -70°C hasta su uso.

Para el análisis de proteínas por western blot se emplearon 0.05 mg de proteína.

Para las reacciones enzimáticas se empleó 0.1 ml de muestra.

*Análisis de proteínas mediante el método de western blot (WB).*

Se cargaron 50 µg de proteína en un gel de SDS-PAGE al 12.5% de poliacrilamida y se electrotransfieron a membranas de PVDF (BioRad; Hercules, CA, USA).

El ensayo de western blot se realizó incubando las membranas con anticuerpos monoclonales (dilución 1:1000) contra humano para las siguientes proteínas de interés:  $\alpha$ -tubulina, HIF-1 $\alpha$ , LDH-A, ATP-asa, ANT H-Ras, Her-2 y C-Myc (empleando el isotipo IgG de ratón como anticuerpo secundario); GLUT-1, HKI, HKII, 2-OGDH, Ki67 (empleando el isotipo IgG de cabra como anticuerpo secundario); y COX-IV (empleando el isotipo IgG de conejo como anticuerpo secundario), todos de la marca Santa Cruz; CA, USA.

Las bandas de hibridación se revelaron con la incubación de los anticuerpos secundarios correspondientes conjugados con peroxidasa de rábano (*horseradish peroxidase*, Santa Cruz; CA, USA) y se detectó la señal de la proteína con el sistema de detección ECL-plus (Amersham; Buckinghamshire, UK) de acuerdo con procedimientos previamente estandarizados [Gallardo-Pérez *et al.*, 2009].

El análisis densitométrico se realizó con el software Scion Image (Scion Corp.; Frederic, MD, USA) y se normalizó contra el control de carga ( $\alpha$ - tubulina). El valor en

pixeles se interpretó como porcentaje de expresión o porcentaje de intensidad de la banda con respecto a un control de carga (en este caso  $\alpha$ -tubulina: una proteína celular constitutiva), a la cual se le asignó siempre el valor de 100%.

- *Determinación de actividades de hexocinasa (HK) y lactato deshidrogenasa (LDH).*

Las mediciones se realizaron a 37°C y a pH 7.4 para simular las condiciones fisiológicas en el citosol.

La actividad de la HK se determinó espectrofotométricamente a 340 nm midiendo la formación de NADPH en una reacción acoplada a la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH). El medio de reacción fue MOPS 50 mM, pH 7.4; 1 U de G6PDH, NADP 0.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 15 mM, ATP 10 mM, 0.02-0.05 mg de proteína. La formación de NADPH se disparó añadiendo glucosa 3 mM [Marín-Hernández *et al.*, 2006].

La actividad de la LDH se determinó midiendo la formación de NAD en un medio MOPS 50 mM, pH 7.4 en presencia de NADH 0.15 mM y 0.001-0.015 mg proteína. La reacción se inició con la adición de piruvato 1 mM [Marín-Hernández *et al.*, 2006].

- *Análisis estadístico*

A partir de los resultados obtenidos se calcularon la media y el error estándar. La significancia ( $p < 0.05$ ) se determinó por un análisis de *t de student* empleando el programa Microsoft Excel versión 2007.

## **Resultados**

Se analizaron un total de 23 muestras de biopsias tumorales, una muestra correspondiente a un tumor filoides benigno y 5 muestras no tumorales de mama. La edad de las pacientes fue de los 35 a los 75 años con un promedio de 50 años. La mayoría de las muestras correspondieron a tumores canaliculares infiltrantes con estadio tumoral III (Tabla 3). La mayoría de estas muestras presentan un alto grado de desdiferenciación (medido con la escala Scarf Bloom Richardson (SBR) donde 1 es poco desdiferenciado y 9 es altamente desdiferenciado [Le Doussal, 1989]) (Tabla 3). La expresión de los biomarcadores tradicionales (la siglas RH indican positividad a RE y RP; mientras que la sigla HER indica positividad a Her-2) es diferente a pesar del estadio tumoral y la histología de la muestra.

## Resultados

Tabla 3. Tabla comparativa de la histología y la expresión de biomarcadores canónicos en las muestras tumorales analizadas.

No	Ed	Diagnóstico clínico	Histología	SBR	RH	Her	Ki67
1	44	Ca izq T2, N2a IIIA	Ca lobulillar pleom dif sarcomatoide	6	-	-	30
2	43	Ca der T3, N1 IIIA	Canalicular infiltrante	9	-	-	30
3	53	Ca der T4b, N2a IIIB	Canalicular infiltrante	8	-	+	20
4	62	Ca der T3, N1 IIIA	Ca ductal in situ alto grado		+	+	0
5	35	Ca izq T4B, N1 IIIB	Canalicular infiltrante	5	+	-	20
6	38	Ca der T4b, N2a IIIB	Canalicular infiltrante	8	-	-	40
7	74	Ca der T4b, N2a IIIB	Canalicular inf + infil a dermis	7	+	-	10
8	43	Ca izq T2, N0 IIA	CDIS y foco sug de invasión		+	-	10
9	40	Ca der T4b, N1 IIIB	Canalicular infil + PLV + inf a dermis	5	+	+	20
10	58	Ca der T2, N1 IIB	Canalicular inf c/ dif sarcomatoide	9	-	-	80
11	65	Ca izq T4B, N1 IIIB	Canalicular infil + infil a dermis	6	+	-	20
12	52	Ca izq T3, N1 IIIA	Canalicular infiltrante	8	-	-	40
13	44	Ca der T3, N1 IIIA	Lobulillar infiltrante	3	+	+	10
14	44	Ca izq T4B, N2A IIIB	Canalicular infiltrante	9	-	-	30
15	39	Ca der T4C, N3C,	Canalicular infiltrante	6	+	+	40
16	50	Ca der T1c, N1, EC IIA	Canalicular infiltrante	7	+	+	30
17	37	Ca der T2, N1, MX IIB	Canalicular inf + lobulillar inf + CDIS	5	+	-	15
18	34	Ca der T4D, N2A IIIB	Canalicular inf	NV	.	+	30
19	49	Ca izq T4B, N3C, M1	Canalicular infiltrante	7	+	+	15
20	40	Ca izq T4C, N3C, M1	Lobulillar inf + infil a dermis	4	-	+	30
21	75	Ca izq T3N1MX IIIA	Canalicular if + in situ alto grado	4	+	-	10
22	47	Ca izq T4B, N1, MX IIIB	Canalicular inf + inf tejido cel subcut	6	+	-	10
23	37	Ca izq T2, N1, MX IB	Canalicular infiltrante	6	+	-	30

Abreviaturas: No= Número de muestra; Ed= edad de la paciente donde se obtuvo la muestra; SBR= Escala Scarf Bloom Richardson; RH= Receptores Hormonales; HER= Her-2 Ca der= Cáncer seno derecho; Ca izq= Cáncer seno izquierdo; T= clasificación del tamaño del tumor (la escala va del 1 al 4); N= dispersión a nódulos linfáticos (escala 1 al 3); MX=metástasis; I,II,IIIA y IIIB = estadios tumorales; Ca= canalicular;pleom=pleomiforme; dif=diferencial; inf=infiltrado; CDIS= cáncer ductal in situ; c/= con; cel= celular; subcut=subcutáneo. “+” indica la positividad a los RH y a HER mientras que “-” indica expresión escasa o nula de éstos biomarcadores. La expresión de Ki-67 está dada en porcentaje. Datos aportados por el Banco de Tumores del INCAN.

Mediante la técnica de homogenización de tejidos descrita anteriormente se obtuvieron extractos con los que se evaluaron la expresión proteica de HIF-1 $\alpha$  y de proteínas involucradas en el metabolismo energético (GLUT-1, HKI, HKII, LDH-A y mitocondriales COX-IV, subunidad F1 de la ATP-asa, ANT, 2-OGDH, GA), así como biomarcadores canónicos (Her-2, Ki67, H-Ras, C-Myc). En paralelo se midió la actividad enzimática de HK y LDH mediante procedimientos establecidos en nuestro laboratorio [Marín-Hernández *et al.*, 2006].

A partir de los datos obtenidos se comparó la relación en el incremento de la expresión de HIF-1 $\alpha$  con el incremento de las proteínas analizadas y la actividad metabólica de HKII y LDH-A en muestras tumorales y muestras no tumorales.

### **Expresión proteica de HIF-1 $\alpha$ y enzimas glucolíticas.**

Los niveles de proteínas en este estudio se analizaron por inmunoensayos (western blot). Para ello se emplearon anticuerpos específicos anti-HIF-1 $\alpha$ , -GLUT-1, -HKI, -HKII y -LDH-A. Estas enzimas se analizaron debido a su regulación positiva por HIF-1 $\alpha$ , además de que GLUT-1, HKI y HKII son enzimas que ejercen un mayor controlen la vía glucolítica (en conjunto cerca del 60% [Marín-Hernández *et al.* 2010]) mientras que LDH-A se encuentra sobre-expresada en la mayoría de los tumores [Marín-Hernández *et al.* 2010].

Para comparar la expresión de las muestras tumorales contra el tejido no tumoral se empleó una doble normalización. La primera normalización permitió asignar un porcentaje de expresión a una proteína de interés (de una muestra) estableciendo una relación de proporcionalidad con su control de carga, (asignándole al control de carga un valor del 100%). La segunda normalización se realizó estableciendo una relación de proporcionalidad del porcentaje de expresión de las muestras tumorales contra el porcentaje de expresión de las muestras no tumorales; considerando a éstas como el 100%

En la figura 5 se observa un bandaje representativo del patrón de expresión de las muestras. Bajo las mismas condiciones de revelado, tiempo y sustrato quimioluminiscente las muestras tumorales mostraron una mayor intensidad para las bandas de HIF-1 $\alpha$  (4,300%), HKI (160%) y LDH-A (400%), por otra parte las muestras

tumorales presentaron en promedio un incremento del 15% de GLUT-1. La expresión de HKII únicamente se observó en tejido tumoral (97% de expresión respecto a  $\alpha$ -tubulina).

La alta expresión de HIF-1 $\alpha$  y la expresión de GLUT-1 en las biopsias se mantuvo presente en 21 de 23 muestras analizadas (91%), HKII mantuvo un patrón de expresión elevado en 20 de 23 muestras (87%), por último LDH se encontró expresada en las 23 muestras (100%). HKI se analizó tan solo en 17 muestras debido a la poca cantidad de proteína en algunas muestras. El patrón de expresión en ésta proteína se presentó en 9 de las 17 muestras analizadas (53%). Las muestras no tumorales mantuvieron una expresión semejante en las 5 muestras analizadas, salvo la LDH-A en donde una muestra presenta una expresión mayor (88% respecto a  $\alpha$ -tubulina) (dato no mostrado). En estas muestras, el contenido de HKI y HKII fue indetectable; en la sección de discusión se aborda la posible explicación molecular.

