



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES PARA DIAGNÓSTICO DE
CÁNCER DE MAMA POR TÉCNICAS DE INMUNODETECCIÓN

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

ANA FONSECA PONCE

ASESORA:

DRA. NORA ANDREA GUTIERRÉZ NÁJERA

COASESORA:

DRA. SANDRA DÍAZ BARRIGA ARCEO

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2014



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ASUNTO: **VOTO APROBATORIO**

M. en C. JORGE ALFREDO CUELLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis**

Identificación de biomarcadores para diagnóstico de cáncer de mama por técnica de inmunodetección

Que presenta la pasante: **Ana Fonseca Ponce**

Con número de cuenta: **405008694** para obtener el Título de: **Química Farmacéutica Bióloga**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 22 de Mayo de 2014.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Sandra Díaz Barriga Arco	
VOCAL	QFB. Rosalbu Bonilla Sánchez	
SECRETARIO	M. en C. Tais Nopal Guerrero	
1er. SUPLENTE	QFB. Sara Hernández Matilde	
2do. SUPLENTE	QFB. Alejandro Gutiérrez García	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

HMI/sac

RECONOCIMIENTOS:

1. Este trabajo de investigación se realizó en el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), Periférico Sur No. 4809, Col. Arenal Tepepan, Delegación Tlalpan. México, D.F. C.P. 14610, Tel. +52 (55) 5350-1900, Fax 5350-1999, en el departamento de proteómica.

2. Dentro del INMEGEN se contó con el apoyo de :
 - a. Dra. Nora Andrea Gutiérrez Nájera, dirección y asesoramiento de tesis.

 - b. Dra. Isabel Ruiz. , T.S.U. Robín A. Ruiz Z., Biol. Exp Karla G. Calderón. , Q.F.B. Maribel Rodríguez , realización del análisis de Espectrometría de masas.

3. Dentro de la unidad de microarreglos del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, se contó con el apoyo de:
 - a. Dr. Jorge Ramírez S, Lorena Chávez G., Simón Guzmán L. y José Luis Santillán T., por la asistencia técnica en la realización de la lectura y análisis de imágenes de microarreglos de anticuerpos.

AGRADECIMIENTOS:

A mis padres, Emma y Juventino, por la vida, felicidad, alegría, valores, comodidad, visión, amor, ejemplo, paciencia, motivación, ambición y todo lo demás que no se puede expresar con palabras.

A la Dra. Nora A. Gutiérrez N, por su paciencia, ejemplo, valor, calidad, ayuda, perseverancia, comprensión y alegría.

A mi hijo, Dante Israel por enseñarme a evitar los prejuicios, un nuevo mundo, una nueva visión, una gran felicidad y nuevos sentimientos.

A mis amigos y amigas, por su compañía, apoyo, comprensión, motivación y virtudes.

A mis compañeros, por su ejemplo, ayuda y comprensión.

A mis profesores, por sus valores, conocimientos, paciencia, ayuda, ejemplo y humanismo.

A mis mascotas, por ser tan comprensivas, buenas compañeras, leales, fieles, pacientes, alegres, cariñosas y peludas.

ÍNDICE:

1. GLOSARIO	1
2. RESUMEN	7
3. MARCO TEÓRICO	8
3.1. Anatomía y Morfología de las glándulas mamarias.	8
3.2. Historia natural del cáncer de mama.	12
3.3. Clasificación del cáncer de mama.	16
3.3.1. Clasificación TNM.	16
3.3.2. Etapas.	17
3.3.3. Tipos.	18
3.3.4. Receptores a estrógeno.	20
3.3.5. El receptor del factor de crecimiento epidérmico humano Her-2.	22
3.4. Epidemiología.	22
3.4.1. Datos estadísticos.	23
3.4.2. Factores de riesgo y prevención.	25
3.5. Cáncer de mama en el hombre.	27
3.6. Diagnóstico.	28
3.6.1. Signos y síntomas.	29
3.7. Tratamiento.	29
3.7.1. Cirugía.	30
3.7.2. Terapia de radiación.	30
3.7.3. Terapia hormonal.	31
3.7.4. Quimioterapia.	31
3.8. Biomarcadores en cáncer.	32
3.9. El papel de p53 en el cáncer de mama.	32
3.9.1. p53 como supresor de tumor.	33
3.10. La proteómica y la búsqueda de nuevos biomarcadores de cáncer de mama..	36

4. HIPÓTESIS.	40
5. OBJETIVOS.	40
6. DIAGRAMA GENERAL DEL PROCEDIMIENTO.	41
7. MATERIALES Y MÉTODOS.	42
7.1. Colecta de muestras de pacientes con cáncer y enfermedades benignas de la mama...	42
7.2. Obtención de suero a partir de sangre.	42
7.3. Precipitación de la proteína con acetona.	42
7.4. Fraccionamiento de las proteínas del suero.	42
7.5. Cuantificación de proteínas.	43
7.6. Electroforesis en gel de poliacrilamida dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE).	43
7.7. Tinción de los geles con Azul de Coomassie.	44
7.8. Tinción con plata de geles de poliacrilamida.	44
7.9. Identificación de proteínas por espectrometría de masas.	45
7.10. Análisis de datos derivados de la espectrometría de masas.	45
7.11. Estudios de las proteínas del suero con microarreglos de anticuerpos.	45
8. RESULTADOS.	48
8.1. Análisis de proteínas de diferentes fracciones por electroforesis.	48
8.2. Identificación de bandas de sueros de pacientes con cáncer de mama por espectrometría de masas.	57
8.3. Preparación de las muestras de proteína de suero para el microarreglo de anticuerpos.	59
8.4. Estudio de las proteínas de suero con el microarreglo Panorama p53 de las proteínas de la vía p53 en muestras de enfermedad benigna y cáncer de mama.	59
9. DISCUSIÓN.	63
10. CONCLUSIONES.	68
11. PERSPECTIVA.	68
12. BIBLIOGRAFÍA.	69
13. CIBERGRAFÍA.	71
14. APÉNDICE.	72

1. GLOSARIO

ABLACIÓN OVÁRICA: Cirugía, radioterapia o tratamiento con medicamentos que detienen el funcionamiento de los ovarios. También se llama supresión ovárica.

ALBÚMINA: Es una de las principales proteínas que se encuentra en gran cantidad en el plasma sanguíneo. El hígado es el encargado de sintetizarla y es la más abundante en el hombre.

ANGIOGÉNESIS: Formación de vasos sanguíneos. La angiogénesis tumoral es el crecimiento de vasos sanguíneos nuevos que los tumores necesitan para crecer. Esto ocurre porque el tumor descarga productos químicos a las células huésped cerca del tumor.

APOPTOSIS: Tipo de muerte celular en la que una serie de procesos moleculares en la célula conducen a su muerte. Este es un proceso en el que el cuerpo se deshace de células innecesarias o anormales. El proceso de apoptosis se puede bloquear en las células cancerosas. También se llama muerte celular programada.

AUTOFAGIA: Proceso normal mediante el cual una célula destruye proteínas y otras sustancias en su citoplasma (el líquido que está dentro de la membrana celular, pero fuera del núcleo), que pueden producir la muerte celular. La autofagia puede prevenir que las células normales se vuelvan cancerosas, pero también puede proteger a las células cancerosas al destruir los medicamentos anticancerosos o las sustancias que estos toman.

BSA: Albúmina de suero de bovino.

BRCA 1 y BRCA 2: Abreviatura del inglés Breast Cancer gene 1 y 2.

BRCA1: Gen en el cromosoma 17 que, por lo general, ayuda a suprimir el crecimiento de las células. Una persona que hereda ciertas mutaciones (cambios) en un gen BRCA1 tiene un riesgo mayor de contraer cáncer de mama, de ovario, de próstata y de otros tipos de cáncer.

BRCA2: Gen en el cromosoma 13 que, por lo general, ayuda a suprimir el crecimiento de las células. Una persona que hereda ciertas mutaciones (cambios) en un gen BRCA2

tiene un riesgo mayor de contraer cáncer de mama, de ovario, de próstata y de otros tipos de cáncer.

BIOMARCADOR: Los biomarcadores son biomoléculas que sirven como indicadores de procesos biológicos y patológicos, o como indicadores fisiológicos y de respuestas farmacológicas.

BIOMARCADORES DE CÁNCER/ (MARCADOR TUMORAL): Molécula, proceso o sustancia que es alterada cuantitativamente o cualitativamente en condiciones precancerosas o cancerosas, la alteración puede ser detectable por un ensayo

BIOPSIA: Extracción de tejido de un organismo vivo para examen microscópico con fines diagnósticos.

CÁNCER: Enfermedad caracterizada por el crecimiento anormalmente rápido de las células las cuales van perdiendo sus funciones originales, al tumor maligno en general que se caracteriza por pérdida en el control de crecimiento, desarrollo y multiplicación celular con capacidad de producir metástasis.

CÁNCER INVASOR: Tumor que se diseminó más allá de la capa de tejido en la cual comenzó y crece en los tejidos sanos que lo rodean.

CÁNCER DE MAMA HEREDITARIO: Es la condición transmitida genéticamente que incrementa el riesgo de cáncer de mama.

CARCINOMA: Término que se refiere a una neoplasia epitelial maligna.

CARCINOMA *IN SITU* DE LA MAMA: Tumor maligno confinado al epitelio que recubre un conducto o un lobulillo sin rebasar la membrana basal.

cm: Centímetros.

COMEDO: Tipo de carcinoma ductal *in situ* (estadio muy temprano del cáncer de mama).

CRIBIFORME: Perforado con orificios pequeños como en un colador. Se refiere a la apariencia de un tumor cuando se observa bajo un microscopio. El tumor parece tener espacios abiertos u orificios pequeños en su interior.

CROMOSOMAS: Se denomina así a los cuerpos que contiene el material genético, los cuales se encuentran en el núcleo de la célula, siendo visibles durante la meiosis y la mitosis.

DISECCIÓN AXILAR: Es la resección de la zona linfoportadora ya sea total o parcial con fines de estadificación.

DR5: Proteína de la superficie de ciertas células que se une a otra proteína que se llama TRAIL, que puede destruir células cancerosas. Un aumento de la cantidad o actividad del DR5 en las células cancerosas puede destruir más células. También se llama miembro 10B de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral, receptor de muerte 5, receptor TRAIL 2, y TRAIL-R2.

ELECTROFORESIS: Se llama así a un método que permite separar moléculas, como proteínas o fragmentos de DNA, en una mezcla de moléculas similares. Se pasa una corriente eléctrica por la suspensión y cada molécula se mueve por el medio a velocidades diferentes dependiendo de su tamaño y carga eléctrica.

ESCIRRO: Especie de cáncer que consiste en un tumor duro de superficie desigual al tacto y que se produce principalmente en las glándulas. Variedad de cáncer con abundante tejido conjuntivo muy duro y de evolución lenta.

ESTADIFICACIÓN: Describe la extensión o gravedad del cáncer que aqueja a una persona. El conocer el estadio (o etapa) de la enfermedad ayuda al médico a hacer un plan del tratamiento y a calcular el pronóstico de la persona.

FACTOR DE RIESGO: Es la característica o circunstancia personal, ambiental o social de los individuos o grupos, asociada con un aumento de la probabilidad de ocurrencia de un daño.

FIBRINÓGENO: Es una proteína soluble del plasma sanguíneo y precursora de la fibrina durante la coagulación.

g: Gramos.

GANGLIO: Es la estructura diferenciada que se encuentra rodeada por una cápsula de tejido conjuntivo y algunas fibras elásticas que forma parte de las cadenas del sistema linfático.

HER-2: Abreviatura en inglés (Human Epidermal Growth Receptor) para el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2, gen o proteína provenientes de dicho gen. A la proteína también se le conoce como HER2/neu o c-erbB-2.

Hiperplasia: Aumento anormal del número normal de células en un órgano o tejido.

IMC: Índice de masa corporal.

INEGI: Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática.

LOCUS: Se le conoce así a la posición fija, que ocupa un determinado gen en un cromosoma.

LUMPECTOMÍA: Cirugía para extirpar un tumor (masa) de la mama y una pequeña cantidad del tejido sano que rodea el tumor. Es un tipo de cirugía para preservar la mama.

MASTECTOMÍA: Es la resección de tejido mamario con fines terapéuticos que acorde a su extensión y elementos se clasifica en:

MASTECTOMÍA SUBCUTÁNEA: Es la resección del tejido mamario, dejando el pezón y la areola en su sitio.

MASTECTOMÍA TOTAL (SIMPLE): Es la resección de todo el tejido mamario, incluidos el pezón y la areola sin la resección de ganglios axilares.

MASTECTOMÍA RADICAL: Es la resección total del tejido mamario con o sin músculos pectorales y la disección axilar completa.

MASTOGRAFÍA O MAMOGRAFÍA: Es el estudio radiológico de las mamas, tomado con un aparato (mastógrafo) diseñado especialmente para este fin.

mg: Miligramos.

mm: Milímetros.

MTBP: La proteína de unión MDM2 (MTBP) a través de su interacción con p53, juega un papel importante en la regulación de G (1) punto de control del ciclo celular.