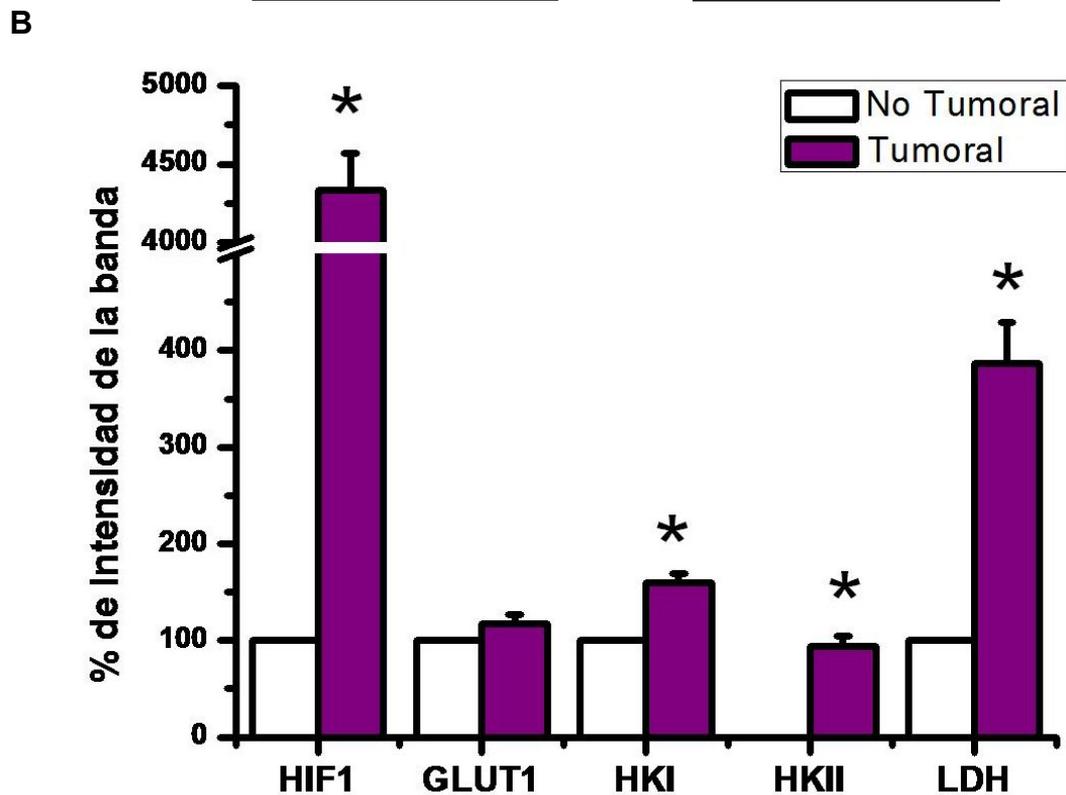
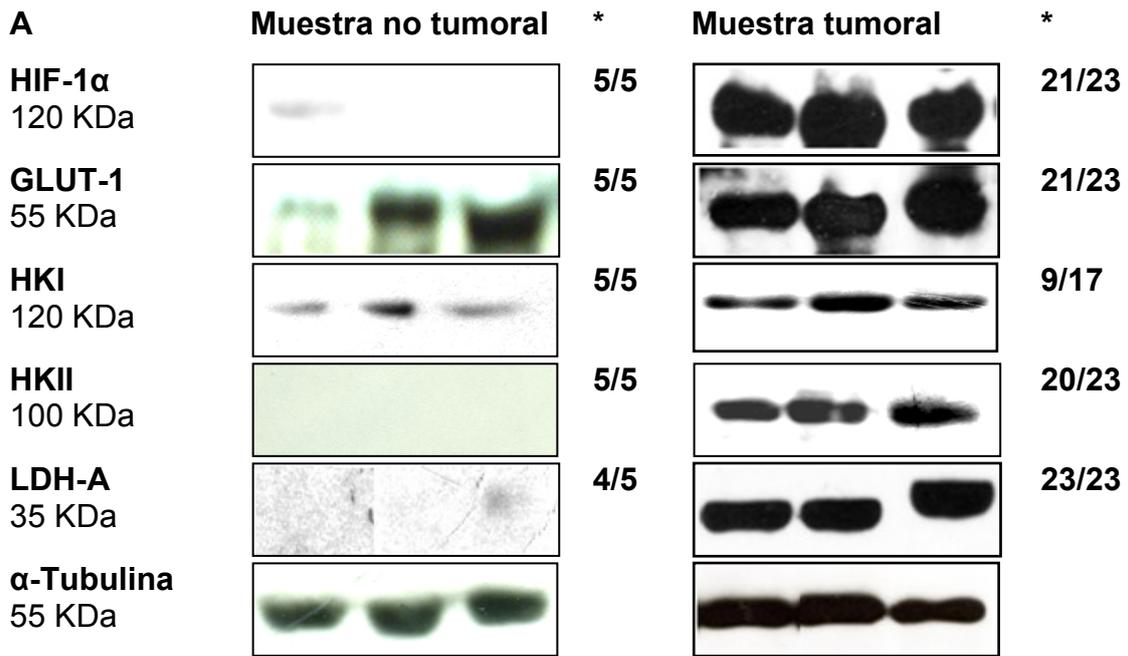


Figura 5. Western blot de HIF1- $\alpha$  y proteínas glucolíticas en muestras de tejido mamario normal y tumoral.

**A.** Imagen representativa del ensayo donde \* simboliza el número de muestras que presentan el patrón vs. el total de muestras analizadas. **B.** Análisis densitométrico (representado en porcentaje) de las imágenes obtenidas (n=23 en muestras tumorales salvo en HKI donde n=17 y n=5 en muestras sanas). Se muestra el promedio de los resultados normalizados contra  $\alpha$ -tubulina y posteriormente contra el tejido mamario no tumoral (barras blancas) el cual representa el 100% vs. el incremento de la proteína tumoral (barras moradas). \*p<0.05

## Análisis de actividades de HK y LDH

*Actividad enzimática de HK.* La actividad de la HK se determinó espectrofotométricamente en todas las muestras analizadas.

La actividad enzimática de las muestras tumorales fue heterogénea, con una actividad promedio de  $22 \pm 5$  (error estándar) mU/mg de proteína. El promedio de las muestras no tumorales presentó una actividad de  $16 \pm 5$  mU/mg de proteína (Tabla 4). El análisis estadístico no indicó diferencia entre ambos grupos de muestras.

**Tabla 4.** Actividad de la HK en tejido tumoral y en tejido no tumoral

HK (mU/mg)	
Muestra tumoral	Muestra no tumoral
<b><math>22 \pm 5</math></b>	<b><math>16 \pm 5</math></b>
<b>(23)</b>	<b>(5)</b>

Se presenta el promedio  $\pm$  el error estándar.

Entre paréntesis se muestra el número de mediciones realizadas.

$p < 0.05$

Posteriormente se analizó la relación entre la actividad enzimática de la HK y el patrón de expresión proteica de la HKI y la HKII en muestra tumoral y en muestras no tumorales (datos nos mostrados). Bajo este análisis no se encontró correlación entre el contenido de proteína y la actividad en HKI ni HKII en muestras tumorales como no tumorales. El análisis estadístico no indicó diferencia entre ambos grupos de muestras.

*Actividad enzimática de LDH.* La actividad de la LDH se determinó espectrofotométricamente en todas las muestras analizadas.

La actividad enzimática de las muestras tumorales fue heterogénea (Tabla 5) sin embargo tres muestras presentaron una actividad arriba de 700 mU/mg de proteína mientras que las 20 muestras restantes presentaron una actividad menor a 600 mU/mg de proteína. La actividad promedio de la LDH fue de  $370 \pm 78$  mU/mg de proteína (Tabla 5). El promedio de las muestras no tumorales fue semejante con una actividad de  $474 \pm 196$  mU/mg de proteína (Tabla 5).

Tabla 5: Actividad de la LDH en mama tejido tumoral y en tejido no tumoral

LDH (mU/mg)	
Muestra tumoral	Muestra no tumoral
307 ±78	474 ± 196
(23)	(5)

Se presenta el promedio ± el error estándar.

Entre paréntesis se muestra el número de mediciones realizadas.

$p < 0.05$

Posteriormente se analizó la relación entre la actividad enzimática de la LDH y el patrón de expresión proteico de la LDH-A en muestra tumoral y en tejido sano (datos no mostrados). Bajo este análisis no se encontró correlación entre el contenido de proteína y la actividad en LDH-A en muestras tumorales ni en muestras no tumorales.

### Expresión proteica de enzimas mitocondriales.

Los niveles de proteína de este estudio se analizaron por inmunoensayos (western blot). Para ello se emplearon anticuerpos específicos anti-COX-IV, -ATP-asa, -ANT y 2ODGH. Este estudio se centró en analizar puntos estratégicos en el metabolismo mitocondrial, analizando componentes de la cadena transportadora de electrones (COX-IV, ATP-asa y ANT), del ciclo de Krebs (2ODGH) y del metabolismo de la glutamina (GA).

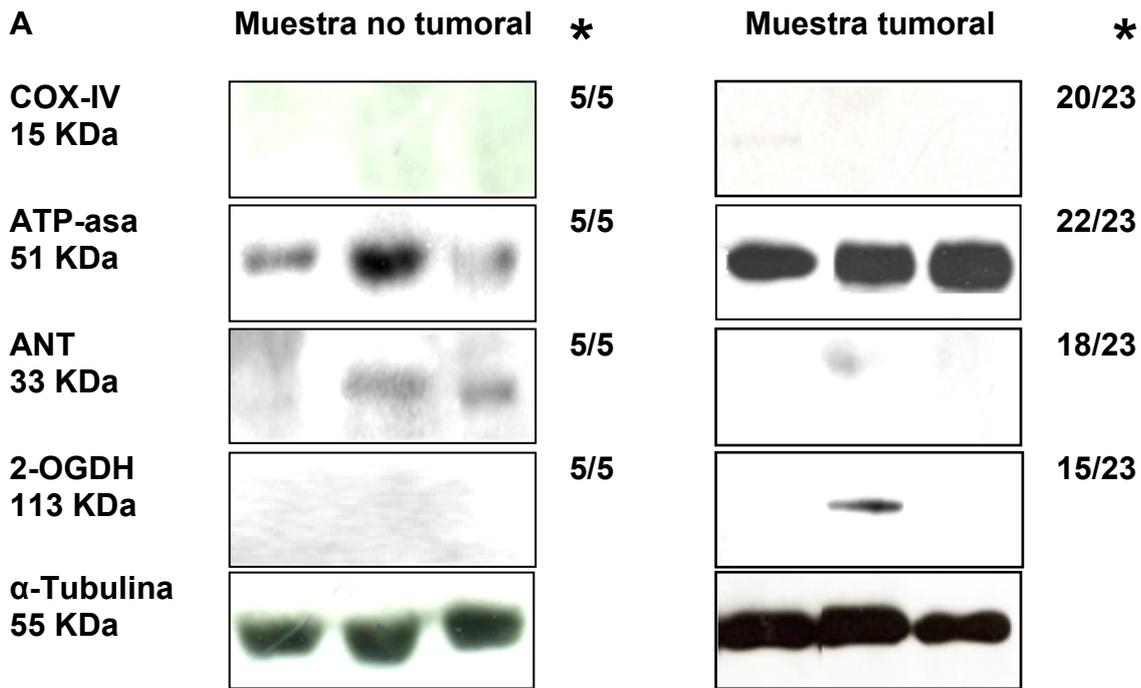
Para comparar la expresión de las muestras tumorales contra el tejido no tumoral se empleó una doble normalización. La primera normalización permitió asignar un porcentaje de expresión a una proteína de interés (de una muestra) estableciendo una relación de proporcionalidad con su control de carga, (asignándole al control de carga un valor del 100%). La segunda normalización se realizó estableciendo una relación de proporcionalidad del porcentaje de expresión de las muestras tumorales contra el porcentaje de expresión de las muestras no tumorales; considerando a éstas como el 100%

La figura 6 presenta un bandaje representativo del patrón de expresión de las muestras. Bajo las mismas condiciones de revelado, tiempo y sustrato quimioluminiscente las muestras tumorales mostraron mayor intensidad para la ATP-asa (incremento del 75%) y una menor intensidad de ANT (decremento del 90%) en

contraste con el tejido no tumoral. La expresión de COX-IV y 2OGDH fueron bajas en las biopsias (7% y 15% de expresión con respecto a  $\alpha$ -tubulina, respectivamente). Tanto la isoforma K como la L de la GA no mostraron expresión en ninguno de los dos conjuntos de muestras (datos no mostrados).