NEOPLASIA: Es la formación de tejido nuevo de carácter tumoral.

NÓDULO: Es la agrupación celular o fibrosa en forma de nudo o corpúsculo, identificable por exploración clínica o imagen en dos planos en estudio mastográfico.

NOM: Norma Oficial Mexicana

NULIGESTA: Es la condición de la mujer que nunca se ha embarazado.

NULÍPARA: Es la condición de la mujer que no ha parido.

OMS: Organización Mundial de la Salud

ONCOGÉN: Este es un gen activado o anormal que procede de la mutación de un gen normal que se le denomina protooncogen. Estos oncogenes son los responsables del desarrollo de algún tipo de cáncer.

ONCOLOGÍA: Es la rama de la medicina que estudia los tumores benignos y malignos, con especial atención a los malignos.

P53: Proteína proveniente del gen p53, la proteína codificada es de 53 KDa, de ahí su nombre. Es un factor de transcripción cuyo gen está localizado en el brazo corto del cromosoma 17.

PBS: Abreviatura en inglés (Phosphate Buffer Saline) amortiguador salino de fosfatos.

PERP: es una proteína de membrana de plasma, y de manera importante, su expresión causa la muerte celular en los fibroblastos. Juega un papel en la integridad del epitelio estratificado, en la adhesión célula-célula y como un efector de la ruta apoptótica dependiente de TP53.

PSA: Persulfato de amonio.

PROTEOMA: Se llama así a la totalidad de las proteínas codificadas por un genoma. Por ejemplo, proteoma humano es el conjunto de la totalidad de las proteínas que codifica el genoma humano.

PROTEÓMICA: Es la ciencia y tecnología de separación e identificación de proteínas de muestras biológicas crudas.

PUMA: Modulador de apoptosis sobre regulado por p53.

SDS: Abreviatura en inglés (Sodium Dodecyl Sulfate) dodecil sulfato de sodio.

SENECENCIA: La senescencia celular es el proceso iniciado como respuesta al estrés y daño ocurrido en una célula, y constituye una ruta alternativa de respuesta a la muerte celular programada y es de vital importancia para suprimir la formación de células cancerígenas

SUERO: El suero es la porción del fluido corporal que se separa de la sangre en la coagulación.

TAC: Tomografía Axial Computarizada.

TASA DE MORBILIDAD: Es la razón que tiene como numerador el número de enfermos en una población determinada durante un periodo y lugar específico y el denominador representa la población donde ocurrieron los casos. Se expresa como una tasa, puede ser general o específica.

TASA DE MORTALIDAD: Es la razón que tiene como numerador el total de defunciones producidas en una población en un periodo de tiempo determinado y el denominador representa la población donde ocurrieron las muertes. Se expresa como una tasa, puede ser general o específica.

TILECTOMÍA O TUMORECTOMÍA: Es una cirugía para extraer un cáncer de mama u otro tumor en la mama, junto con algo de tejido mamario circundante. Es la escisión del tumor directamente del sitio de localización.

TEMED: Abreviatura en inglés (tetramethylenediamine) tetrametiletildiamina.

TNM: Sistema de estadificación del cáncer, traducido del inglés como: Tumor, Ganglio, Metástasis.

TRIS: tris (hidroximetil) aminometano.

V: volts.

2. RESUMEN

El cáncer de mama en los últimos años ha causado muchas muertes en nuestro país, la utilización de técnicas proteómicas busca ayudar en la detección temprana de cáncer de mama con métodos menos agresivos en comparación con los tradicionales. El objetivo de este trabajo fue el de estudiar muestras de pacientes con cáncer de mama comparándolas con las de pacientes con enfermedad benigna de la mama por medio de 2 aproximaciones proteómicas, 1) la electroforesis y la espectrometría de masas y 2) microarreglos de anticuerpos. Con las técnicas proteómicas utilizadas se pudo identificar diferencias notables en pacientes con cáncer de mama comparadas con las pacientes con enfermedades benignas. Por electroforesis en gel se observó un patrón de bandas en las pacientes con cáncer de mama que no aparecían en muestras de pacientes control. Estas bandas las analizamos posteriormente con espectrometría de masas y encontramos 3 diferentes proteínas: Inhibidor de la proteasa de plasma C1, Haptoglobina y Serotransferrina, que están relacionadas con, la coagulación sanguínea, la ruta del complemento, la fibrinólisis, la hemostasia, inmunidad, inmunidad innata, transporte, transporte de iones y transporte de hierro.

En tanto que con los microarreglos encontramos diferencias en las proteínas, Bcl-2, Cdc25A, HSP90, P53 fosforilado (pSer392) y el antígeno nuclear de proliferación celular, que están relacionadas con la apoptosis, el ciclo celular, mitosis, respuesta al estrés y replicación de DNA, entre otras, lo que nos sugiere que pueden ser una buena opción para el diagnóstico oportuno de cáncer de mama.

3. MARCO TEÓRICO

Mundialmente, el cáncer es una de las principales causas de mortalidad. Este flagelo es resultado de la interacción de factores genéticos y externos (físicos, químicos y biológicos) que produce la degeneración de las células, con lo que se originan lesiones precancerosas y finalmente tumores malignos.^a

A pesar de que la sobrevida ha aumentado en las pacientes con cáncer de mama, debido a los programas de detección precoz y las nuevas estrategias terapéuticas, muchos casos todavía se están perdiendo debido a las recaídas metastásicas. Por esta razón, los nuevos enfoques, tales como las técnicas de proteómica se han convertido actualmente en los objetivos principales de las investigaciones del cáncer de mama (Dusek, *et al.*, 2012). La aplicación de las técnicas basadas en proteómica también se consideran cruciales si queremos desarrollar una aproximación en el estudio de un sistema biológico para el descubrimiento de biomarcadores en el diagnóstico temprano, pronóstico y predicción de los resultados de los tratamientos de cáncer de mama.

El cáncer de mama es una enfermedad compleja que puede tener un carácter invasivo y resistente por numerosos cambios moleculares que producen la proliferación celular y la inestabilidad genética (Baskın y Yiğitbaşı, 2010).

Como es el caso para todas las formas de cáncer, suero y plasma son las fuentes de biomarcadores preferidas en los estudios de cáncer de mama debido a que presentan una respuesta activa a los procesos fisiológicos y patológicos del cuerpo humano. Estos son una rica fuente de información de proteínas. En este tipo de muestras además de las proteínas secretadas por el tumor, también se cuenta con las proteínas procedentes del tejido normal y de plasma que son destruidas por proteasas específicas del tumor. A pesar de la dificultad que surge de esta compleja estructura, los métodos de toma de muestras y la facilidad en repetir el ensayo hace que sea muy adecuado para la búsqueda de biomarcadores de cáncer de mama (Baskın y Yiğitbaşı, 2010).

3.1. Anatomía y Morfología de las glándulas mamarias

Las glándulas mamarias están presentes en ambos sexos. En el hombre se mantienen sin ser funcionales toda la vida, en cambio en la mujer durante la pubertad, empieza el

proceso de maduración. El máximo desarrollo de estas glándulas se produce durante el embarazo y especialmente en el período posterior al parto, durante la lactancia. ^b

Las mamas están situadas en la parte anterior del tórax y pueden extenderse en medida variable por su cara lateral. Su forma varía según características personales, genéticas y en la misma mujer de acuerdo a la edad y paridad. La mayor parte de la masa de la mama está constituida por tejido glandular y adiposo. Durante el embarazo y la lactancia el tamaño de la mama aumenta debido al crecimiento del tejido glandular.

La base de la glándula mamaria se extiende, en la mayoría de los casos, desde la segunda hasta la sexta costilla, desde el borde externo del esternón hasta la línea axilar media. ^b (Figura 1)

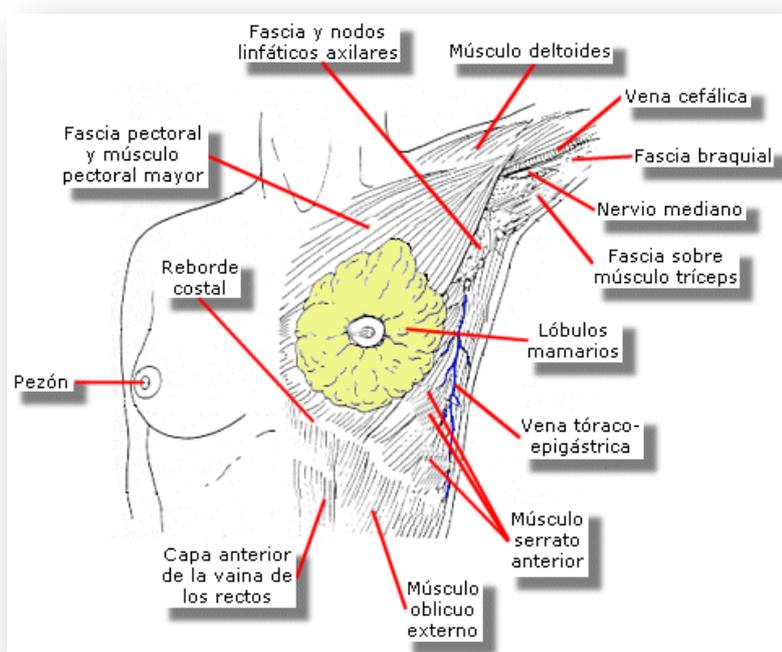


Figura 1. Anatomía de la mama y su localización. <http://www.upch.edu.pe/>. Fecha de consulta: 23/12/2013.

La cara superficial de la mama está cubierta por piel. Aproximadamente en el centro de esta cara se encuentra el pezón que está en relación al cuarto espacio intercostal en la nulípara. La base del pezón está rodeada por una zona de piel hiperpigmentada de 2.5 cm. denominada areola. El pezón contiene numerosas fibras musculares lisas, en su mayoría de tipo circular, las que se contraen al estimularlo mecánicamente, originando la erección del pezón. La areola posee numerosas glándulas sebáceas, entre ellas es

posible reconocer algunas que durante el embarazo y la lactancia determinan levantamientos de la piel de la areola, denominadas glándulas de Montgomery, éstas contiene estructuras histológicas similares a la parte glandular de la mama y producen una secreción grasa que lubrica el pezón y la areola. Bajo la areola se ubican las dilataciones de los conductos galactóforos llamadas senos lactíferos, que acumulan leche y el niño debe exprimir al mamar. ^b (Figura 2)

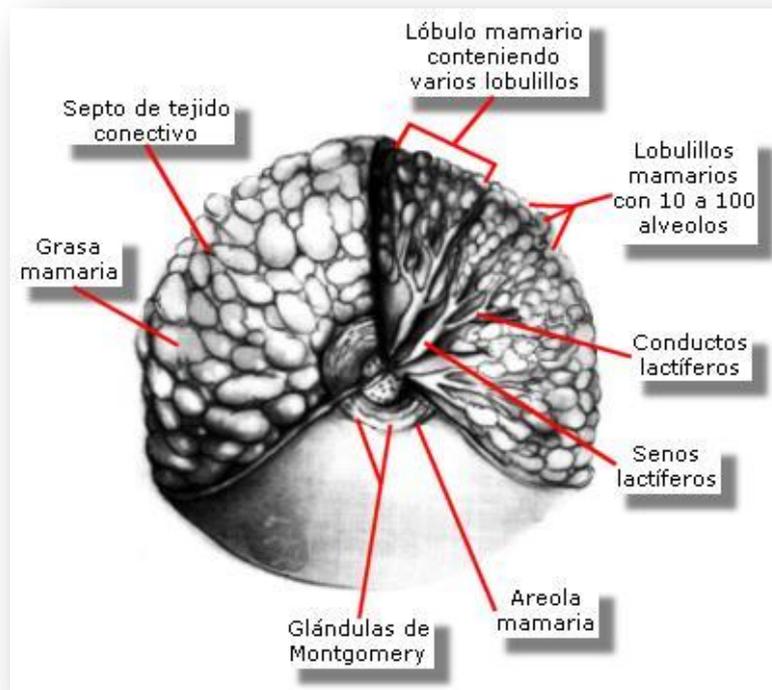


Figura 2. Estructura de la mama <http://www.upch.edu.pe/> .Fecha de consulta: 23/12/2013.

La glándula mamaria está formada por tres tipos de tejidos: glandular de tipo túbulo-alveolar, conjuntivo que conecta los lóbulos, y adiposo que ocupa los espacios interlobulares. El tejido celular subcutáneo rodea la glándula sin que exista una cápsula claramente definida, desde éste se dirigen hacia el interior numerosos tabiques de tejido conectivo. Estos tabiques constituyen los ligamentos suspensorios de la mama o ligamentos de Cooper. ^b (Figura 3)

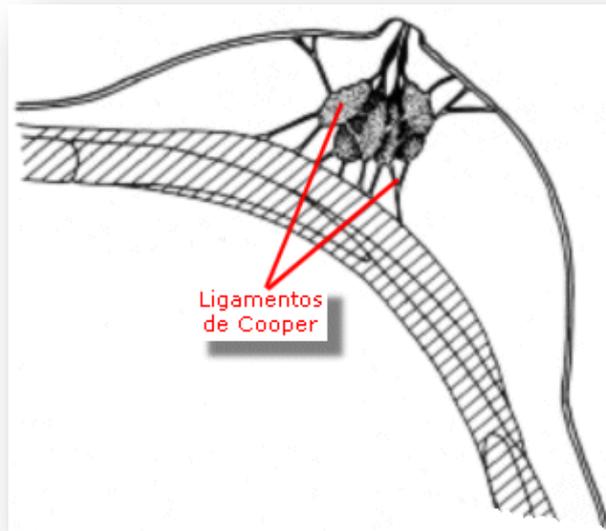


Figura 3. Ligamentos de Cooper <http://www.upch.edu.pe/>. Fecha de consulta: 23/12/2013.

Un conjunto de quince a veinte lóbulos mamarios conforman la glándula mamaria, cada uno con su aparato excretor, que se abre en el pezón por medio de un conducto lactífero. Los lóbulos mamarios están constituidos por numerosos lobulillos que se encuentran unidos entre sí por tejido conectivo, vasos sanguíneos y por su sistema excretor, los conductos lactíferos.^b

La estructura de la glándula mamaria varía con la edad y es influenciada por el embarazo y la lactancia. Antes de la pubertad, la mama posee unos pocos conductos rudimentarios cubiertos en su interior por epitelio plano y envuelto en tejido conectivo. Después de la pubertad, debido a la influencia de las hormonas ováricas, especialmente los estrógenos, los conductos se comienzan a ramificar y en sus extremos se forman pequeñas masas sólidas, esféricas, de células poliédricas, que constituirán los alveolos. Durante el estado de reposo, el epitelio glandular está separado del estroma vascularizado vecino por una fina zona de fibroblastos, a través de los cuales no penetran vasos.^b

Los alveolos activos sólo aparecen durante el embarazo, período en el cual, los conductos se ramifican y en su parte terminal se forma un lumen que aumenta de

tamaño a medida que se va cargando de secreción. Simultáneamente aumenta la cantidad de tejido adiposo y la irrigación de la mama. En las últimas semanas del embarazo la secreción adquiere características especiales y se denomina calostro. Algunos días después del parto aparece la verdadera secreción láctea, la que distiende los alveolos que en ese momento están tapizados por una sola capa de células cilíndricas bajas. A medida que aumenta la cantidad de secreción, las células se aplanan, desapareciendo los espacios intercelulares o desmosomas. Después de la menopausia la glándula mamaria se atrofia y los elementos celulares de los alveolos y conductos degeneran, y disminuyen en número.^b

3.2. Historia natural del cáncer de mama

El cáncer comprende un grupo de enfermedades caracterizadas por proliferación autónoma de células neoplásicas que tienen varias alteraciones, incluyendo mutaciones e inestabilidad genética. Las funciones celulares son controladas por proteínas codificadas por DNA que está organizado en genes y los estudios moleculares han mostrado que el cáncer es el paradigma de una enfermedad genética adquirida. El proceso de producción de las proteínas involucra una serie de eventos, cada uno de éstos con sus respectivas enzimas, las cuales también son codificadas por DNA y reguladas por otras proteínas. La mayoría de estos eventos pueden verse afectados y eventualmente desencadenar una alteración en la cantidad o estructura proteica, que a su vez afecte la función celular. Sin embargo, mientras que la función celular puede ser alterada por disturbios de un gen, la transformación maligna requiere que ocurran dos o más anomalías en la misma célula. Si bien, existen mecanismos responsables del mantenimiento y la reparación de DNA, su estructura básica y el orden de sus bases de nucleótidos puede mutar. Estas mutaciones pueden heredarse u ocurrir de manera esporádica y pueden presentarse en todas las células o sólo en las células tumorales. A nivel de los nucleótidos, estas mutaciones pueden ser sustituciones, adiciones o deleciones.^c

El cáncer se desarrolla a partir de la acumulación y selección sucesiva de alteraciones genéticas y epigenéticas, que permiten a las células sobrevivir, replicarse y evadir mecanismos reguladores de apoptosis, proliferación y del ciclo celular.^c

El cáncer es un desorden que resulta de cambios genéticos en la célula por mutaciones adquiridas a través del tiempo en múltiples genes o por mutaciones en genes clave que predisponen a cánceres específicos.^c

La actividad angiogénica promueve la expansión rápida de las células tumorales e incrementa el riesgo de metástasis.^c (Figura 4)

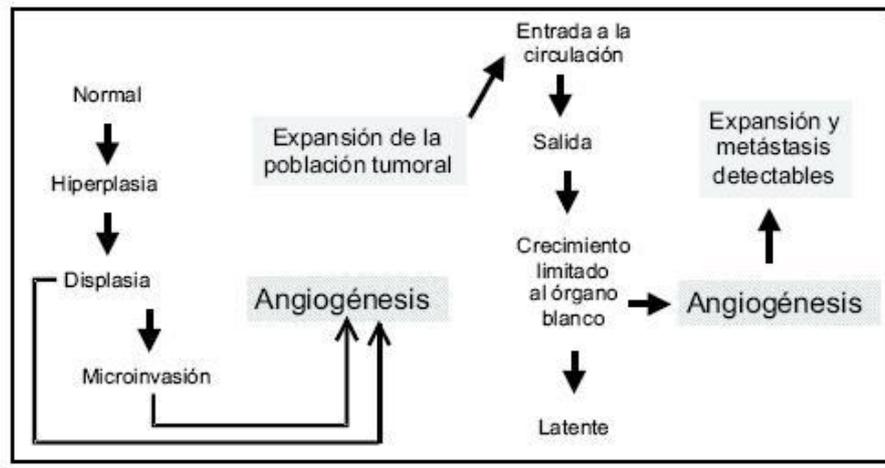


Figura 4: Modelo del papel de la angiogénesis en el desarrollo de metástasis.

<http://www.scielo.org.mx/>. Fecha de consulta: 23/12/2013.

El cáncer de mama dentro de sus características biológicas tiene:

- a) Variación en su comportamiento en diferentes pacientes.
- b) Rango de crecimiento relativamente bajo, comparado con otros tipos de tumores.^d

Algunos cánceres de mama duplican su tamaño en pocos días, mientras a otros les toma más de 2000 días. Asumiendo el crecimiento algorítmico preclínico de una masa celular en la mama, el tiempo de duplicación puede requerir de 8 a 10 años para que el tumor pueda ser palpado.^d (Figura 5)

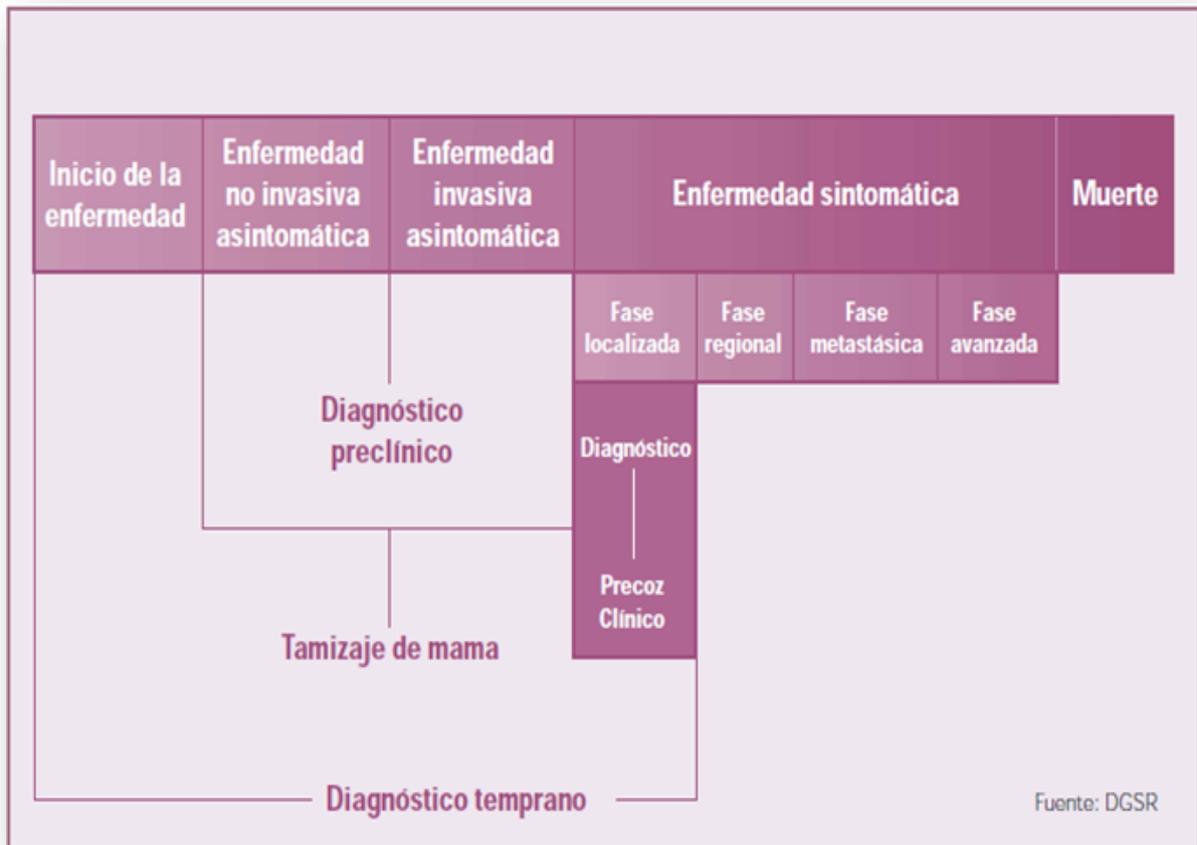


Figura 6. Evolución del cáncer de mama en el paciente y su relación con el diagnóstico de la enfermedad.

<http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/documentos/DOCSAL7205.pdf>. Fecha de consulta: 08/01/2014.

Los términos diagnóstico preclínico y diagnóstico temprano no son sinónimos. El diagnóstico preclínico es el reconocimiento de la existencia de una neoplasia, aun antes de presentar cualquier síntoma. El diagnóstico temprano se refiere a la observación o palpación de algún tumor, mismo que puede estar en estado avanzado de cancerización, por tal motivo puede ser un tumor que en sentido biológico ya es viejo.^d

El cáncer se inicia como una enfermedad localizada. A una “etapa no invasiva”, le sigue una “invasiva”; al principio es “asintomática” y después “sintomática”. Esta última se divide en otras fases: fase localizada, regional y metastásica.^d

Las ventajas del diagnóstico preclínico y/o temprano pueden ser resumidas de la siguiente manera:

- Menor extensión local de la neoplasia
- Menor agresión al organismo por la terapéutica
- Disminución en la incidencia de recidivas
- Menor probabilidad de secuelas
- Reducción del efecto mutilante
- Disminución de complicaciones relacionadas con el tratamiento.
- Moderada frecuencia de metástasis en ganglios linfáticos.
- Menos posibilidades de metástasis a distancia.
- Que puede detectarse un carcinoma antiguo, aún antes de dar manifestaciones clínicas.^d

El diagnóstico preclínico del carcinoma se realiza mediante una prueba de tamizaje por medio del estudio radiológico llamado mastografía, que es capaz de revelar la enfermedad desde el comienzo. El tamizaje o pesquisa es un programa organizado con objetivos específicos, con métodos estándar, dirigido a una población determinada.^d

Se ha demostrado que los métodos de pesquisa son beneficiosos para el diagnóstico temprano del cáncer de la mama, disminuyendo la frecuencia de éste en etapas avanzadas; es evidente que disminuye el costo económico, psicológico y social cuando se trata la enfermedad en etapa temprana. Existen reportes en países como Suecia y Canadá, donde la mortalidad se ha reducido hasta en un 30%, utilizando el método de tamizaje.^d

3.3. Clasificación del cáncer de mama

3.3.1. Clasificación TNM

El sistema de clasificación TNM es usado como un estándar alrededor del mundo.

T, describe el sitio y el tamaño del tumor principal (primario)

T1 = hasta 2cm

T2= de 2.1 cm a 5 cm

T3= mayor a 5 cm

T4= cualquier tamaño pero el tumor está fijo / adherido a cualquier músculo en el pecho, rompe a través de la piel de la mama, ambos, o hay enrojecimiento / inflamación de los senos.

N, describe la afectación de los ganglios linfáticos

N0 = sin ganglios linfáticos axilares con cáncer

N1 = 1 - 3 ganglios linfáticos axilares con cáncer

N2 = 4 a 9 ganglios linfáticos axilares con cáncer

N3 = 10 o más ganglios linfáticos axilares con cáncer, u otros ganglios linfáticos cercanos tienen cáncer.

M, se refiere a si el cáncer se ha extendido en otras partes del cuerpo (presencia o ausencia de metástasis a distancia).