La expresión de ATP-asa en la muestra tumoral se mantuvo presente en 22 de 23 muestras analizadas (96% de las muestras), la baja expresión de COX-IV se mantuvo en 20 de 23 muestras (87%), al igual que ANT, la cual mostró una baja expresión en 18 de 23 muestras (78%). La expresión de 2OGDH se presentó en 15 de 23 muestras (65%) y GA siguió el mismo patrón en las 23 muestras (100%).

Tanto la expresión de la ATP-asa y del ANT, como la nula presencia de COX-IV, 2OGDH y GA (datos no mostrados) se presentaron en las 5 muestras de tejido sano analizadas (100%). El análisis densitométrico de COX-IV y 2OGDH se realizó únicamente comparando el promedio de la expresión de éstas proteínas contra  $\alpha$ -tubulina (Fig.6).



**B**

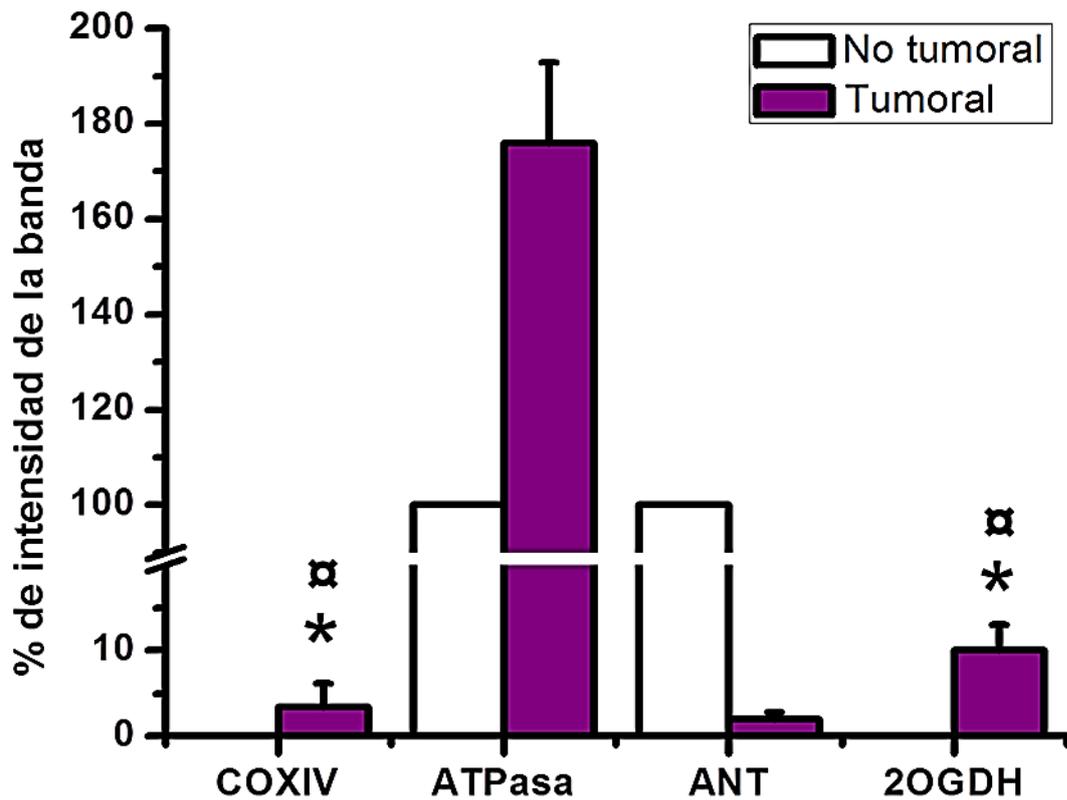


Figura 6: Western blot de proteínas involucradas en el metabolismo energético en muestras de tejido mamario normal y muestra tumoral. **A.** Imagen representativa del ensayo donde \* simboliza el número de muestras que presentan el patrón vs. el total de muestras analizadas. **B.** Análisis densitométrico (representado en porcentaje) de las imágenes obtenidas (n=23 en muestras tumorales). Se muestra el promedio de los resultados normalizados contra  $\alpha$ -tubulina y posteriormente contra el tejido mamario sano (barras moradas) el cual representa el 100% vs. el incremento de la proteína tumoral (barras negras). □ significa datos sin doble normalización. \* $p < 0.05$

### **Expresión proteica de biomarcadores canónicos.**

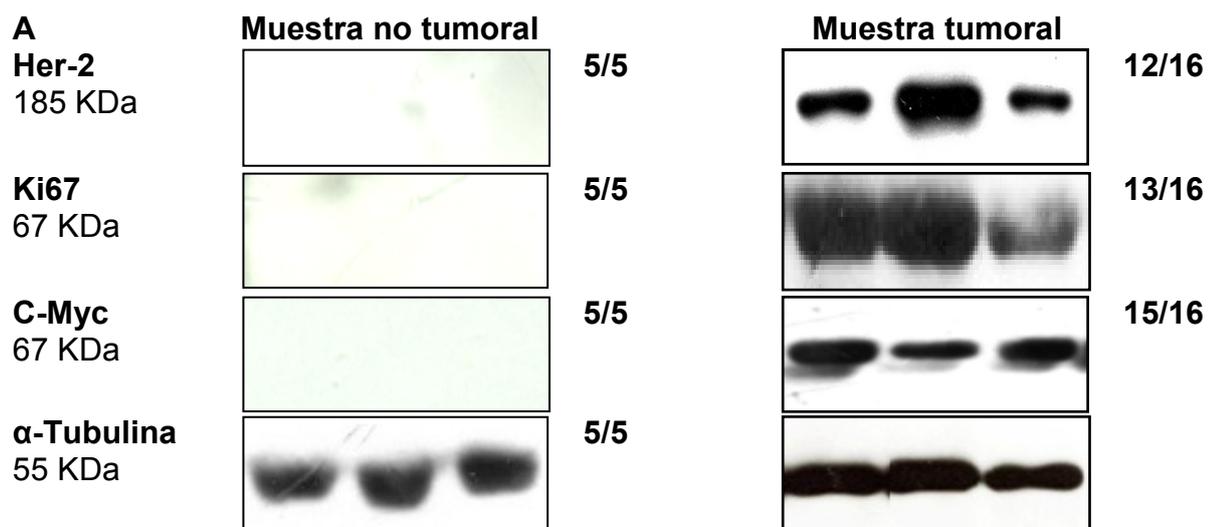
Los niveles de proteína para los biomarcadores canónicos o clásicos se analizaron de la misma forma que en los análisis previos. Se emplearon anticuerpos específicos para anti-Her-2, -H-ras, -Ki67 y -C-Myc. Her-2 es el único factor que analizamos que se encuentra validado como biomarcador en la clínica para cáncer de mama en México [INCAN, 2010]. Los otros biomarcadores se han incluido en numerosos estudios, sin embargo es necesario que se realicen un número mayor de estudios con estos biomarcadores para incluirlos en una validación estadística [Fitzgibbons *et al.*, 2000].

El patrón de expresión de las bandas representativas de todas las muestras se observa en la figura 7. Bajo las mismas condiciones de revelado, tiempo y sustrato quimioluminiscente la muestra tumoral mostró mayor intensidad de las bandas de Her-2, Ki67 y C-Myc en muestras tumorales contra una nula expresión en muestras no tumorales. H-Ras no mostró expresión en ninguno de los dos grupos de muestras (datos no presentados).

Debido a la poca cantidad de proteína en algunas muestras, estas proteínas se analizaron en 16 muestras del total (23). La expresión de Her-2 en tejido tumoral se mantuvo presente en 12 de 16 muestras analizadas (75% de las muestras), Ki67 en 13 de 16 (81%) y C-Myc en 15 de 16 (94%). H-Ras mostró una nula expresión en 16 de las 16 muestras analizadas (100%).

Contrastantemente Her-2, Ki67 y C-Myc no presentaron expresión en ninguna de las muestras no tumorales.

El análisis densitométrico reveló un incremento de la Her-2 de un 90%, de Ki67 del 130% y de C-Myc de 80% con respecto a  $\alpha$ -tubulina en muestras tumorales.



**B**

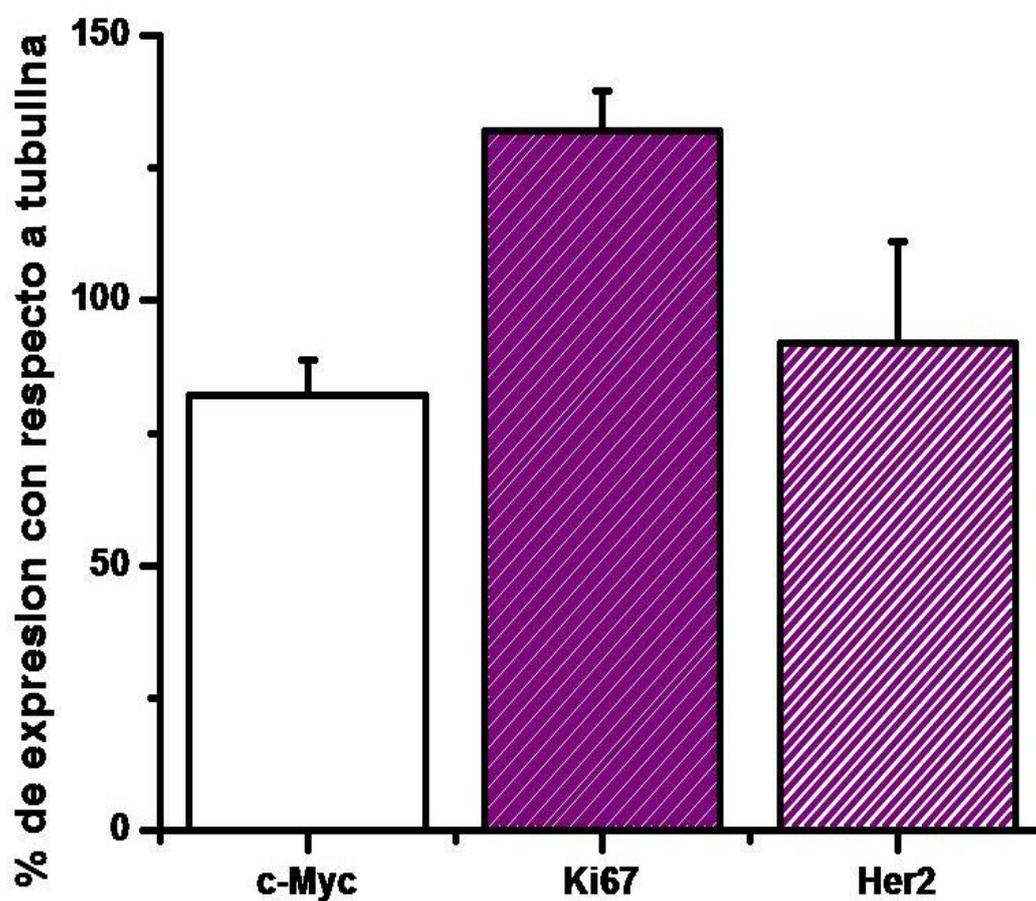


Figura 7: western blot de proteínas empleadas como marcadores canónicos en muestras de tejido mamario no tumoral y muestras tumorales. **A.** Imagen representativa del ensayo donde \* simboliza el número de muestras que presentan el patrón vs. el total de muestras analizadas. **B.** Análisis densitométrico de las imágenes obtenidas (n=16 en muestras tumorales).