M0= no hay propagación del cáncer más allá del seno o los ganglios linfáticos

M1 = propagación del cáncer.^e

3.3.2. Etapas

Etapa 0. A menudo el tumor no es invasivo y es pequeño. Descubierta por mamografía antes de que una masa se pueda sentir. Cáncer ductal o *in situ* (pre / no invasivo) o lobular

Etapa I. El tumor es menor o igual a 2 cm. de diámetro y no se ha diseminado a los ganglios linfáticos axilares o en otro lugar (T1N0)

Etapa II. El tumor mide más de 2 cm pero no más de 5 cm de diámetro y / o afecta a los ganglios linfáticos axilares. (T2N0, T1N1, T2N1)

Etapa III. El tumor mide más de 2 cm pero no más de 5 cm de diámetro y / o afecta los ganglios linfáticos axilares. (T2N0, T1N1, T2N1)

Etapa IV. El cáncer de mama se ha extendido más allá de la mama y de los ganglios linfáticos de la zona a otra zona del cuerpo (por ejemplo hueso o hígado). (M1).^e

3.3.3. Tipos

Las protuberancias de la mama se dividen en condiciones malignas o no malignas (benignas). Los tumores malignos son no-invasivos (en un punto, llamado "*in situ*") o invasivos (invade la grasa alrededor de los conductos y los lobulillos del seno). Es muy raro que los cánceres *in situ* se extiendan fuera de la mama. Los cánceres invasivos pueden propagarse a los ganglios linfáticos y otras áreas del cuerpo. Casi todos los cánceres malignos de mama se llaman adenocarcinomas, lo que significa que estos cánceres son de las partes glandulares de la mama. Dependiendo de la parte glandular de la mama en donde el cáncer comienza (determinado por observación con el microscopio), se les llama carcinoma ductal (75%), carcinoma lobular (15%), y medular, tubular, escirro o de otros tipos menos comunes.^e

a) Carcinoma ductal *in situ* (DCIS)

Las células de la mama están continuamente expuestas a los cambios en los niveles de hormonas, que a veces hacen que las células dentro de los conductos lactíferos se multipliquen. Esta multiplicación de células resulta en una condición llamada hiperplasia intraductal. Si las células comienzan a verse anormales, esto se llama "hiperplasia con atipia". Las células adicionales pueden obstruir el conducto y comienzan a parecerse a las células cancerosas. Si eso ocurre, el diagnóstico se convierte en carcinoma ductal *in situ* (DCIS).

En el DCIS, las células cancerosas están confinadas a los conductos lactíferos. DCIS se considera una condición pre-cancerosa. Mientras que las células permanezcan en el interior del conducto, DCIS no es invasiva. Si las células cancerosas crecen fuera de los conductos dentro del tejido circundante del seno, entonces se convierte en un cáncer invasivo. DCIS se toma en serio, pero es tratable y altamente curable.

Esta condición no es usualmente encontrada en un examen físico. DCIS es más frecuentemente detectada por mamografía si los conductos obstruidos empiezan a acumular depósitos de calcio.

Diferentes tipos o patrones de crecimiento de carcinoma ductal *in situ* (DCIS) son reconocibles bajo el microscopio. Los patólogos pueden dar los nombres descriptivos adicionales de DCIS en función de la forma en que aparecen bajo el microscopio, como 'papilar, "cribiforme" y "comedo".^e

b) Carcinoma lobular *in situ* (LCIS)

LCIS, como DCIS, son condiciones no invasivas con excepción de que el exceso de células crece en los lóbulos de la mama. El LCIS es un marcador para un futuro cáncer de mama. Si LCIS es encontrado, significa que el cáncer de mama puede desarrollarse en el futuro en cualquiera de los senos, no justo donde el carcinoma lobular *in situ* se ha encontrado. LCIS se produce con menos frecuencia que el DCIS.

LCIS se considera un factor de riesgo para el cáncer de mama en el futuro. Si la cantidad de LCIS es pequeña, puede no significar un riesgo mucho mayor de cáncer de mama invasivo en la mujer promedio. Para las mujeres con gran cantidad de carcinoma lobular *in situ*, el riesgo es más alto que el promedio.

LCIS no se muestra de forma fiable en la mamografía o una ecografía. Se encuentra a menudo cuando otro bulto o anomalía mamográfica está siendo investigado por biopsia.^e

Si LCIS es encontrado, el objetivo de cualquier tratamiento será prevenir el cáncer de mama que pudiera ocurrir y detectar cualquier cáncer en vías de desarrollo lo antes posible. Las opciones para los pacientes incluyen:

- Exámenes de detección y seguimiento regulares.
- Tamoxifeno, lo que puede disminuir el riesgo de enfermedad invasiva en aproximadamente 50%.
- La extirpación de ambos senos, se llama mastectomía profiláctica. Esta es una opción extrema y sólo rara vez es recomendable.^e

c) Carcinoma ductal y lobular invasivo

Estos son los tipos más comunes de cáncer de mama. Cáncer de mama invasivo significa que las células cancerosas en los conductos o lobulillos del seno se han roto a

través de las paredes de estas estructuras e invadió las células circundantes. Si aparenta haber comenzado en los conductos, esto es llamado "carcinoma ductal" y "carcinoma lobular" cuando comenzó en los lobulillos.^e

d) Otros tipos invasores de cáncer de mama

Otros tipos microscópicos de cáncer de mama de mucho menor incidencia, también pueden ocurrir, por ejemplo medular, tubular, escirro y tumores phylloides.^e

e) Carcinoma inflamatorio de mama.

Este tipo de cáncer se presenta como una inflamación (enrojecimiento, hinchazón) de la piel sobre el tumor. Este tipo especial de cáncer de mama es de rápido crecimiento (agresivo) tipo adenocarcinoma el cual es muy raro.^e

f) Enfermedad de Paget.

Este tipo de cáncer comienza pareciendo una enfermedad de la piel, como dermatitis o enrojecimiento o escamas en el pezón, que puede confundirse con eccema. La dermatitis se debe a que las células cancerosas invaden la piel. El tumor original no se puede sentir en el examen, y frecuentemente está por debajo del pezón. Esta es una rara forma de cáncer.^e

3.3.4. Receptores a estrógeno(ER).

Según la literatura existente se sabe que los tumores malignos de mama son positivos para receptores hormonales en un 60%, lo cual se relaciona con tumores mejor diferenciados y de menor agresividad relativa.

Estos tumores con altas concentraciones de receptores estrogénicos son de mejor evolución que tumores pobres o negativos de tales receptores.^f

Los receptores de hormonas son proteínas (ubicadas dentro y sobre las células mamarias) que reciben las señales hormonales que ordenan a las células multiplicarse.

Si el cáncer posee receptores de estrógeno, se denomina receptor de estrógeno positivo (o ER+). Esto quiere decir que las células cancerígenas, al igual que las células mamarias normales, pueden recibir señales del estrógeno que estimulan su crecimiento.

Aproximadamente dos de cada tres casos de cáncer de mama poseen receptores de hormonas positivos. ⁸

Los estrógenos controlan el crecimiento y la diferenciación de las glándulas mamarias y regulan la expresión génica en células de la mama a través del receptor de estrógeno (ER). ER se expresa en el 70% de los casos de cáncer de mama donde se controla el crecimiento de las células cancerosas por los estrógenos y es a menudo susceptible al tratamiento con inhibidores que bloquean la interacción entre el estrógeno y los receptores de estrógenos (Alquobaili, *et al.*,2010).

El estado del receptor de estrógeno en el cáncer de mama juega un papel importante en el potencial metastásico y progresión del cáncer de mama en las mujeres. Las células de cáncer de mama que carecen de (ER-) son por lo general más avanzadas y más difíciles de tratar que las células del cáncer de mama (ER+). Una disparidad en la supervivencia del carcinoma de mama entre casos (ER-) y (ER+) se ha observado en las últimas décadas. Las mujeres (ER-) tienen cáncer de mama más avanzado en el momento del diagnóstico que las mujeres (ER+). Además, las mujeres (ER-) tienden a tener tipos de tumores de cáncer de mama que son más agresivos y tienen peor pronóstico. Mujeres con células cancerosas de mama (ER-), independientemente de su edad, son más propensas a tener tumores de grado III o IV que de un menor grado I y II (Alquobaili, *et al.*,2010).

Los estudios epidemiológicos han encontrado una correlación significativa entre (ER +) en las células de cáncer de mama y varios factores de riesgo de estilo de vida, tales como un mayor índice de masa corporal, la edad más temprana de la menarquía, nuliparidad y la dieta (Alquobaili, *et al.*,2010).

3.3.5. El receptor del factor de crecimiento epidérmico humano Her-2.

Un regulador de crecimiento celular en cáncer de mama es el factor de crecimiento epidérmico humano el receptor HER-2. Un bloqueo de HER-2 en modelos preclínicos de cáncer de mama en humanos y en tumores primarios de mama en mujeres tratadas con terapias dirigidas a HER-2 inhiben vías de supervivencia tumoral, que a su vez induce la apoptosis de células tumorales (Camerini, *et al.*,2011).

Normalmente, HER2/neu, el gen que produce la proteína HER-2(Wu y Grainger,2006), también llamada receptor HER-2 (Suzuki y Matsubara,2011) produce el número correcto de receptores HER-2 para lograr un crecimiento de la célula mamaria normal.^h Pero en el 25% de los casos de cáncer de mama, el gen HER-2 no funciona correctamente y hace muchas copias de sí mismo (lo cual se conoce como amplificación del gen HER2). Esto hace que las células mamarias crezcan y se dividan de manera incontrolable.ⁱ

Los casos de cáncer de mama con amplificación del gen HER-2 o sobreexpresión de la proteína HER-2 se denominan HER-2 positivos en el informe patológico. Los casos de cáncer de mama de receptores HER-2 positivos tienden a crecer más rápido y es más probable que se extiendan y se vuelvan a formar, en comparación con los casos de cáncer de mama HER2 negativos. Existen medicamentos específicos para los casos de cáncer de mama de receptores HER2 positivos.ⁱ

3.4. Epidemiología

El cáncer de mama es una de las patologías asociadas al envejecimiento, al retraso en el inicio de la vida reproductiva y a los estilos de vida; además, representa un problema de salud pública, debido al incremento gradual y sostenido de dicha enfermedad, así como al costo de su tratamiento.^j Según la OMS, a nivel mundial, el cáncer de mama afecta al 16% de la población femenina que padeció algún tipo de cáncer.^k

3.4.1. Datos estadísticos

En 2008 se estimaron 184,450 nuevos casos de cáncer de mama en Estados Unidos de América y durante el mismo año, se estimó que alrededor de 41,000 mujeres murieron por cáncer de mama. El tipo más común de cáncer de mama es el carcinoma ductal infiltrante, también llamado carcinoma ductal invasivo (CDI) el cual cuenta aproximadamente con el 80% de los casos de cáncer de mama (Hawthorn, *et al.*,2010).

En el caso particular de México, a partir del año 2006, el carcinoma mamario se convirtió en la primera causa de muerte por cáncer en mujeres. Según datos del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), en 2009 ocurrieron 4,964 decesos atribuibles al cáncer de mama, lo que representó el 2% del total de defunciones ocurridas en mujeres. Esto significa que en ese último año murieron por cáncer de mama casi 14 mujeres cada día (NOM-041-SSA2-2011).

En este sentido, resulta importante conocer la magnitud de este padecimiento entre la población femenina; por ejemplo, la mayor incidencia se presenta en el Distrito Federal (45.84), seguida por Sinaloa (45.76) y San Luis Potosí (45.20), en contraparte, la incidencia más baja se observa en el Estado de México (4.62), Chiapas (4.24) y Tlaxcala (2.96). ^a(Figura 7)