## Tumor filoides benigno

Dentro de las biopsias analizadas una de las muestras correlacionó con un tumor filoides benigno (el cual tiene potencial para desarrollar malignidad). La expresión de proteínas de este tejido se analizó de la misma forma que las muestras anteriores (western blot); empleando los mismos anticuerpos para las proteínas glucolíticas (salvo la HKI) y las proteínas mitocondriales. Se presentan los porcentajes de expresión respecto a  $\alpha$ -tubulina para cada uno de los conjuntos de muestras (Fig. 8).

*HIF-1 $\alpha$  y proteínas glucolíticas.* El patrón de expresión de las muestras se observa en la figura 8. Bajo las mismas condiciones de revelado, tiempo y sustrato quimioluminiscente la muestra tumoral benigna mostró una baja intensidad con respecto a  $\alpha$ -tubulina para las bandas de HIF-1 $\alpha$  (7%), GLUT-1 (6%) y HKII (2%). No se observó expresión en el caso de la LDH-A.

En el tejido filoides benigno las cantidades de proteína de HIF-1 $\alpha$  y de HKII son semejantes a la del tejido normal (menores a 10%) contrastando con las muestras tumorales (mayor al 100%). La expresión de GLUT-1 fue baja, diferenciándose de la expresión de la muestra no tumoral y la muestra tumoral. Respecto a la LDH no se encontró expresión alguna en el tejido benigno mientras que las muestras no tumorales tienen una expresión menor al 50% y las muestras tumorales mostraron una expresión mayor al 100%.

La muestra benigna mostró una actividad de HK semejante a las muestras tumorales y a las muestras no tumorales (9 mU/mg de proteína), mientras que la LDH presentó una actividad de 291 mU/mg de proteína, semejante a la actividad de las muestras tumorales.

*Proteínas mitocondriales.* El patrón de expresión de las bandas representativas de todas las muestras se observa en la figura 9. Bajo las mismas condiciones de revelado, tiempo y sustrato quimioluminiscente la muestra tumoral benigna no mostró intensidad de COX-IV; la ATP-asa y la 2OGDH mostraron una intensidad mayor (42% y 38% respectivamente) mientras que el ANT mostró una intensidad menor (6%) con respecto a  $\alpha$ -tubulina.

*Biomarcadores canónicos.* Debido a la poca cantidad de muestra únicamente se pudieron evaluar las enzimas glucolíticas (salvo HKII) y mitocondriales (salvo la GA); los biomarcadores canónicos no pudieron evaluarse.

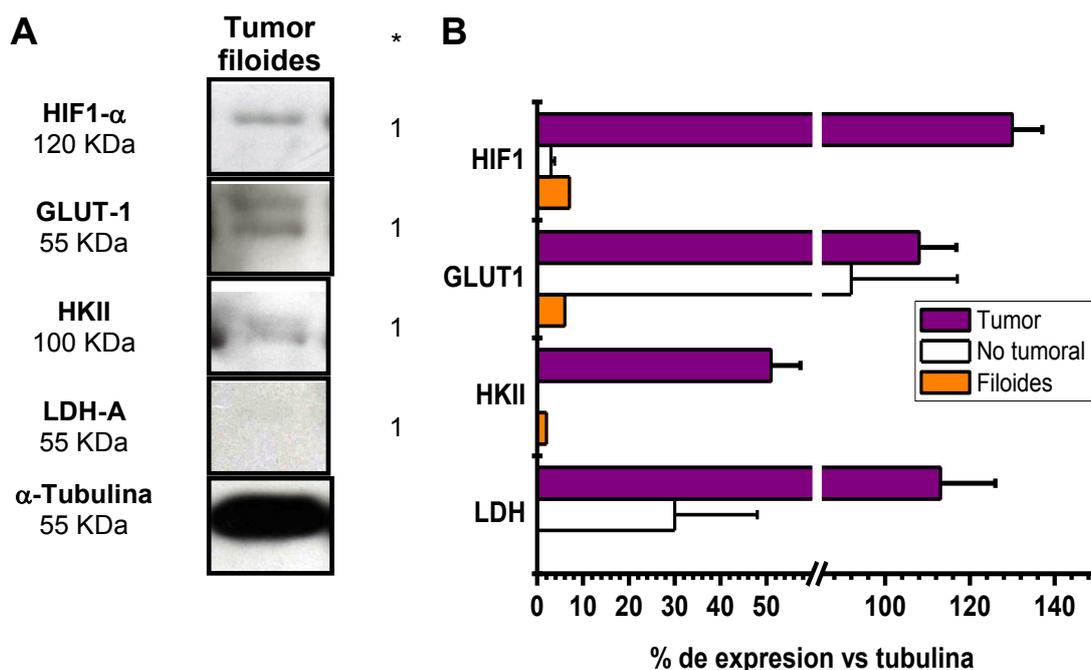


Figura 8. Western blot de HIF1- $\alpha$  y proteínas glucolíticas en muestras de tumor filoides benigno, tejido mamario no tumoral y muestras tumorales. **A.** Imagen representativa del ensayo donde \* simboliza el número de muestras que presentan el patrón vs. el total de muestras analizadas. **B.** Análisis densitométrico de las imágenes obtenidas (n=23 en muestras tumorales, salvo en HKI donde n=17, n=5 en muestras no tumorales y n=1 en tumor filoides benigno). Se muestra el promedio de los resultados  $\pm$  desviación estándar.

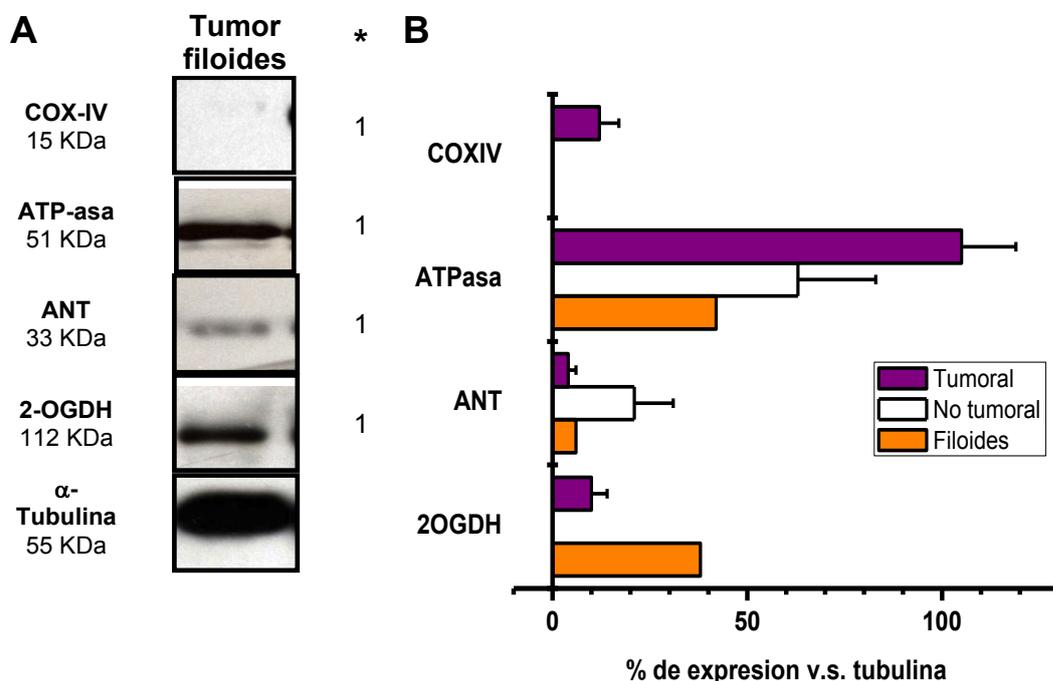


Figura 9. Western blot de proteínas involucradas en la fosforilación oxidativa en muestras de tumor filoides benigno, tejido mamario no tumoral y muestras tumorales. **A.** Imagen representativa del ensayo donde \* simboliza el número de muestras que presentan el patrón vs. el total de muestras analizadas. **B.** Análisis densitométrico de las imágenes obtenidas (n=23 en muestras tumorales, n=5 en muestras no tumorales y n=1 en tumor filoides benigno).

## **Discusión**

Los biomarcadores canónicos (Her-2, RP y RE) empleados en el cáncer de mama son poco exitosos para seleccionar un tratamiento debido a 1) su baja expresión a nivel poblacional (*i.e.* como es el caso de Her-2 cuya expresión se encuentra alrededor del 20% de los tumores mamarios) y 2) su baja respuesta ante terapias convencionales (*i.e.* la mayoría de los biomarcadores analizados en la tabla 1 no presentan una modificación en su nivel de expresión tras un tratamiento convencional (quimioterapia y/o radioterapia) y el 11% de las muestras positivas a RE y RP no responden a la terapia hormonal [Pérez-Sánchez *et al.*, 2008]); y 3) al analizarlos individualmente no son eficientes como factor predictivo [Lari, 2001] (*i.e.* se ha observado una sobre-expresión de Her-2 en cáncer de ovario, gástrico, colon y pulmón, semejante al cáncer de mama [Hynes y Stern, 1994]) Por otro lado los RE y RP se han visto sobre-expresados en tumores de ovario y cérvix [Anderson, 2002].

Una explicación radica en que las mutaciones o sobre-expresiones de estos biomarcadores no se presentan necesariamente al mismo tiempo en todos los pacientes (dependen de las mutaciones presentes en cada individuo) [Vogelstein y Kinzler, 2004]. Adicionalmente, en la práctica clínica se han seleccionado principalmente biomarcadores relacionados a características de proliferación (ciclinas, ki-67, C-Myc) o bien, receptores celulares que no siempre se expresan en todos los pacientes (receptores de crecimiento de la familia erb2 (GFR, Her-2), RE y RP),

En la actualidad se sigue considerando buscar el “biomarcador estrella en cáncer”. Sin embargo la confiabilidad de este “biomarcador estrella” no puede ser alta, debido a que una sola molécula es incapaz de reflejar todos los procesos que ocurren durante la progresión tumoral [Revisado en Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2001]. Nuestro grupo de investigación busca promover el análisis en conjunto de diferentes vías involucradas en los procesos de desarrollo y malignidad tumoral a diferentes niveles: genómico, proteómico, cinetómico y metabólico, para establecer una idea más clara de la dinámica tumoral. Las críticas al análisis de moléculas individuales evaluadas mediante una sola técnica y a la búsqueda del único biomarcador “estrella” se discuten con más profundidad en un artículo publicado por nuestro grupo de trabajo (Apéndice 1) en el cual colaboré [Rodríguez-Enríquez, *et al.*, 2001].

Con base en lo anterior se realizó una búsqueda de biomarcadores en el metabolismo energético tumoral en vista de que 1) es una de las 10 características

reportadas que comparten los tumores [Hannahan y Weinberg, 2011], pero es la única característica general compartida por todos los tumores sólidos que desarrollan hipoxia [Revisado en Moreno-Sánchez *et al.*, 2007]; 2) es una condición que se desarrolla en fases iniciales del tumor y continúa hasta la metástasis; 3) es una característica que precede a la formación de un tumor [Hannahan y Weinberg, 2011]; 4) este proceso presenta repercusiones a largo plazo (*i.e.* formación de un pH ácido en el microambiente celular) que le permite al tumor sólido invadir tejido sano y, 5) se puede evaluar directamente la expresión y la función de las enzimas metabólicas en comparación con un análisis genético. Un análisis genético solo brinda información sobre la expresión del gen, bajo éste análisis no es posible saber si el mensajero se codificará en una proteína funcional en la vía metabólica [Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2011].

La búsqueda de biomarcadores en el metabolismo energético tumoral se presenta como una alternativa para poder ofrecer un perfil de biomarcadores que permitan una mejor detección de la presencia de células cancerosas. Esto con la intención de mejorar, además de la detección, el pronóstico y, posteriormente, el tratamiento.

El presente estudio es un análisis prospectivo de un número limitado de muestras tumorales (n=23) por lo que no es posible realizar un análisis estadístico que pueda indicarnos una diferencia clara a nivel poblacional (*i.e.* es necesario un tamaño muestral de al menos 100 individuos para poder realizar un análisis a nivel poblacional [Milton y Tsokos 2001]). A pesar de lo anterior este estudio ofrece una tendencia inicial de los biomarcadores metabólicos que pueden ser de utilidad en el diagnóstico del cáncer; los cuales fueron identificados mediante un análisis de *t de student*.

### **HIF-1 $\alpha$ tiene alto potencial para ser empleado como biomarcador.**

Diversos estudios han documentado la relación entre HIF-1 $\alpha$  y la malignidad tumoral. Un estudio inmunohistoquímico realizado en el 2001 analizó la relación de la expresión de HIF-1 $\alpha$  y la malignidad tumoral en biopsias de mama tanto no tumorales como en diversos estadios tumorales, correlacionando el incremento en la proteína HIF-1 $\alpha$  con la malignidad del tumor [Bos *et al.*, 2001].

Este estudio analizó proteínas mediante la técnica de western blot, una técnica más sensible que los análisis inmunohistoquímicos debido a que permite detectar con mayor especificidad una proteína sin las interferencias que se puedan deber a la

permeabilización de la membrana celular y de organelos. Este estudio concluyó que HIF-1 $\alpha$  es un biomarcador potencial para el cáncer de mama. En efecto, nuestro estudio determinó que en 21 de 23 muestras tumorales analizadas (más del 90%) se presentó una expresión mayor (un promedio de 4,300%) respecto a las muestras no tumorales. Este valor correlaciona con otros estudios, donde la expresión de éste biomarcador en tumor mamario es alta en comparación con tejido mamario sano (se ha reportado un incremento de HIF-1 $\alpha$  en un 15% en tejido tumoral vs. 0% en tejido no tumoral y tumoral benigno [Bos *et al.*, 2001]; otro estudio ha reportado la expresión de HIF-1 $\alpha$  del 19% en tumores en estadios iniciales y del 69% en tumores metastásicos en comparación con un 0% en tejido no tumoral y tumores benignos [Zhong *et al.*, 2011]). Sin embargo, es importante no considerar a HIF como el único biomarcador indicativo de la presencia de células tumorales ya que se ha visto que HIF-1 $\alpha$  se encuentra estabilizado en otras patologías (preeclampsia, diabetes, inflamaciones, isquemias y psoriasis [Brahimi-Horn y Pouysségur, 2009]) por lo que no es suficiente para ser considerado como biomarcador único; debe ser propuesto como biomarcador en conjunto con proteínas metabólicas y biomarcadores establecidos para una mejor y más eficiente detección del cáncer de mama.

### **Las enzimas glucolíticas se encuentran sobre-expresadas en tumores.**

El análisis de HIF-1 $\alpha$  en asociación con proteínas glucolíticas y mitocondriales y la combinación de los biomarcadores actuales, no se ha estudiado ni propuesto como estrategia para mejorar la detección de cáncer en biopsias de pacientes a pesar de que se ha observado la sobre-expresión de enzimas involucradas en el metabolismo energético (i.e transportadores de glucosa, hexocinasas, anhidrasa carbónica), las cuales son reguladas por HIF-1 $\alpha$  [Goonewardene, 2001]. Adicionalmente, se sabe que la hipoxia modifica la dinámica de la FO (PDK, COX-IV, ATP-asa y ANT) [Solaini *et al.*, 2010]. La importancia de evaluar proteínas metabólicas; glucolíticas y mitocondriales como biomarcadores radica en que 1) tanto la glucólisis como la FO son vías modificadas en todas las células tumorales [Moreno-Sánchez *et al.*, 2007] y 2) esta modificación se incrementa durante la hipoxia [Solaini *et al.*, 2010], como consecuencia del efecto Warburg. En este trabajo se analizó la expresión por western blot de las enzimas glucolíticas que ejercen el mayor control de flujo metabólico: GLUT-1, HKI y

HKII [Marín-Hernández *et al.*, 2010]; y una enzima la cual se encuentra sobre-expresada en la mayoría de los tumores (LDH-A) [Marín Hernández *et al.*, 2006].

*GLUT-1*. A pesar de encontrarse expresada en casi todas las muestras tumorales (21 de 23 muestras presentaron una expresión alta (arriba del 100% con respecto a  $\alpha$ -tubulina )) su expresión fue semejante a la de las muestras no tumorales (las muestras tumorales presentaron un incremento promedio del 15% de GLUT1), por lo que hace falta un estudio con un número mayor de muestras para considerar a esta enzima como biomarcador. El análisis de *t de student* no mostró diferencia significativa entre los dos conjuntos de muestras.

Sin embargo se ha reportado que GLUT1 únicamente se expresa en el 50% de los tumores mamarios [Younes *et al.*, 1995; Binder *et al.*, 1997; Kang *et al.*, 2002]. Además es conocido que las células tumorales incrementan su transporte de glucosa por lo que la expresión semejante de GLUT-1 en ambos grupos de muestras pueda deberse a: a la sobre-expresión de otras isoformas del transportador [Younes *et al.*, 1995], como por ejemplo GLUT-3 que es más afín a la glucosa y se sobre-expresa en condiciones hipóxicas, por lo que un análisis más profundo de estas isoformas debe considerarse.

*HK*. Las isoformas analizadas en este estudio (-I y -II) se sobre-expresaron en tejido tumoral. La expresión de HKI fue un 60% mayor en tejido tumoral en un 50% de las muestras analizadas, mientras que la expresión de HKII fue del 100% respecto al control de carga ( $\alpha$ -tubulina) en un 85% de las muestras tumorales. Para esta isoforma no se observó expresión en las muestras no tumorales.

La hexocinasa presenta 4 isoformas y es altamente probable que la expresión de alguna de éstas isoformas en tejido no tumoral deban darse con mayor intensidad, sobre todo las isoformas (isoforma -III y -IV) que no estén reguladas por HIF-1 $\alpha$  [Smith, 2000].

Como un control adicional para confirmar la ausencia de expresión de HKII en muestras no tumorales se reveló ésta enzima por tiempos mayores (las placas fueron expuestas durante 2 horas en comparación con exposición de 1 minuto) para detectar su expresión. Sin embargo no hubo expresión de ésta enzima. Por otro lado la HKI, revelada a tiempos largos (2 horas de exposición de placas), pudo detectarse en muestras de tejido sano pero en un porcentaje bajo (alrededor del 10% con respecto a su control de carga (datos no mostrados)). Se ha visto que la isoforma predominante en tumores de mama es HKII [Marín-Hernández *et al.*, 2009]. Lo anterior podría indicar que las HKs tumorales son predominantes y pueden funcionar como biomarcadores de cáncer.

*LDH* Por último, la LDH se encuentra altamente expresada en tejido tumoral (aumentó en un 400% respecto al tejido no tumoral) y su presencia fue del 100% de las muestras analizadas, lo que la sitúa como un biomarcador potencial. Dada su función en la acidificación extracelular, también esta enzima ha sido estudiada en otros tipos tumorales (hígado, cerebro, cuello, útero) y se ha reportado la sobre-expresión de ésta enzima en tumores mamarios [Revisado en Marín-Hernández *et al.*, 2009]. Otros estudios han encontrado un incremento de ésta proteína en regiones hipóxicas de tumores vs. regiones oxigenadas [Rademakers *et al.*, 2011]. De igual forma se ha encontrado esta proteína incrementada en sueros de pacientes con tumores en estadios tumorales avanzados en comparación con individuos sanos o pacientes que se han curado de cáncer [Díaz-Lagares *et al.*, 2011], Inclusive se ha relacionado la expresión de esta proteína con pacientes con Her-2 sobre-expresado [Mojtahedi *et al.*, 2011], lo que incrementa su potencial como biomarcador.

Estas proteínas glucolíticas reflejan el ambiente hipóxico tumoral y su sobre-expresión es el resultado de las características propias del tumor por lo que pueden ser explotadas no solo para la identificación de células tumorales, sino también para el diseño de estrategias terapéuticas [Semenza, 2008; Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2011].

### **Actividad enzimática heterogénea**

Al analizar un fenómeno con un alto número de vías modificadas, como es el cáncer, es necesario tener en cuenta que evaluar un sólo proceso de éstas vías (*i.e.* transcripción, traducción) mediante una sola técnica (*i.e.* PCR, western blot) reflejará un dato incompleto si no se evalúa la funcionalidad de la proteína [Rodríguez-Enríquez, *et al.*, 2011]. Es importante al estudiar proteínas del metabolismo energético, además de realizar un análisis proteómico, evaluar la actividad de éstas enzimas. Basándonos en este planteamiento se analizaron las actividades de la HK (por ser un importante punto de control en la vía glucolítica) y LDH (cuya sobre-expresión se encuentra presente en diversos tumores [Marín-Hernández *et al.*, 2009], además de ser la enzima responsable de la degradación de piruvato en condiciones anaerobias [Semenza, 2010]). Además ambas proteínas son reguladas por HIF y se encuentran sobre-expresadas en tumores mamarios [Revisado en Marín-Hernández 2009]. Las actividades de éstas enzimas fueron comparadas con el perfil de expresión proteica entre muestras tumorales y no tumorales. La información en ciencia básica que puede aportar el análisis de la actividad

enzimática es importante para el conocimiento de la fisiología del tumor. Sin embargo la actividad enzimática no puede ser considerada una estrategia para determinar un biomarcador en los análisis clínicos rutinarios debido a las dificultades en su estandarización y al incrementado costo que representa su evaluación.

Los resultados de la actividad enzimática de ambos conjuntos de muestras de éste estudio fueron heterogéneos y no correlacionaron ni con la expresión proteica de HK ni de LDH en muestras tumorales, como tampoco en muestras no tumorales. Además de la heterogeneidad de las muestras, ambos grupos (muestras tumorales y no tumorales) no mostraron actividades enzimáticas diferentes. Aún así, hay estudios donde se encuentran diferencias significativas en las actividades de éstas enzimas entre tejidos no tumorales y tumorales en biopsias de mama [Balinsky *et al.*, 1983; Szutowicz *et al.*, 1979]. Probablemente el almacenamiento en N<sub>2</sub> líquido afecta las actividades de estas enzimas por lo que controles posteriores deben realizarse.

Estos resultados indican que el análisis de la actividad enzimática no puede ser un buen biomarcador de rutina; sin embargo, y respecto a la ciencia básica, es necesario profundizar en este tipo de estudios, pues resultará benéfico y esclarecedor el tener descritos y caracterizados todos los componentes de una función biológica determinada en condiciones tanto fisiológicas como patológicas, enfatizado los cambios relevantes que presentan [Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2011].