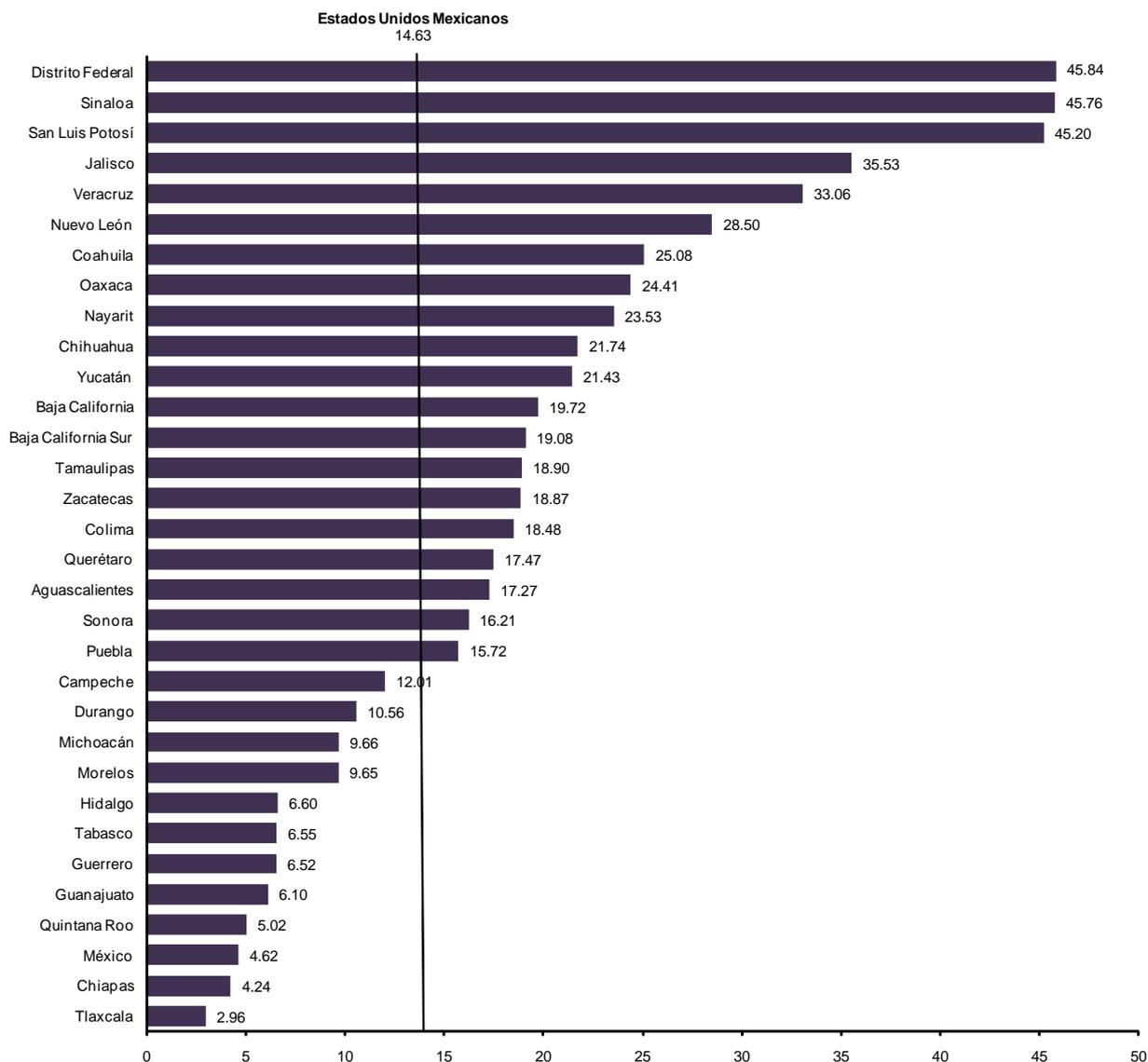


Figura 7. Incidencia de tumores malignos de mama en población femenina por entidad federativa reportada por cada 100 mil mujeres de 15 años y más (2008).

<http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/contenidos/estadisticas/2011/cancer11.asp?s=inegi&c=2780&ep=50>. Fecha de consulta: 23/12/2013.

3.4.2. Factores de riesgo y prevención

Según la NOM-041-SSA2-2011, los factores de riesgo de desarrollo del cáncer de mama se distinguen en cuatro grandes grupos:

- Biológicos,
- Iatrogénicos o ambientales,
- Historia reproductiva,
- Estilos de vida (NOM-041-SSA2-2011).

Los primeros no son modificables; los segundos escapan al control de la población, los del tercer grupo se asocian a beneficios en la salud reproductiva mayores que las posibles desventajas, y los del cuarto grupo son modificables y se enfocan a promover las conductas favorables a la salud que disminuyan el riesgo de desarrollar cáncer de mama. Es importante mencionar que en el 70% de las mujeres con cáncer de mama, no se logra identificar un factor de riesgo conocido (NOM-041-SSA2-2011).

La mayoría de los estudios encontraron que el ejercicio, la reducción del peso, la dieta baja en grasas y una menor ingesta de alcohol se asociaron con un menor riesgo de cáncer de mama. El Tamoxifeno y el raloxifeno redujeron el riesgo de cáncer de mama invasivo receptor de estrógeno positivo y del cáncer de mama invasivo en general. La detección de riesgo de cáncer de mama en todas las mujeres posmenopáusicas se debe realizar mediante el uso de factores de riesgo y la densidad mamaria. La quimioprevención se considera para las que se encuentran en situación de alto riesgo. Para estos casos también se recomienda cambios de estilo de vida para prevenir el cáncer de mama (Cummings, *et al.*,2009).

Entre los factores de riesgo que se deben considerar están:

- Ser mujer.
- El riesgo aumenta con la edad - el riesgo de cáncer de mama se duplica entre las edades de 45 y 65.
- Un diagnóstico previo de cáncer de mama aumenta el riesgo de cánceres de mama adicionales.
- Antecedentes familiares de cáncer de mama, especialmente el cáncer de mama en la madre, hermana o hija aumenta el riesgo de la mujer.
- Si el pariente consanguíneo (madre, hermana o hija) era post-menopáusica cuando se tiene cáncer de mama, el riesgo de la mujer es dos veces mayor que el riesgo promedio.
- Si ese familiar era pre-menopáusica y tenía cáncer de mama diagnosticado en un seno, el riesgo de la mujer es de tres a cinco veces mayor que el riesgo para la población femenina general.

Si el pariente consanguíneo era pre-menopáusica y tenían diagnóstico de cáncer en ambos senos, el riesgo es nueve veces mayor que el riesgo para la población femenina general.^e

- Los defectos o mutaciones en ciertos genes que se transmiten a los hijos pueden aumentar el riesgo de cáncer de mama. Hombres y mujeres con mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 tienen un riesgo muy alto de por vida de desarrollar cáncer de mama. Sin embargo, probablemente menos del 5% de las mujeres con cáncer de mama tienen mutaciones de estos genes. Descendientes femeninos en Europa de los Judíos (Ashkenazi) tienen una probabilidad más alta que el promedio de tener una mutación del gen BRCA. Otras mutaciones genéticas raras también puede aumentar el riesgo de cáncer de mama.
- Las mujeres con una historia familiar de cáncer de cuello uterino, útero o colon tienen un riesgo ligeramente aumentado.

La duración de la exposición a los estrógenos en las mujeres es un factor de riesgo en el cáncer de mama. Los niveles de estrógeno en las mujeres aumentan después de entrar en la pubertad y disminuye después de la menopausia y durante el embarazo.

- El consumo de alcohol está asociado de manera consistente con un mayor riesgo de cáncer de mama.
- Tener sobrepeso (índice de masa corporal mayor de 25) u obesidad (IMC superior a 30) aumenta el riesgo de cáncer de mama en mujeres post-menopáusicas. Esto es

probablemente debido a que las células de grasa producen estrógeno, por lo que el exceso de peso después de la menopausia aumenta los niveles de estrógeno del cuerpo. La grasa corporal extra puede ocultar un tumor y retrasar el descubrimiento de un cáncer de mama.

- Radiación en el pecho (por ejemplo, por un cáncer en la infancia) puede provocar un cáncer de mama después. ^e

Las medidas que ayudan a la prevención son las siguientes:

- El peso de una mujer que es un peso corporal saludable con un IMC (índice de masa corporal) de 18,5 a 24,9 tiene un riesgo menor de cáncer.
- La dieta y nutrición, el comer una dieta con muchas frutas y verduras parece ser importante en la prevención del cáncer en general. Las dietas que incluyen soya parecen tener un factor de protección pequeña en la prevención de cáncer de mama.
- Es conveniente limitar el número de bebidas alcohólicas.
- El ejercicio regular reduce el riesgo de cáncer de mama.
- Mastectomía profiláctica/ooforectomía.
- El Tamoxifeno y los inhibidores de aromataasa (terapia hormonal) como prevención. ^e

3.5. Cáncer de mama en el hombre

El cáncer de mama es una enfermedad poco frecuente en los hombres, lo que representa menos del 1% de todas las neoplasias malignas y es responsable de 0,1% de las muertes por cáncer en los varones. A pesar de su prevalencia poco frecuente, el cáncer de mama en el hombre puede causar morbilidad y mortalidad significativas. De hecho, tiene un comportamiento clínico más agresivo en comparación con el cáncer de mama de la mujer (Liu, *et al.*,2009).

La ginecomastia es la anormalidad clínica más común y patológica de la mama masculina. Es el resultado de la hipertrofia del tejido mamario. Numerosas condiciones se han asociado con ginecomastia, pero las bases fisiopatológicas son debido a un desequilibrio de las hormonas sexuales y la respuesta de los tejidos a ellas (Liu, *et al.*,2009).En México se diagnostican cada año menos de 100, representando el 0.7% de los casos de cáncer de mama, con una relación femenino-masculino de 144 mujeres por cada hombre (NOM-041-SSA2-2011).

El cáncer de mama masculino es muy similar al cáncer de mama en la mujer, y se les trata esencialmente de la misma manera como los cánceres de mama de la mujer.

Las principales diferencias entre el cáncer de mama en hombres y cáncer de mama femenino son:

- Los tipos de cáncer de mama en los hombres son más frecuentemente diagnosticados en etapas más avanzadas de la enfermedad (metástasis) que los cánceres de mama femenina, probablemente debido a que los hombres ignoran grumos en el tejido mamario. También puede haber una falta de conciencia de que bultos en los senos en los hombres pueden ser cancerosos.
- Un mayor porcentaje de los hombres que las mujeres tienen receptores de estrógeno positivo (ER +) en cáncer de mama.^e

3.6. Diagnóstico

La prevención es una parte importante en el diagnóstico de cáncer de mama, generalmente la misma paciente lo detecta, pero ya en etapas avanzadas, por eso la importancia de promover la autoexploración y los exámenes clínicos de diagnóstico en una etapa más temprana.

Se cuenta con 3 diferentes tipos de detección:

- Autoexploración, para el diagnóstico temprano.
- Examen clínico, para el diagnóstico temprano.
- Mastografía, para la identificación en fase preclínica (NOM-041-SSA2-2011).

Existen varios estudios auxiliares de diagnóstico, los cuales se pueden realizar en diferentes etapas. Tabla 1.

Tabla 1. Estudios auxiliares de diagnóstico.(basada en ^d)

Estudios auxiliares de diagnóstico
Mastografía. <ul style="list-style-type: none">• Mastografía con estereotaxia.
Ultrasonido.
Radiología.
Biopsia. <ul style="list-style-type: none">• Biopsia por aspiración con aguja fina (BAAF).• Biopsia con aguja de Tru-cut.• Biopsia incisional.• Biopsia excisional.• Toma de muestra del pezón.

3.6.1 Signos y síntomas

- El pezón comienza a sumirse.
- Hay hoyuelos o arrugas en la piel de la mama.
- Hay un cambio en el contorno (forma) de sus senos.
- Tiene secreción del pezón con sangre o acuosa.
- Enrojecimiento, inflamación o descamación del pezón.
- El pecho se pone rojo, hinchado o caliente.
- Un bulto debajo del brazo/de la axila. ^e

3.7. Tratamiento

Las terapias para el cáncer pueden ser altamente individualizadas por lo cual pueden diferir con lo a continuación descrito. Los cánceres de mama son tratados con cirugía, radiación, quimioterapia o terapia hormonal. Casi siempre se trata de una combinación de éstos lo que se ofrece, dependiendo de la situación individual. La elección del tratamiento depende de: tipo, tamaño y localización del cáncer de mama, la edad y la salud del paciente; conocida o posible difusión a los ganglios linfáticos de la axila o en otras partes del cuerpo, el estado del receptor de estrógeno y/o progesterona del tumor,

y HER2; y finalmente la preferencia del médico y del paciente.

Para el cáncer de mama en fase inicial que se contiene en el pecho y / o en los ganglios linfáticos de la axila, la cirugía es el componente más importante y suele ser el primer tratamiento.

La necesidad de la radiación, la quimioterapia y / o terapia hormonal generalmente se decide en base a la información que se encuentra bajo el microscopio, después de examinar el cáncer removido. Para los cánceres de mama que ya se han propagado a partes distantes del cuerpo, la cirugía puede no ser siempre parte del tratamiento. ^e

3.7.1. Cirugía

La cirugía para el cáncer de mama invasivo incluye la extirpación del tumor de la mama y el examen de algunos de los ganglios linfáticos de la axila para determinar si el cáncer se ha diseminado. La Cirugía de la mama puede ser una lumpectomía o mastectomía. La cirugía óptima de cáncer de mama '*in situ*' no requiere de muestreo de los ganglios linfáticos de la axila, ya que este tipo de enfermedad rara vez se propaga fuera de la mama. La Cirugía de los ganglios axilares puede ser una "biopsia del ganglio centinela" o una "disección axilar", y a veces ambos son necesarios. ^e

3.7.2 Terapia de radiación.

Este tratamiento está diseñado para detener el crecimiento de las células cancerosas al intentar preservar el tejido normal. La terapia de radiación se utiliza en diversas circunstancias:

Después de una lumpectomía (mastectomía segmental), se reduce en gran medida el riesgo de que el cáncer vuelva a crecer en ese seno. Se usa después de una mastectomía total, si los médicos piensan que existe un alto riesgo de rebrote de cáncer en la pared torácica. Esto sucede cuando hay cánceres grandes, o si hay muchos nodos linfáticos positivos encontrados durante la cirugía.

3.7.3 Terapia Hormonal

Se ha encontrado que el crecimiento de los cánceres de mama ER + y PR + puede ser detenido en:

- Mujeres post-menopáusicas al interferir con los bajos niveles de estrógeno que existen.
- Las mujeres pre-menopáusicas impidiendo que los ovarios trabajen, o por el uso de medicamentos anti-estrógeno.