### **Las enzimas del metabolismo energético mitocondrial no presentan cambios considerables.**

El planteamiento de una mitocondria disfuncional en cáncer (como proponía la hipótesis de Warburg) ha sido cuestionado por diversos grupos de trabajo [Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2010; Nagrath *et al.*, 2011; Bellance *et al.*, 2009] lo que ha propiciado un incremento en el número de estudios donde evalúan la función de la hipoxia sobre la mitocondria tumoral [Papandreou *et al.*, 2006; Fukuda *et al.*, 2007; Rodríguez-Enriquez *et al.*, 2010] o modificaciones mitocondriales en tumores para encontrar un biomarcador (*i.e.* como es el análisis de las mutaciones del mtADN en tumores [Radpour, 2009]). Debido a que nuestro grupo de investigación ha evaluado actividades enzimáticas mitocondriales en tumores, este trabajo analizó proteínas de la FO y del ciclo de Krebs en biopsias de cáncer de mama y muestras no tumorales para su evaluación como posibles biomarcadores, debido a su importancia para el aporte de ATP en tejido sano

como en algunos tipos tumorales [Huang *et al.*, 2008]. El estudio incluyó únicamente la evaluación de la expresión proteica por western blot debido a que la cantidad de la biopsia no es suficiente para medir actividad.

**COX-IV.** Se ha reportado que HIF-1 $\alpha$  disminuye de manera indirecta la expresión de COX-IV 1, mientras que incrementa la expresión de COX-IV 2 [Fukuda 2007]. En este trabajo se analizó la isoforma 1 de la COX-IV por lo que es necesario considerar a la isoforma 2 en futuros análisis. En este estudio no se encontró expresión de esta proteína tanto en tejido no tumoral ni en tejido tumoral. Esto puede deberse a que la muestra presenta poca cantidad de ésta proteína en particular para poder ser analizada por lo que se requeriría un mayor tiempo de exposición de las muestras durante el revelado o bien puede estar expresando otra isoforma de dicha proteína.

**GA.** La nula presencia de las isoformas K y L de la GA pueda deberse a la poca cantidad de proteína presente en las muestras, por lo que se requerirá un mayor tiempo de exposición de esta muestra durante el revelado (como sucede con la COX-IV). Sin embargo se ha reportado la presencia de esta enzima en líneas celulares tumorales como cervix y mama [Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2010; Reitzer 1979], aunque estos resultados no correlacionaron con lo observado en este estudio. La ausencia de correlación puede deberse a que al estudiar biopsias existan factores que modifiquen la expresión de éstas proteínas que un modelo de líneas celulares no pueda mimetizar completamente.

**ATP-asa.** La expresión de la ATP-asa en muestras tumorales es un 80% mayor que en las muestras no tumorales y esta expresión se mantuvo en más del 95% de las muestras tumorales. Al igual que la HKI, esta enzima no se expresa en el mismo porcentaje de magnitud en comparación con HKII, LDH o HIF-1 $\alpha$ , sin embargo la alta permanencia de ésta característica llama la atención. Su expresión correlaciona con estudios donde se ha observado un incremento de la ATP-asa en cáncer mamario tanto en tumores, como en líneas celulares [Huang *et al.*, 2008; Pan *et al.*, 2011].

**ANT.** En el caso del ANT se observa una disminución de casi el 90% en las muestras tumorales respecto a las muestras no tumorales y este patrón se presentó en cerca del 80% de las muestras tumorales. ANT fue la única proteína en este estudio que presentó una disminución en su expresión en muestras tumorales. Su baja expresión puede ser considerada como indicador de cáncer, aunque hacen falta estudios con un mayor número de muestras para validarlo. Por ejemplo en los análisis de firmas genéticas como es el Mamaprint tanto el aumento como el decremento de mRNA

específicos aporta información sobre el pronóstico [van 't Veer *et al.*, 2002]. Por otra parte una nula expresión en los biomarcadores clásicos (RE, RP, Her-2) se relacionan con fenotipos más malignos [Irvin y Carey. 2008]. Sin embargo, no se ha propuesto esta proteína como biomarcador en ningún tipo de tejido.

**2-OGDH.** 2-OGDH se encuentra levemente expresada en la mayoría de las muestras tumorales (expresión menor al 10% respecto a  $\alpha$ -tubulina en un 65% de las muestras), sin embargo en el 35 % restante de las muestras su expresión es alrededor del 100% con respecto a  $\alpha$ -tubulina (datos no mostrados). Este último dato correlaciona con otros trabajos [Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2010] donde se encontró expresión de ésta enzima. Por otra parte no se observa expresión en las muestras de tejido no tumoral. La diferencia de porcentajes de expresión dentro de la misma muestra puede estar relacionada con la malignidad tumoral, con la expresión de algún biomarcador canónico (Her-2, RE, RP) o con la baja expresión de estos biomarcadores (fenotipo triple negativo). Correlacionar proteínas con biomarcadores canónico es una estrategia que se ha empleado para proteínas como ki-67 y C-Myc [Lari y Kuerer, 2011]. Al igual que el ANT, la 2-OGDH no se ha propuesto como un biomarcador en ningún tipo de cáncer por lo que analizar estas proteínas es un tema novedoso.

### **Los biomarcadores canónicos se encuentran sobre-expresados en las muestras tumorales.**

El analizar biomarcadores canónicos en este estudio permite validar nuestros resultados al contrastar la expresión de éstas proteínas por la técnica de WB con la expresión reportada en otros estudios. Por otro lado la validación de estos biomarcadores apoya el empleo de proteínas glucolíticas y/o mitocondriales. Bajo esta perspectiva se analizaron Her-2 (un biomarcador empleado rutinariamente para la elección del tratamiento), Ki-67, H-Ras y C-Myc (marcadores en proceso de validación), pero que se emplean en estudios de rutina [Rodriguez Enriquez , 2011].

Las muestras no tumorales analizadas en este estudio no presentaron expresión de Her-2, ki-67 ni C-Myc. Por otro lado el porcentaje de expresión de éstos biomarcadores en las muestras tumorales fue de 80 % (C-Myc), 90% (Her-2) % y 140 (ki-67). La presencia de éstos biomarcadores en este estudio fue de 75% (Her-2), 81% (ki-67) y 94% (C-Myc). En la clínica se considera positiva un biomarcador a partir de que éste presenta una expresión del 5% (C-Myc) hasta el 30% (Her-2) y su presencia a nivel

poblacional va del 10% (Her-2) al 60% (Her-2, C-Myc) [Pérez-Sánchez *et al.*, 2008; Yerushalmi *et al.*, 2010; Lari y Kuerer, 2011]. Esto se debe en gran parte a que el análisis inmunohistoquímico que se realiza con este marcador en biopsias de cáncer de mama da porcentajes menores al compararse con técnica de WB, técnica que es considerada de mayor sensibilidad para detectar proteínas. El resultado obtenido en este trabajo refuerza la propuesta de emplear a HIF-1 $\alpha$  y enzimas glucolíticas como posibles biomarcadores.

*H-Ras*. Por otro lado H-Ras tuvo una nula expresión en muestras tumorales al igual que en muestras no tumorales (datos no mostrados). El planteamiento que se empleó para discutir la ausencia de COX-IV puede emplearse en este caso: la muestra puede presentar poca cantidad de ésta proteína en particular para poder ser analizada por lo que se requeriría un mayor tiempo de exposición durante el revelado o bien puede estarse expresando otra isoforma de dicha proteína como K-Ras o N-Ras las cuales también se han observado sobre-expresadas en otras líneas tumorales y en cáncer de mama [Malaney, 2001].

El analizar a la par proteínas del metabolismo energético con biomarcadores canónicos permite estandarizar un control que valide las proteínas glucolíticas como biomarcadores potenciales. Estos estudios podrán a la larga ser considerados en los análisis rutinarios, sobre todo en situaciones donde los biomarcadores canónicos no den un panorama esclarecedor como puede ser: 1) la expresión del biomarcador por debajo del umbral de corte, 2) la posibilidad de falsos positivos o negativos, 3) el fenotipo tumoral triple negativo (*i.e.* muestras tumorales cuya expresión de RE, RP y Her-2 sea baja). Sin embargo no es conveniente analizarlos de manera individual, sino considerando toda una firma de expresión proteica (ej. Biomarcadores canónicos + metabólicos + proliferativos + antiapoptóticos, etc).

### **El tumor benigno presenta un patrón de expresión diferente a la muestra tumoral y a la muestra no tumoral.**

Durante el desarrollo de este estudio se analizó una muestra cuyo análisis inicial indicaba un fenotipo tumoral maligno. El análisis histopatológico posterior confirmó que esta muestra correspondía a un tumor filoides benigno. Este tipo de tumores presentan las siguientes características: su frecuencia es baja en la población, presentan una estructura foliada (tipo hoja), tiene un diámetro mayor a 5 cm y presenta potencial para

ser maligno [Tse, *et al.*, 2010]. Al ser un tumor benigno suponemos que la expresión de las proteínas analizadas diferirá de las muestras tumorales y de las muestras no tumorales. La comparación de esta muestra con las muestras tumorales y no tumorales arrojaron las siguientes diferencias: 1) La baja expresión de HIF-1 $\alpha$  y proteínas glucolíticas en esta muestra corrobora con estudios previos donde se ha observado poca o nula expresión de éstas proteína en tumores benignos. [Bos, 2001; Rudlowski *et al.*, 2004; Bailinski *et al.*, 1984]. 2) La nula expresión de COX-IV es semejante en los tres grupos de muestras. Por su parte la expresión de la ATP-asa fue semejante en muestras tumorales mientras que la expresión del ANT fue semejante a las muestras no tumorales. 3) Por último la expresión de 2OGDH fue mayor que en muestras tumorales. La importancia de analizar la expresión de biomarcadores en tumores benignos (con atención especial a tumores con potencial de desarrollar una mayor malignidad) permiten identificar los cambio que presenta un tumor a lo largo de su desarrollo [Bos, 2001; Rudlowski *et al.*, 2004]. Al ser diferente el patrón de expresión contra las muestras no tumorales se demuestra que estas enzimas no sólo pueden ser empleadas como biomarcadores diagnóstico, sino como biomarcadores pronósticos. Sin embargo estos resultados son de una muestra única, es necesario realizar un análisis con un número mayor de muestras pero de seguir presentando un patrón semejante podría apoyar el empleo de proteínas metabólicas como biomarcadores pronóstico.

### **Validación del análisis de múltiples biomarcadores.**

Esta tesis derivó a partir de un estudio piloto impulsado por el INCAN y el INC. Al ser un estudio prospectivo los resultados obtenidos sirven para promover estudios posteriores bajo la idea de analizar diferentes vías del fenotipo tumoral. Debido al número limitado de muestras analizadas en esta tesis, resultados concluyentes no pueden ser propuestos ya que no hay suficientes muestras para aportar información significativa a nivel poblacional (*i.e.* cuantificar el nivel de expresión de una proteína para establecer un punto de corte para un biomarcador determinado que ayude en la diagnosis). En este sentido es importante continuar con un estudio a mayor profundidad, empleando un número mayor de muestras tanto tumorales como no tumorales. Sin embargo, los resultados obtenidos de este trabajo marcan una pauta para dirigir investigaciones posteriores sobre este tema.

Este trabajo aportó información relacionada al empleo de una firma de biomarcadores en cáncer; el cual se propone como una combinación de varios marcadores biológicos de diferentes vías alteradas en esta enfermedad [Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2011] como son la angiogénesis, la proliferación, la metástasis, el metabolismo energético modificado, etc.

Esta firma global, incluyendo HIF-1 $\alpha$ , y algunos de sus blancos glucolíticos, en combinación con los biomarcadores canónicos pueden ofrecer una mejor alternativa para: 1) la identificación de presencia de células cancerosas; 2) el pronóstico del desarrollo del cáncer; 3) la detección de blancos antineoplásicos contra células tumorales y, 4) la eficacia ante un tratamiento. Todavía falta explorar otras vías tumorales alteradas (proliferación, angiogénesis, metástasis, oncogenes), sin embargo trabajos enfocados en estos estudios abren la puerta para futuras investigaciones al respecto para que, en un futuro las decisiones clínicas en torno al cáncer se realicen tomando en cuenta un panorama más amplio de las vías que están involucradas en el desarrollo del fenotipo tumoral.

## **Conclusiones**

- HIF-1 $\alpha$  presentó una alta expresión de 4,300% en 21 de las 23 muestras analizadas con respecto al tejido sano, por lo que es un biomarcador confiable.
- El aumento en la expresión de HKI, HKII y LDH-A correlacionó con una alta actividad enzimática (1-25 y 30-100 mU/mg proteína para HK y 307 $\pm$ 78 mU/mg proteína para LDH) en muestras tumorales.
- Los niveles de expresión de enzimas mitocondriales no permite identificar un biomarcador.
- Los biomarcadores Her-2, ki67 y C-Myc no se detectaron en tejido sano y se expresaron importantemente en el tejido tumoral.
- Con base en lo anterior es posible proponer un perfil inicial de expresión proteica para el cáncer de mama en el INCan que conste de las siguientes proteínas:
  - HIF-1 $\alpha$  + HKI + HKII + LDH + Her-2 + Ki67 + C-Myc

## **Referencias**

America Cancer Society. *Cáncer de seno; Detección temprana, diagnóstico y clasificación por etapas*. [en línea] <<http://www.cancer.org/Espanol/cancer/cancerdeseno/Guiadetallada/cancer-de-seno-inicial-diagnostico>> [consulta: 16 junio 2011]

Anders K Carey L.. 2009. *Biology, Metastatic Patterns, and Treatment of Patients with Triple-Negative Breast Cancer*. Clin Breast Cancer 9:S73–S81. doi:10.3816/CBC.2009.s.008.

Anderson E. 2002. *The role of oestrogen and progesterone receptors in human mammary development and tumorigenesis*. Breast Cancer Res 4:197-201.

Balinsky D Platz CE Lewis JW. 1983. *Isozyme patterns of normal, benign, and malignant human breast tissues*. Cancer Res 43:5895-5901.

Bellance N Benard G Furt F *et al.* 2009 *Bioenergetics of lung tumors: alteration of mitochondrial biogenesis and respiratory capacity*. Int. J Biochem Cell Biol 41:2566–2577.

Bos R Zhong H Hanrahan CF *et al.* 2001. *Levels of hypoxia-inducible factor-1alpha during breast carcinogenesis*. J Natl Cancer Inst 93:309–314.

Brahimi-Horn M Pouyssegur J. 2009. *HIF at a glance*. J Cell Sci 122:1055-1057.

Brenner C Subramaniam K Pertuiset C *et al.* 2010. *Adenine nucleotide translocase family: four isoforms for apoptosis modulation in cancer*. Oncogene 30:883–895.

Brown RS Goodman TM Zasadny KR *et al.* 2002. *Expression of hexokinase II and Glut-1 in untreated human breast cancer*. Nucl Med Biol 29:443–453.

Burcombe RJ Makris A Richman PI *et al.* 2005. *Evaluation of ER, PgR, HER-2 and Ki-67 as predictors of response to neoadjuvant anthracycline chemotherapy for operable breast cancer*. Br J Can 92:147–155

Burant CF y Bell GI. 1992. *Mammalian facilitative glucose transporters: evidence for similar substrate recognition sites in functionally monomeric proteins*. Biochemistry 31:10414-10420.

Burt BM Humm JL Kooby DA *et al.* 2001. *Using positron emission tomography with [(18)F]FDG to predict tumor behavior in experimental colorectal cancer*. Neoplasia 3:189–195.

Butler JA Bretsky S Mendex BC *et al.* 1985. *Estrogen receptor protein of breast cancer and predictor of recurrence*. Cancer 55:1178-1181.

Calvert H & Azzariti A. 2011. *The clinical development of inhibitors of poly (ADPribose) polymerase*. Annals of Oncology 22: i53–i59 doi:10.1093/annonc/mdq667 symposium article.

Ceballos-Cancino G Hernández-Rodríguez NA. 2008. *Moduladores de Progresión en Cáncer de Mama*. Cancerología 3:41-49

Citri A Yarden Y. 2006. *EGF-ERBB signalling: towards the systems level*. Nat Rev Mol Cell Biol 7:505–516.

Cuezva JM Krajewska M de Heredia ML *et al.* 2002. *The bioenergetic signature of cancer: a marker of tumor progression*. Cancer Res 62:6674–6681.

Cuezva JM Chen G Alonso AM *et al.* 2004. *The bioenergetic signature of lung adenocarcinomas is a molecular marker of cancer diagnosis and prognosis*. Carcinogenesis 25:1157–1163.

Chung FY Huang MY Yeh CS *et al.* 2009. *GLUT1 gene is a potential hypoxic marker in colorectal cancer patients*. BMC Cancer. 9:241.

- Díaz-Lagares A Alegre E Arroyo A *et al.* 2011. *Evaluation of multiple serum markers in advanced melanoma.* Tumour Biol 32:1155-1161.
- dos Santos MA Borges JB de Almeida DC *et al.* 2004. *Metabolism of the microregions of human breast cancer.* Cancer Letters 216:243–248
- EBCTCG. 2005. *Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials.* Lancet 1687–1717.
- Ehrismann D Flashman E Genn DN *et al.* 2007. *Studies on the activity of the hypoxia-inducible-factor hydroxylases using an oxygen consumption assay.* Biochem J 227-234.
- Erickson JW Cerione RA. 2010. *Glutaminase: A hot spot for regulation of cancer cell metabolism?* Oncotarget 1:734–740.
- Fantin VR St-Pierre J Leder P. 2006. *Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance.* Cancer Cell 9:425-434.
- Fukuda R Zhang H Kim JW *et al.* 2007. *HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells.* Cell 129:111–122.
- Fitzgibbons P Page D Weaver D *et al.* 2000. *Prognostic Factors in Breast Cancer.* Arch Pathol Lab Med 124:966-978.
- Goldman NA Katz EB Glenn AS *et al.* 2006. *GLUT1 and GLUT8 in endometrium and endometrial adenocarcinoma.* Mod Pathol 19:1429-1436.
- Goonewardene TI Sowter HM Harris AL. 2002. *Hypoxia-Induced Pathways in Breast Cancer.* Micros Res Tech 59:41–48
- Graus-Porta D Beerli RR Daly JM *et al.* 1997. *ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling.* EMBO J 16:1647–1655.
- Gutierrez C Schiff R. 2011. *HER2, Biology, Detection, and Clinical Implications.* Arch Pathol Lab Med 135:55-62
- Hanahan D Weinberg R. 2011. *Hallmarks of Cancer: The Next Generation.* Cell 144:646-674.
- Hanahan D Weinberg R. 2000. *The Hallmarks of Cancer.* Cell 100:57–70.
- Höckel M Vaupel P. 2011. *Tumor Hypoxia: Definitions and current clinical biologic, and molecular aspects.* J Natl Cancer Inst 93:266-276.
- Huang TC Chang HY Hsu CH *et al.* 2008. *Targeting therapy for breast carcinoma by ATP synthase inhibitor aurovertin B.* J Proteome Res 7:1433-1444
- Hynes NE Stern DF. 1994. *The biology of erbB-2/neu ~HER-2 and its role in cancer.* Biochim et Biophys Acta 1198:165-184
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía; INEGI. 2009. [en línea] <<http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/aPropositom.asp?s=inegi&c=2676&ep=8>> [consulta: 4 abril 2011]
- Irvin WJ Jr Carey LA. 2008. *What is triple-negative breast cancer?* Eur J Cancer 44:2799 –2805
- Isidoro A Martinez M Fernandez PL *et al.* 2004. *Alteration of the bioenergetic phenotype of mitochondria is a hallmark of breast, gastric, lung and oesophageal cancer.* Biochem J 378:17–20.
- Kim JW Tchernyshyov I Semenza GL *et al.* 2006. *HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia.* Cell Metab 3:177-185.

King CR Kraus MH Aaronson SA. 1985. *Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma*. Science 229:974–976.

Koukourakis MI Giatromanolaki A Simopoulos C *et al.* 2005. *Lactate dehydrogenase 5 (LDH5) relates to up-regulated hypoxia inducible factor pathway and metastasis in colorectal cancer*. Clin. Exp Metastasis 22:25-30.

Lari S Kuerer H. 2011. *Biological Markers in DCIS and Risk of Breast Recurrence: A Systematic Review*. J Cancer 2:232-261.

Le Doussal V Tubiana-Hulin M Friedman S *et al.* 1989 *Prognostic value of histologic grade nuclear components of Scarff-Bloom-Richardson (SBR): an improved score modification based on multivariate analysis of 1262 invasive ductal breast carcinomas*. Cancer 64:1914–1921.

Lee WY Huang SC Hsu KF *et al.* 2008. *Roles for hypoxia-regulated genes during cervical carcinogenesis: somatic evolution during the hypoxia-glycolysis-acidosis sequence*. Gynecol Oncol 108:377-384.

Lehninger AL Lee Nelson DL Cox MM. 2008. *Lehninger principles of biochemistry*. 5<sup>th</sup> Edition. W.H. Freeman. 1100 pp

Macheda ML Rogers S Best JD. 2005. *Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer*. J Cell Physiol 202:654-662.

Madu CO Lu Y. 2010. *Novel diagnostic biomarkers for prostate cancer*. J Cancer 6:150-177.

Malaney S Daly RJ. 2001 *The ras signaling pathway in mammary tumorigenesis and metastasis*. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 6:101-113.

Mangia A Malfettone A Simone G *et al.* 2011. *Old and new concepts in histopathological characterization of familial breast cancer*. Ann Oncol 22:i24–i30. doi:10.1093/annonc/mdq662 symposium article

Marín-Hernández A Gallardo-Pérez JC Ralph SJ *et al.* 2009. *HIF-1 $\alpha$  Modulates Energy Metabolism in Cancer Cells by Inducing Over-Expression of Specific Glycolytic Isoforms*. Mini Rev Med Chem 9:1084-1101.

Marín-Hernández A Gallardo-Pérez JC Rodríguez-Enríquez S *et al.* 2011. *Modeling cancer glycolysis*. Biochim Biophys Acta 1807:755-767

Matés JM Segura JA Campos-Sandoval JA *et al.* 2009. *Glutamine homeostasis and mitochondrial dynamics*. Int J Biochem Cell Biol 41:2051–2061

Mayeux R. 2004. *Biomarkers: Potential Uses and Limitations*. NeuroRx 1:182–188.

Mclain AL Szweda PA Szweda LI. 2011.  *$\alpha$ -Ketoglutarate dehydrogenase: A mitochondrial redox sensor*. Free Radic Res 45: 29–36. doi:10.3109/10715762.2010.534163.

Milton JS Tsokos JO. 2001. *Estadística para biología y ciencias de la salud*. Madrid: Interamericana McGraw Hill 722 pp.

Mittendorf EA Wu Y Scaltriti M *et al.* 2009. *Loss of HER2 amplification following trastuzumab-based neoadjuvant systemic therapy and survival outcomes*. Clin Cancer Res 15:7381–7388.

Moasser MM. 2007. *The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis*. Oncogene 26:6469–6487.

Mohammed RH Lakatua AJ Haus E *et al.* 1986. *Estrogen and progesterone receptors in human breast cancer: correlation with histologic subtype and degree of differentiation*. Cancer 58:1076-1081

Mojtahedi Z Safaei A Yousefi Z, *et al.* 2011. *Immunoproteomics of HER2-positive and HER2-negative breast cancer patients with positive lymph nodes*. OMICS 15:409-418.