Las terapias hormonales se utilizan casi siempre una vez que los tratamientos iniciales se han acabado. Comúnmente son utilizados los inhibidores de aromatasas anastrozol (Arimidex ®), o exemestano (Aromasin ®) o letrozole (Femara ®). En las mujeres pre menopáusicas cuyos ovarios siguen trabajando, el Tamoxifeno es la opción preferida, pero a veces se utiliza la ablación ovárica.

3.7.4 Quimioterapia

La quimioterapia es el uso de medicamentos para eliminar las células cancerosas. La quimioterapia puede administrarse en forma de comprimidos o inyecciones. La quimioterapia se utiliza tanto en mujeres pre y posmenopáusicas. Muchos medicamentos han demostrado ser eficaces en el tratamiento de cáncer de mama.

En general, la quimioterapia se utiliza en dos situaciones. Para eliminar las células cancerosas que aún puedan quedar después de la cirugía y / o radioterapia, cuando el cáncer parece estar confinado a la mama y / o a los ganglios linfáticos debajo del brazo. A esto se llama terapia adyuvante.

Si el cáncer aparece en otra parte del cuerpo, o regresa después de que el tratamiento ha terminado (recurrente), entonces un tratamiento que pueda ir por todo el cuerpo es necesario (sistémico). El cáncer de mama recurrente en este momento es tratable, pero no curable. La situación de cada paciente es diferente. La elección de cuándo comenzar la quimioterapia, los medicamentos a utilizar y qué efectos secundarios esperar, tiene que ser discutido entre el paciente y su médico. ^e Hay muchos tipos diferentes de medicamentos, cada uno con sus propias acciones y efectos secundarios. ^e

3.8. Biomarcadores en cáncer

Un biomarcador se define como "una característica que es medida objetivamente y evaluada como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patológicos, o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica" (Sahab, *et al.*,2007).

Un marcador ideal se espera que sea capaz de detectar una característica fundamental de una enfermedad específica, validado y confirmado por aquellos casos específicos de la enfermedad; preciso, capaz de detectar las primeras etapas de una enfermedad en específico y distinguir de otros casos de enfermedades similares o familiares (Sahab, *et al.*,2007).

Sólo un número limitado de marcadores tumorales para el cáncer de mama están disponibles actualmente. Los anticuerpos para las proteínas asociadas a tumor pueden formar parte de los marcadores tumorales para el cáncer de mama y se puede usar junto con un perfil de suero para aumentar la sensibilidad y la especificidad (Zhong, *et al.*,2008).

Actualmente se busca perfilar autoanticuerpos de suero lo cual es un enfoque prometedor para la detección y diagnóstico precoz de cáncer de mama. En lugar de un autoanticuerpo, un grupo de autoanticuerpos parece preferible para lograr una precisión superior (Zhong, *et al.*,2008).

En contraste con la detección de antígenos en suero, la detección de anticuerpos séricos contra antígenos tumorales puede proporcionar marcadores séricos fiables para el diagnóstico y el pronóstico del cáncer (Zhong, *et al.*,2008).

3.9. El papel de p53 en el cáncer de mama.

El gen p53 es llamado "guardián del genoma" y "portero celular". La proteína P53 actúa como un modulador celular por guiar muchas señales inductoras de estrés hacia diferentes respuestas celulares antiproliferativas. El gen supresor de tumor p53 puede activarse en respuesta al daño en el DNA (como en presencia de agentes citotóxicos), activación de oncogenes o por hipoxia resultado de caminos celulares tales como la

apoptosis, arresto del ciclo celular, vejez o modulación de la autofagia. Aunque un 50% de los casos de cáncer de mama hospedan mutaciones en TP53, su papel biológico y su importancia clínica de las alteraciones de p53 todavía no son claras. Más de 26000 datos de mutaciones somáticas de p53 aparecen en la agencia internacional para la investigación del cáncer (IARC), en la base de datos de TP53 versión R14 (Suzuki y Matsubara,2011).

A pesar de sus límites p53 ha demostrado en numerosos estudios ser un factor de pronóstico en cáncer de mama.(Wolf-Yadlin, *et al.*,2009). TP53, codifica a p53, el cual es uno de los más famosos genes supresores de tumores, también es uno de los genes mutados más frecuentemente en los canceres humanos, la mayoría de estos demuestran inactivación de la vía de p53. p53 mutado no solo ya no funciona como supresor de tumores, sino que pueden ejercer efectos promotores de tumor. La función básica de p53 es responder al estrés celular, por medio de la regulación del arresto del crecimiento y la apoptosis (Suzuki y Matsubara,2011).

La proteína P53 tiene amplia gama de funciones biológicas, incluyendo la regulación del ciclo celular, apoptosis, senescencia, el metabolismo del DNA, la angiogénesis, la diferenciación celular, la respuesta inmune, así como un papel en la transcripción, y en los procesos de modificaciones postranscripcionales y postraduccionales (Suzuki y Matsubara,2011).

3.9.1 p53 como supresor de tumor

a) p53 como un sensor de daño del DNA

La inestabilidad genética es una de las características más prominentes de los tumores malignos. Hay sistemas muy sofisticados para la detección de daños en el DNA y la reparación del genoma. p53 juega un papel importante en tales sistemas de "cuidador" en estos sistemas. Cuando p53 responde al daño del DNA, este provoca ya sea el arresto del ciclo celular o la apoptosis.

b) p 53 y la apoptosis

Numerosos reportes han descrito el mecanismo por el cual p53 induce la apoptosis a este respecto las funciones de p53 principalmente como un factor de transcripción, son importantes para explorar los genes regulados por p53 que contribuyen a la regulación

de la apoptosis. Los primeros estudios mostraron que p53 en su forma silvestre o nativo se puede unir a la región promotora del gen *bax* y regular la transcripción del gen *bax*. Bax es un miembro de la familia Bcl-2, que forma heterodímeros con Bcl-2, inhibiendo su actividad. La familia de proteínas Bcl-2 juega un papel importante en la apoptosis y el cáncer. Por ejemplo, Bcl-2 controla la liberación de citocromo c de la mitocondria, que activa la vía de apoptosis mediante la activación de la caspasa 9. Entonces la caspasa 9 activa a caspasa 3. Ambas caspasas juegan papeles clave en las vías apoptóticas. En el cáncer de mama, un estudio demostró que un bajo nivel de expresión de *bax* se asocia con un mal pronóstico, mientras que otros informes han demostrado que no hay correlación entre el nivel de expresión de *bax* y el pronóstico (Suzuki y Matsubara,2011).

CD95 (también llamado Fas y Apo-1) es un "receptor de muerte" lo cual indica la importancia de su rol en la apoptosis. Varios informes han indicado que la vía CD95 juega un papel importante en la apoptosis inducida por agentes citotóxicos, y que este sistema implica la activación de p53 de tipo nativo. Por lo tanto, el estado de p53 puede influir en la quimiosensibilidad a través de la señalización de CD95. Sin embargo, un informe reciente indica que CD95 podría promover el crecimiento tumoral. La muerte celular programada es muy complicada y depende de una variedad de factores (Suzuki y Matsubara,2011).

PUMA es también un mediador clave de la ruta apoptótica inducida por p53. PUMA puede jugar un papel fundamental en la determinación del destino celular (muerte celular programada vs arresto del ciclo celular) en respuesta a la activación de p53 (Suzuki y Matsubara,2011).

c) p53 y el arresto del ciclo celular

La proteína P53 suprime la formación de tumores no sólo por inducción de la apoptosis, sino también por causar que el ciclo celular se detenga. Dependiendo del tipo de estrés celular, p53 puede inducir que el ciclo celular se detenga en G1 a través de la activación de la transcripción de la ciclina dependiente de inhibidor de cinasa p21.

p53 regula también la transición G2 / M. Por ejemplo, p53 puede bloquear la entrada de células en mitosis por inhibición de la Cdc2. Cdc2 necesita unirse a ciclina B1 para poder funcionar. La represión de la ciclina B1 por p53 también arresta las células en G2. Sin embargo, la represión transitoria del ciclo celular no puede conducir a la

erradicación del tumor, porque una célula con potencial oncogénico puede reanudar la proliferación. Por lo tanto, otro mecanismo, la senescencia celular, pueden desempeñar un papel importante en la supresión tumoral mediada por p53. La senescencia celular es un arresto permanente del ciclo celular. Hay muchos informes respecto a la correlación entre el desarrollo del tumor, p53, y la senescencia. La proteína Ras oncogénica se expresa en células de humanos y roedores en la senescencia celular. Este proceso se debe a la acumulación de p53 y p16. La inactivación de p53 o p16 previene la senescencia inducida por *ras*. También se previene que las lesiones premalignas se conviertan en tumores malignos mediante la activación de los programas de la senescencia. La senescencia celular inducida por p53 es importante no sólo para la prevención del cáncer, sino también para considerar como una propuesta de tipo de terapéutico el efecto contra el cáncer que pudiera tener la inducción de p53 de tipo nativo introducido en tumores establecidos (Suzuki y Matsubara,2011).

Entre las diversas funciones de p53 la apoptosis y senescencia son los principales mecanismos responsables de su acción en la supresión tumoral. Sin embargo, precisar cómo es que p53 determina si ocurre o no la activación del programa de senescencia o del programa de la apoptosis todavía queda pendiente por esclarecer. Esta cuestión es especialmente importante para el desarrollo de la terapia del cáncer basada en p53, incluyendo enfoques en combinación con quimioterapia convencional. La mayoría de los agentes quimioterapéuticos convencionales logran la eliminación de las células cancerosas al matarlas. Por lo tanto, si p53 induce senescencia en lugar de la apoptosis, se presentará un conflicto. De hecho, se ha informado que algunos tipos de cáncer de mama están protegidos de agentes quimioterapéuticos citotóxicos por p53 endógeno. Por lo tanto, múltiples factores, tales como la calidad y la cantidad de estrés celular, el tipo de tejido, y el microambiente, determinará el destino de la célula. Vousden y Prives propusieron un modelo en el que la decisión entre la vida y la muerte puede ser determinada por la extensión del daño o la duración del estrés. En su modelo, un bajo nivel de estrés que puede ser reparado induce una respuesta de reparación / supervivencia del DNA, mientras que un alto nivel de estrés el cual no pueda ser reparado induce una respuesta de apoptosis o senescencia. Esta naturaleza dual de p53, asesino y protector, indica la posibilidad de que p53 puede actuar también como promotor de tumores. La función antiapoptótica de p53 puede conducir a la supervivencia de las células dañadas, que pueden aumentar la posibilidad de transformación maligna (Suzuki y Matsubara,2011). (Figura 8)

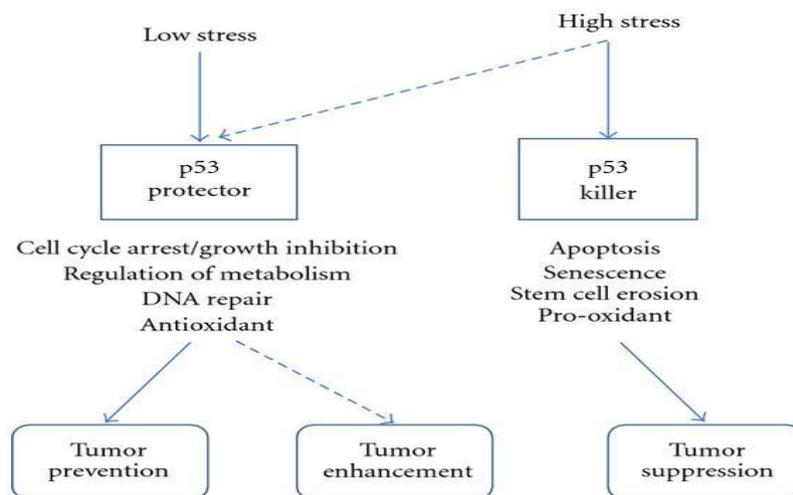


Figura 8. Función antiapoptótica de p53.

3.10. La proteómica y la búsqueda de nuevos biomarcadores de cáncer de mama.

Las células viables mantienen la integridad de membrana, la morfología del citoesqueleto y el estado de proliferación en base a cambios en la estructura y función de proteínas. La complejidad de la regulación de tantas biomoléculas diferentes va más allá del "dogma central" de la bioquímica, que implica que un gen codifica para una proteína. Esta complejidad de la regulación no sólo resulta del empalme variable del RNAm y de la transcripción del DNA, de tal manera que un gen puede producir muchos RNAm y secuencias de proteínas, sino también porque una secuencia de la proteína puede tener múltiples funciones como resultado de modificaciones covalentes después de la síntesis. Estas modificaciones post-traduccionales (PTMs) incluyen la fosforilación, metilación, glicosilación, acilación, oxidación y ubiquitinación (Jin y Zangar,2009).

La "proteómica" se refiere a los estudios relacionados con todas las actividades biológicas del proteoma (Yarmush y Jayaraman,2002). La proteómica es un grupo de tecnologías de rápido surgimiento que se han estado utilizando para la identificación de proteínas y así trazar sus interacciones en un contexto celular. Con la secuenciación del genoma humano, el alcance de aplicación de la proteómica se ha desplazado desde la identificación y caracterización de proteínas incluyendo la estructura de proteínas, hasta el estudio de la función y las interacciones proteína-proteína. Las tecnologías utilizadas

en la investigación proteómica incluyen la electroforesis bidimensional en gel, espectrometría de masas, búsqueda por la técnica de dos híbridos de la levadura y programas computacionales de predicción. Aunque algunas de estas tecnologías han estado en uso durante un largo tiempo, actualmente se aplican para estudiar la fisiología y los procesos celulares en formatos de alto rendimiento. Este enfoque de alto rendimiento es el que define y caracteriza la proteómica moderna (Yarmush y Jayaraman,2002).

Una cuestión que surge de la proteómica es descubrir nuevos marcadores biológicos que pueden ser aplicados a la detección temprana, el diagnóstico de enfermedades y predicción de la respuesta a la terapia . La proteómica ha avanzado perfilando directamente proteínas expresadas diferencialmente entre las muestras enfermas y muestras control, o en las diversas etapas de enfermedades bajo ambientes particulares , y así se ha convertido en una tecnología clave en el desarrollo de biomarcadores. El proceso para el descubrimiento de biomarcadores puede ser dividido en cuatro fases: descubrimiento, calificación, verificación y validación de las fases (Kang, *et al.*,2010).

El primer paso de un estudio proteómico requiere casi siempre la separación de proteínas mediante técnicas de electroforesis o cromatografía seguido de las etapas de identificación que se llevan a cabo mediante espectrometría de masas (Sahab,*et al.*,2007).

La espectroscopia de masas se ha utilizado en los últimos años para el análisis de muestras complejas de proteínas por la determinación de la relación masa / carga (m / z) y el número de iones para cada valor de m / z de una fase de gas presurizado de una mezcla de iones. Un espectrómetro de masas se compone de una fuente de ionización, un analizador de masas y un detector. En la bioquímica de proteínas dos técnicas de ionización se utilizan predominantemente: Ionización por desorción con láser asistida por matriz (Matrix-assisted laser desorption ionisation MALDI) para el análisis de estructuras de péptidos simples, y de ionización por electrospray (ESI) para las muestras más complejas (Baskın , Yiğitbaşı, 2010).

La proteómica es un campo activo y diverso que utiliza diferentes técnicas para caracterizar y cuantificar el contenido del proteoma, y para comprender la estructura y las interacciones del proteoma, modificaciones postraduccionales, y la función biológica. Los microarreglos se han utilizado para el estudio de los perfiles de expresión de proteínas, interacciones proteína-proteína, análisis de drogas, y para el diagnóstico de enfermedades tales como el cáncer, alergias alimentarias, y la infección por virus y bacterias patógenos. La mayoría de los microarreglos de proteínas utilizan la plataforma de microarreglos de captura los cuales capturan un ligando de proteína específico de una mezcla por un conjunto de proteínas inmovilizadas sobre un soporte sólido (Yarmush y Jayaraman,2002).

Los microarreglos de proteínas se pueden dividir en dos categorías generales: “microarreglos de función proteica” y “microarreglos de detección de proteínas” (Figura 9). Los microarreglos de función proteica (*protein function microarrays*) comprenden proteínas purificadas, dominios de proteínas, o péptidos, y se utilizan generalmente para estudiar el reconocimiento molecular o para separar los compañeros de interacción supuestos. Los microarreglos de detección de proteínas, por otra parte, dependen de los reactivos que reconocen las proteínas de una manera selectiva (por ejemplo, anticuerpos) y se utilizan para cuantificar la abundancia y los estados de modificación post-traduccionales de las proteínas en mezclas complejas (por ejemplo, lisados de células tumorales, biopsias, y suero) (Wolf-Yadlin, *et al.*,2009).

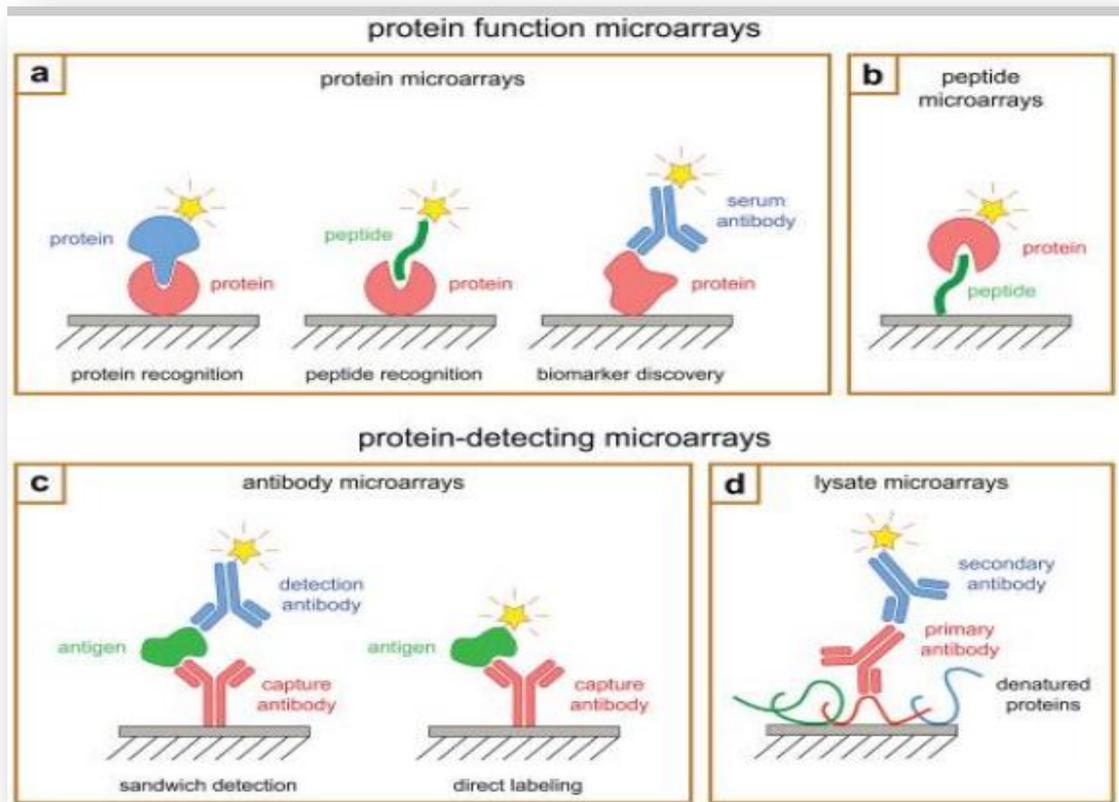


Figura 9. Clasificación de los microarreglos de proteínas (Wolf-Yadlin, et al.,2009).

4. HIPÓTESIS

Se espera que existan diferencias entre las proteínas contenidas en el suero sanguíneo de pacientes que presentan cáncer de mama canalicular, con respecto a pacientes que presentan casos benignos de alteraciones en mama.

5. OBJETIVOS

Objetivo principal:

Establecer un proceso para la búsqueda de proteínas en suero que se utilicen como biomarcadores para cáncer de mama canalicular a través de técnicas proteómicas

Objetivos particulares:

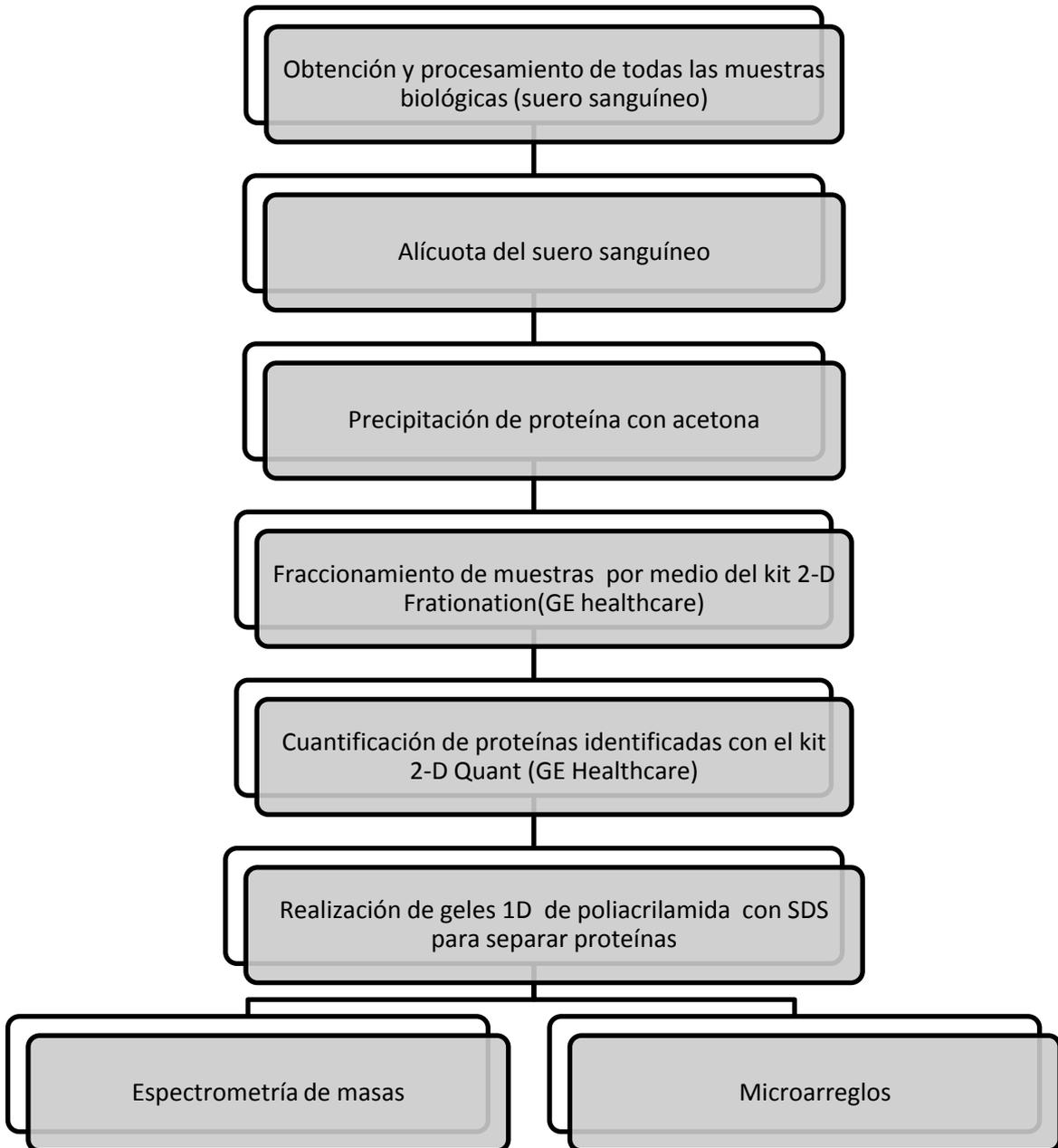
Determinar a través de técnicas proteómicas los cambios en los niveles de proteínas en suero sanguíneo de pacientes con cáncer de mama canalicular con respecto a casos de enfermedad benigna de la mama.

Identificar proteínas diferentes o abundantes al comparar ambos tipos de muestras de sueros por espectrometría de masas

Realizar un análisis a través de microarreglos de anticuerpos para la identificación de biomarcadores proteicos para cáncer de mama.

Inferir la relación de los cambios en los niveles de proteínas detectados por este estudio con los mecanismos moleculares asociados al cáncer.

6. DIAGRAMA GENERAL DEL PROCEDIMIENTO



7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Colecta de muestras de pacientes con cáncer y enfermedades benignas de la mama.

Las muestras fueron colectadas en el Instituto Nacional de Cancerología. Se obtuvo sangre periférica de 3 pacientes con diagnóstico de cáncer de mama canalicular y 3 con enfermedades benignas de la mama como el cambio fibroquístico. El estudio histopatológico mostró que los tumores de mama fueron ER(+), PR(+) y HER-2 (-/+). Todas las pacientes firmaron consentimiento informado.

7.2. Obtención de suero a partir de sangre.

La sangre se dejó coagular 30 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 600 xg para la separación del suero. El suero se almacenó en alícuotas de 100 µl a -80°C hasta su utilización.

7.3. Precipitación de la proteína con acetona.

Se enfrió una alícuota de acetona a -20°C al menos 15 minutos antes de usarse. El volumen de la alícuota fue aproximadamente de 2ml de acetona por cada muestra. El tubo que se utilizó en este protocolo fue de un material compatible con acetona. Se midió exactamente 100 µl de cada muestra de suero. Se agregaron 4 volúmenes de la acetona fría por 1 volumen de la muestra de suero.

Las proteínas se precipitaron a -20°C por 2 horas. Se centrifugan a 13000 xg durante 10 minutos a 4°C. Se decantó la acetona, sin tocar el precipitado. El precipitado se secó al aire (generalmente de 5-10 minutos a temperatura ambiente) no se dejó secar demasiado ya que es difícil resuspenderlo. Los precipitados se resuspendieron en un amortiguador apropiado y se guardaron a -80°C. Los niveles típicos de proteína recuperados de 15ml de muestra de suero es de 150-220mg.