- Moreno-Sánchez R Rodríguez-Enríquez S Marín-Hernández A *et al.* 2007. *Energy metabolism in tumor cells*. FEBS J 274:1393-1418.
- Moreno-Sánchez R Rodríguez-Enríquez S Saavedra E *et al.* 2009. *The bioenergetics of cancer: is glycolysis the main ATP supplier in all tumor cells?* Biofactors 35:209-225.
- Mori Y Tsukinoki K Yasuda M *et al.* 2007. *Glucose transporter type 1 expression are associated with poor prognosis in patients with salivary gland tumors*. Oral Oncol 43:563-569.
- Muniesa-Soriano JA. 2011. *Imágenes histológicas del cáncer de mama*. Boletín Oncológico del área sanitaria de Teruel 13 [en línea] <<http://www.boloncol.com/boletin-13/imagenes-histologicas-del-cancer-de-mama.html>> [consulta: 26 de octubre 2011]
- Nagrath D Caneba C Karedath T *et al.* 2011. *Metabolomics for mitochondrial and cancer studies*. Biochim Biophys Acta.1807:650-663.
- Paik S Shak S Tang G *et al.* 2004. *A Multigene Assay to Predict Recurrence of Tamoxifen-Treated, Node-Negative Breast Cancer*. N Engl J Med 351:2817-2826.
- Pan J Sun LC Tao YF *et al.* 2011. *ATP synthase ecto- $\alpha$ -subunit: a novel therapeutic target for breast cancer*. J Transl Med 8:211.
- Papandreou I Cairns-Fontana L *et al.* 2006. *HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption*. Cell Metab 3:187-197.
- Patiar S Harris H. 2006. *Role of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  as a cancer therapy target*. Endocr Relat Cancer 13:S61-S75.
- Pedersen P. 1999. *Mitochondrial events in the life and death of animal cells: a brief overview*. J Bioenerg Biomembr 31:291-304.
- Pérez-Sánchez VM Vela-Chávez TA Mora-Tiscareño MA *et al.* 2008. *Diagnóstico Histopatológico y Factores Pronóstico en Cáncer Infiltrante de Glándula Mamaria*. Cancerología 3: 7-17.
- Rademakers SE Lok J van der Kogel AJ *et al.* 2011. *Metabolic markers in relation to hypoxia; staining patterns and colocalization of pimonidazole, HIF-1 $\alpha$ , CAIX, LDH-5, GLUT-1, MCT1 and MCT4*. BMC Cancer.12:167.
- Radpour R Fan AX Kohler C *et al.* 2009. *Current understanding of mitochondrial DNA in breast cancer*. Breast J. 15:505-509.
- Rankin EB Giaccia AJ. 2008. *The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis*. Cell Death Differ 15:678-685.
- Reitzer L Wice B Kennel D. 1979. *Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells*. JBC 254:2669-2676.
- Regil-Hallmann RS Ibarra-del-Río M Flores-Hernández L. 2008. *Correlación citohistológica en el Instituto Nacional de Cancerología en el año 2006*. Patología 46:309-314.
- Rodríguez-Enríquez S Carreño-Fuentes L Gallardo-Pérez JC *et al.* 2010. *Oxidative phosphorylation is impaired by prolonged hypoxia in breast and possibly in cervix carcinoma*. Int J Biochem Cell Biol 42:1744-1751
- Rodríguez-Enríquez S Pacheco-Velázquez SC Gallardo-Pérez JC *et al.* 2011. *Multi-biomarker pattern for tumor identification and prognosis*. J Cell Biochem 112:2703-2715.
- Rudlowski C Moser M Becker AJ *et al.* 2004. *GLUT1 mRNA and protein expression in ovarian borderline tumors and cancer*. Oncology 66:404-410.
- Sawyers C. 2008. *The cancer biomarker problem*. Nature 452:548-552.

- Semenza GL. 2008. *Tumor metabolism: cancer cells give and take lactate*. J Clin Invest 118:3835-3837. doi: 10.1172/JCI37373. Epub 2008 Nov 20.
- Semenza GL. 2009. *Regulation of Vascularization by Hypoxia-Inducible Factor 1, Hypoxia and Consequences*. Ann NY Acad Sci 1177: 2-8
- Semenza GL. 2010. *HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism*. Curr Opin Genet Dev 20:51-56.
- Slamon DJ Clark GM Wong SG et al. 1987. *Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene*. Science 235:177-182.
- Solaini G Baracca A Lenaz G et al. 2010. *Hypoxia and mitochondrial oxidative metabolism*. Biochim Biophys Acta 1797:1171-1177
- Smith TA. 2000. *Mammalian hexokinases and their abnormal expression in cancer*. Br J Biomed Sci 57:170-178
- Subramanian J Simon R. 2010. *What should physicians look for in evaluating prognostic gene-expression signatures?* Nat Rev Clin Oncol 7:327-334.
- Szeliga M Obara-Michlewska M. 2009. *Glutamine in neoplastic cells: Focus on the expression and roles of glutaminases*. Neurochem Int 55:71-75
- Szutowicz A Kwiatkowski J Angielski S. 1979. *Lipogenetic and glycolytic enzyme activities in carcinoma and nonmalignant diseases of the human breast*. Br J Cancer 39:681-687.
- ter Kuile BH Westerhoff HV. 2001. *Transcriptome meets metabolome: hierarchical and metabolic regulation of the glycolytic pathway*. FEBS Lett 500:169-171.
- Tse GM Niu Y Shi HJ. 2010. *Phyllodes tumor of the breast: an update*. Breast Cancer 17:29-34
- van 't Veer LJ Bernards R. 2008. *Enabling personalized cancer medicine through analysis of gene-expression patterns*. Nature 452:564-570.
- van 't Veer LJ Dai H van de Vijver MJ et al. 2002. *Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer*. Nature 415:530-536.
- Vaupel P Höckel M Mayer A. 2007. *Detection and characterization of tumor hypoxia using pO2 histography*. Antioxid Redox Signal 8:1221-1235.
- Vaupel P Kallinowski F Okunieff P. 1989. *Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review*. Cancer Res 1:6449-6465.
- Vaupel P Mayer A Briest S et al. 2003. *Oxygenation Gain Factor : A Novel Parameter Characterizing the Association between Hemoglobin Level and the Oxygenation Status of Breast Cancers*. Cancer Res 63:7634-7637
- Vogel CL Cobleigh MA Tripathy D et al. 2002. *Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer*. J Clin Oncol 20:719-726.
- Vogelstein B Kinzler KW. 2004. *Cancer genes and the pathways they control*. Nat Med 10:789-799.
- Warburg O. 1959. *On Respiratory Impairment in Cancer Cells*. Science 124: 267-272
- Wilson JE. 2003. *Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function*. J Exp Biol 206:2049-2057.
- World Health Organization. *Cancer*. [en línea] <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>> [consulta: 4 abril 2011]

Yerushalmi R Woods R Ravdin PM *et al.* 2010. *Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential.* *Lancet Oncol* 11:174–183.

Zeichner I Candelaria M. 2006. *Cáncer de Mama: Un Problema de Salud.* *Cancerología* 1:143-145.

Zhong H De Marzo AM Laughner E *et al.* 1999. *Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases.* *Cancer Res* 59:5830-5835

Zu XL Guppy M. 2004. *Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction.* *Biochem Biophys Res Commun*13:459-465.

## Multi-Biomarker Pattern for Tumor Identification and Prognosis

Sara Rodríguez-Enríquez,<sup>1,2\*</sup> Silvia Cecilia Pacheco-Velázquez,<sup>1</sup> Juan Carlos Gallardo-Pérez,<sup>1</sup> Alvaro Marín-Hernández,<sup>1</sup> José Luis Aguilar-Ponce,<sup>2</sup> Erika Ruiz-García,<sup>2</sup> Lutz Maria Ruiz-Godoy-Rivera,<sup>3,4</sup> Abelardo Meneses-García,<sup>3,4</sup> and Rafael Moreno-Sánchez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, Instituto Nacional de Cardiología, Tlalpan, México

<sup>2</sup>Laboratory of Translational Medicine, Instituto Nacional de Cancerología, Tlalpan, México

<sup>3</sup>Department of Tumor Bank, Instituto Nacional de Cancerología, Tlalpan, México

### ABSTRACT

In last decades, the basic, clinical, and translational research efforts have been directed to the identification of standard biomarkers associated with the degree of malignancy. There is an increasingly public health concern for earlier detection of cancer development at stages in which successful treatments can be achieved. To meet this urgent clinical demand, early stage cancer biomarkers supported by reliable and robust experimental data that can be readily applied in the clinical practice, are required. In the current standard practice, when one or two of the canonical proliferating index biomarkers are analyzed, contradictory results are frequently reached leading to inaccurate cancer diagnosis and unsuccessful therapies. Therefore, the identification of other cellular characteristics or signatures present in the tumor cells either alone or in combination with the well-established proliferation markers emerge as an alternative strategy in the improvement of cancer diagnosis and treatment. Because it is well known that several pathways and processes are altered in tumor cells, the concept of "single marker" in cancer results inaccurate. Therefore, this review aims to analyze and discuss the proposal that the molecular profile of different genes or proteins in different altered tumor pathways must be established to provide a better global clinical pattern for cancer detection and prognosis. *J. Cell. Biochem.* 113: 2703–2715, 2011. © 2011 Wiley-Liss, Inc.

**KEY WORDS:** METABOLIC BIOMARKERS; BIOMARKER PATTERNS; HIF-1 $\alpha$ ; GLYCOLYTIC GENES

In cancer cells, the uncontrolled growth, apoptotic resistance, and stimulated anabolism are characteristics associated with the accentuated changes in their genetic, histology, and metabolic profiles. Cancer onset and development derives primarily from the accumulation of many genetic alterations which have functional consequences.

In this regard, it has been described that the tumor altered metabolism is a consequence of a permanent interaction between some activated and/or mutated oncogenes and/or tumor suppressor

with genes of metabolic and signaling enzymes [DeBerardinis et al., 2009; DeBerardinis et al., 2008; Markowitz and Bertagnolli, 2009]. In particular, tumor metabolism is reprogrammed to sustain tumor survival when oxygen and essential metabolic supplies become limited. Although all tumors undergo this metabolic reprogramming, the degree of response toward specific insults will depend on the individual properties of each tumor, that is, increased or decreased expression level of specific oncogenes and other transcription factors, activation or inactivation of a particular

**Abbreviations:** Ang-2, angiotensin-2; EGFR, epidermal growth factor receptor; ER, estrogen receptor; GAT64, glyceraldehyde phosphate dehydrogenase; G6PDH, glucose-6-phosphate dehydrogenase; Hs- $\alpha$ 2, human estrogen receptor-2; HIF, hypoxia-inducible factor; HSS, Histological Score System; IGF-2, insulin growth factor-2; IL, immunohistochemistry; LDH, lactate dehydrogenase; MCA, metabolic cluster analysis; NSCLC, non-small cell lung cancer; Oxphos, oxidative phosphorylation; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; PKK, pyruvate kinase; TKL, metalloproteinase; TSS, tyrosine kinases; VEGF, vascular endothelial growth factor.

Contract sponsor: CONACYT-Mexico; Grant numbers: 302143, 30534, 173616; Grant sponsor: INCMN-Mexico; Grant number: 010/04/0056.

\*Correspondence to: Dr. Sara Rodríguez-Enríquez, PhD, Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, Juan Badiano No. 1, Cal. Ecuador 16, Tlalpan, México D.F., 14060, México. E-mail: saren69104@hotmail.com

Received 1 June 2011; Accepted 5 June 2011 • DOI 10.1002/jcb.22704 • © 2011 Wiley-Liss, Inc.

Published online 15 June 2011 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

2703