7.4. Fraccionamiento de las proteínas del suero.

El fraccionamiento de proteínas se realizó con el paquete 2D fractionation (GE Healthcare). Antes de comenzar el fraccionamiento se transfirió el amortiguador de lavado del paquete (wash buffer) a -20 °C por 1 o 2 horas antes de usarse. Se aseguró de que no hubiera formación de cristales en el reactivo de fraccionamiento. Se preparó el amortiguador solubilizador como se indica en manual del fabricante. Se realizó el

procesamiento en varias fracciones (1-6) del componente soluble proteico de cada muestra de proteína de suero obtenida por el protocolo de precipitación con acetona. De acuerdo a las instrucciones del paquete de fraccionamiento se comenzó a partir de 2mg. de proteína de suero y se colectaron las distintas fracciones para cada muestra. Las fracciones se cuantificaron y se utilizaron para la electroforesis en gel.

7.5. Cuantificación de proteínas.

La cuantificación de proteínas se realizó con el paquete 2-D Quant (GE Healthcare) en microplaca, el cual se basa en la detección del cobre libre. Antes de comenzar el ensayo se preparó un volumen apropiado de reactivo de color mezclando 100 partes de reactivo de A con 1 parte de reactivo B. Cada ensayo requiere 150 µl de reactivo de color por pozo. Se preparó en la microplaca una curva estándar utilizando BSA 2 mg/ml, en un intervalo de 0-20 µg de proteína. Se colocaron 3 µl de la muestra a cuantificar. Entonces se añadió a cada pozo 75 µl de Precipitante (incluyendo los de la curva) y después se agregaron 75 µl de Co-precipitante a cada pozo. La microplaca se centrifugó a 5700 xg durante 20 minutos a 4°C. Se removió cuidadosamente el sobrenadante con una micropipeta.

Entonces se agregaron 15 µl de solución de cobre y 60 µl de agua destilada a cada pozo. Se resuspendieron los precipitados en un termomezclador durante 20 minutos a 500 rpm y 37 °C. Después de la incubación se agregaron 150 µl del reactivo de color y se incubó la placa a temperatura ambiente durante 20 minutos. La absorbancia se leyó a 450 nm en el lector de microplacas (DTX 800 Multimode detector BECKMAN-COULTER).

7.6. Electroforesis en gel de poliacrilamida dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE)

Se realizaron geles de poliacrilamida, estos geles se componen de un gel separador y un gel concentrador. Primero se realizó el gel separador, con 4.2 ml de agua, 3.3 ml de acrilamida/bis-acrilamida (30%/2.7% p/v), 2.5 ml de amortiguador Tris-HCl 1.5 M pH= 8.8, y como iniciador de la polimerización se añadió a la preparación 100 µL de persulfato de amonio (PSA) 10% (p/v) y 13 µl de TEMED. Se vació la preparación en los moldes de vidrio y se dejó que solidificara el gel. La solución para el gel concentrador se preparó con 2.5 ml de agua, 1,0 ml de acrilamilamida/bis-Acrilamida, 1,5 ml de amortiguador Tris-HCl 0.5 M pH= 6.6 y se agregó hasta el final 80 µL TEMED y 10 µL de PSA. Una vez que solidificó el gel separador se agregó el gel

concentrador y se colocó un peine con pozos para las muestras. Las muestras se prepararon agregándoles el amortiguador de muestra (Tris HCl 0.5 M, SDS 10% (p/v), Azul de Bromo-fenol 0.001% (p/v), pH=6.6) en la misma proporción que el marcador de peso molecular y que las muestras. Cuando se cargaron todas las muestras se corrió el gel.

Las condiciones para la corrida del gel fueron las siguientes:

Se colocó el gel en la cámara de electroforesis.

Se agregó el amortiguador de corrida Laemmli 1x (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0.1% (p/v) pH 8.3).

La cámara fue colocada en hielo durante toda la corrida, la cual inició con 30 V, cada 15 minutos se subieron 15 V hasta que se llegó a 120 V, este voltaje se mantuvo hasta que el gel terminó de correr.

Al término de la corrida se sacaron los geles de la cámara y se tiñeron con plata (kit de BIO-RAD) o con Coomassie para visualizar las bandas de proteínas.

7.7. Tinción de los geles de poliacrilamida con Azul de Coomassie.

Primero se fija el gel con una solución de metanol 50% (v/v) y ácido acético 10% (v/v) durante 30 minutos. Después se tiñó con la solución de Coomasie (azul de Coomasie G-250 0.1% (p/v), ácido acético 10% (v/v)) a temperatura ambiente toda la noche y luego se destiñe con de ácido 10% (v/v) hasta que se definieron las bandas de proteína.

7.8. Tinción con plata de geles de poliacrilamida.

La tinción con plata se realizó con un paquete comercial, el Silver stain plus de Bio-Rad. Se fijan las proteínas en el gel con la solución fijadora del paquete (metanol 50% (v/v), ácido acético 10% (v/v), concentrado de intensificador de la fijación 10% (v/v)) y se mantiene con agitación leve por 20 minutos. Se decantó la solución intensificadora de la fijación y se enjuagaron los geles en 400ml de agua destilada por 10 minutos dos veces. Se preparó la solución de teñido con 35 ml de agua desionizada, 5ml de solución complejo de plata, 5ml de solución de moderador de la reducción, 5 ml del reactivo revelador. Al terminar los lavados se agregó esta solución al recipiente que contiene el gel junto con la solución aceleradora del revelado y se mantuvo con agitación moderada

durante 20 minutos o hasta que se observaron las bandas con la intensidad requerida. La reacción se paró con ácido acético 5% (v/v). La imagen del gel se obtuvo por escaneo del gel a 300 dpi (ImageScanner GE Healthcare).

7.9. Identificación de proteínas por espectrometría de masas

Después de que se ha realizado el análisis de las imágenes obtenidas de los geles teñidos con Coomassie. Se eligieron las bandas de proteínas que se deseaba identificar y se escindieron del gel con una navaja. El pedazo de gel se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml y se añadió 500 μ L de una solución de NH_4HCO_3 50 mM en acetonitrilo al 50% (v/v). Se incubó a 50°C por 5 minutos, entonces se quitó el líquido y se desechó. Esto se repitió hasta que el pedazo de gel estuviera claro. Ya que sucedió esto se añadieron 100 μ l de acetonitrilo y se incubaron a temperatura ambiente 5 minutos. Entonces se quitó el acetonitrilo y se dejó secar a temperatura ambiente. Se agregó tripsina en una concentración 25 ng/ μ l a los fragmentos del gel y se agregó de 15 a 20 μ l de NH_4CO_3 50 mM y se incubó toda la noche a 37°C. Posteriormente a la incubación se extraen los péptidos y se limpiaron utilizando una punta de zip tip C18 (Milipore). Se eluyeron los péptidos de la punta y se evaporó a sequedad el disolvente. Se resuspendió el residuo en acetonitrilo al 5% y se analizaron en el espectrómetro de masas (MALDI-TOF 4800 Agilent).

7.10. Análisis de datos derivados de la espectrometría de masas.

Los resultados derivados de la espectrometría de masas se procesaron con el software Protein Pilot (Applied Biosystem) que realizó la búsqueda de la identidad de la proteína en la base de datos de SwissProt.

7.11. Estudios de las proteínas del suero con microarreglos de anticuerpos.

Para la realización de este estudio se utilizó el microarreglo de anticuerpos Panorama – vías de p53 fabricado por SIGMA ALDRICH. Lo primero que se realizó fue marcar las muestras de proteína (1 mg) con los fluoróforos Cy3 y Cy5. Los marcadores Cy3/Cy5 se pueden disolver en 50-100 mL de amortiguador de carbonatos pH 9.5-9.6. Se incubó la reacción de la proteína y los fluoróforos a temperatura ambiente por 30 minutos, mezclando la solución cada 10 minutos.

Posteriormente la mezcla de reacción de las proteínas y los fluoróforos se hizo pasar por minicolumnas (Sigma Spin) para eliminar el fluoróforo que no se unió a la proteína. La proteína marcada se protegió de la exposición a la luz. Se determinó la concentración proteínica con el paquete 2D Quant (GE Healthcare). Para determinación del colorante de la proporción molar(colorante/proteína) se midió la absorbancia de Cy3 y Cy5 a 552 nm y 650 nm respectivamente. De aquí se calculó la concentración molar (M) de Cy3 y Cy5 tomando en cuenta lo que sigue:

Los coeficientes de extinción molar ($\epsilon^{\mu M}$) de Cy3 y Cy5 son:

$$\text{Cy3: } \epsilon^{\mu M} (552\text{nm}) = 0.15 \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

$$\text{Cy5: } \epsilon^{\mu M} (650\text{nm}) = 0.25 \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

Cálculos:

$$\text{Cy 3: (concentración) } (\mu\text{M}) = A_{552}/0.15$$

$$\text{Cy 5: (concentración) } (\mu\text{M}) = A_{650}/0.25$$

Y (mg/ml)= concentración de proteína después del marcado

$$\text{Concentración proteica } (\mu\text{M}) = \{Y(\text{mg/ml})/60,000\} \times 10^6$$

$$\text{D/P} = \frac{\text{Cy 3 o Cy 5 (concentración)}}{\text{concentración proteica de la muestra}}$$

La razón de marcador y proteína (D/P) tuvo que ser mayor a 2 para continuar con el proceso.

Se incubó la muestra de proteína marcada con el microarreglo a temperatura ambiente. Para esto se mezcló de 5-50 μg de cada muestra marcada con Cy3 y Cy5 (1-10 μg /ml cada una) con 5 ml de amortiguador de incubación de ensayo. La mezcla se vació al pozo 1 de la bandeja de incubación (quadri PERM cell culture Vessel) proporcionada en el paquete. Se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente, en un agitador, con frecuencia de agitación moderada. Después de la incubación se agregaron 5 ml de

amortiguador de lavado (washing buffer) a los pozos 2,3 y 4. Se transfirió la lámina al pozo 2 y se incubó por 5 minutos. Este paso se repitió en los pozos 3 y 4. Al final se lavó la lámina en agua por 2 minutos. Posteriormente se dejó secar por 20 minutos protegiendo la lámina de la luz. Se escanearon los microarreglos de anticuerpos en un ScanArray 400 y se cuantificaron utilizando el programa QuantArray, el cual se incluye con este equipo (Packard BioChips). Todas las imágenes se capturaron usando 65% de ganancia PTM, 70-75% de poder de láser y 10 μm de resolución al 50% de la relación o tasa de escaneo. Para cada punto el valor medio de densidad de los Cy3 y Cy5, y el valor medio del fondo para Cy3 y Cy5 se calcularon con el programa ArrayPro Analyzer de Media Cybernetics. Los datos adquiridos fueron de 3 arreglos con un duplicado para cada anticuerpo.

8. RESULTADOS

Se seleccionaron los sueros de los pacientes cuyas muestras no tuvieran hemólisis. De éstos solamente se utilizaron 1, 4, 6 de cáncer canalicular y 3, 7, 9 de enfermedades benignas de la mama (Tabla 2). Después de la precipitación de las proteínas del suero con acetona el precipitado de proteína debe de fraccionarse en grupos menos complejos de proteínas. Esto es debido a que al estar manejando suero sanguíneo contamos con grandes cantidades de proteínas, propias de la cascada de la coagulación y de la misma sangre tales como albúmina. Al llevar a cabo el fraccionamiento evitamos que grandes cantidades de las proteínas mayoritarias en el suero como la albúmina y las IgGs enmascaren o no permitan que estudiemos a proteínas con menor representación en el suero como podrían ser las proteínas marcadoras de cáncer que estamos buscando. Todo el proceso de fraccionamiento se basó en la diferencia de solubilidades de las proteínas contenidas en el suero.

8.1 Análisis de proteínas de diferentes fracciones por electroforesis.

Después de obtener las fracciones (1-6) de cada muestra de suero se analizaron las proteínas de cada fracción en un gel de poliacrilamida para verificar la separación de grupos de proteínas por cada fracción. Se obtuvo el patrón de fraccionamiento de proteínas observado en los geles (Figura 10 a-d). Se puede ver que las albúminas (peso molecular alrededor de 65 kDa) principalmente se quedaron en las fracciones 4 y 5. Mientras que las IgG e IgEs se observaron como una banda ancha alrededor de 150 kDa en la fracción 3 de todos los sueros. De aquí se hizo un análisis para identificar bandas que pudieran diferenciar muestras de cáncer (1, 4, 6) de las muestras de pacientes con enfermedades benignas de mama (3, 7, 9).

Tabla 2. Diagnóstico histopatológico de los pacientes que donaron los sueros.

Muestra	Histopatología
1	Carcinoma canicular infiltrante.
2	Mastitis crónica granulomatosa. Cambio fibroquístico.
3	Fibroadenoma.
4	Carcinoma canicular infiltrante.
5	Fibroadenoma.
6	Carcinoma canicular infiltrante.
7	Cambio fibroquístico no estratificado.
8	No registrado .
9	Mastitis .

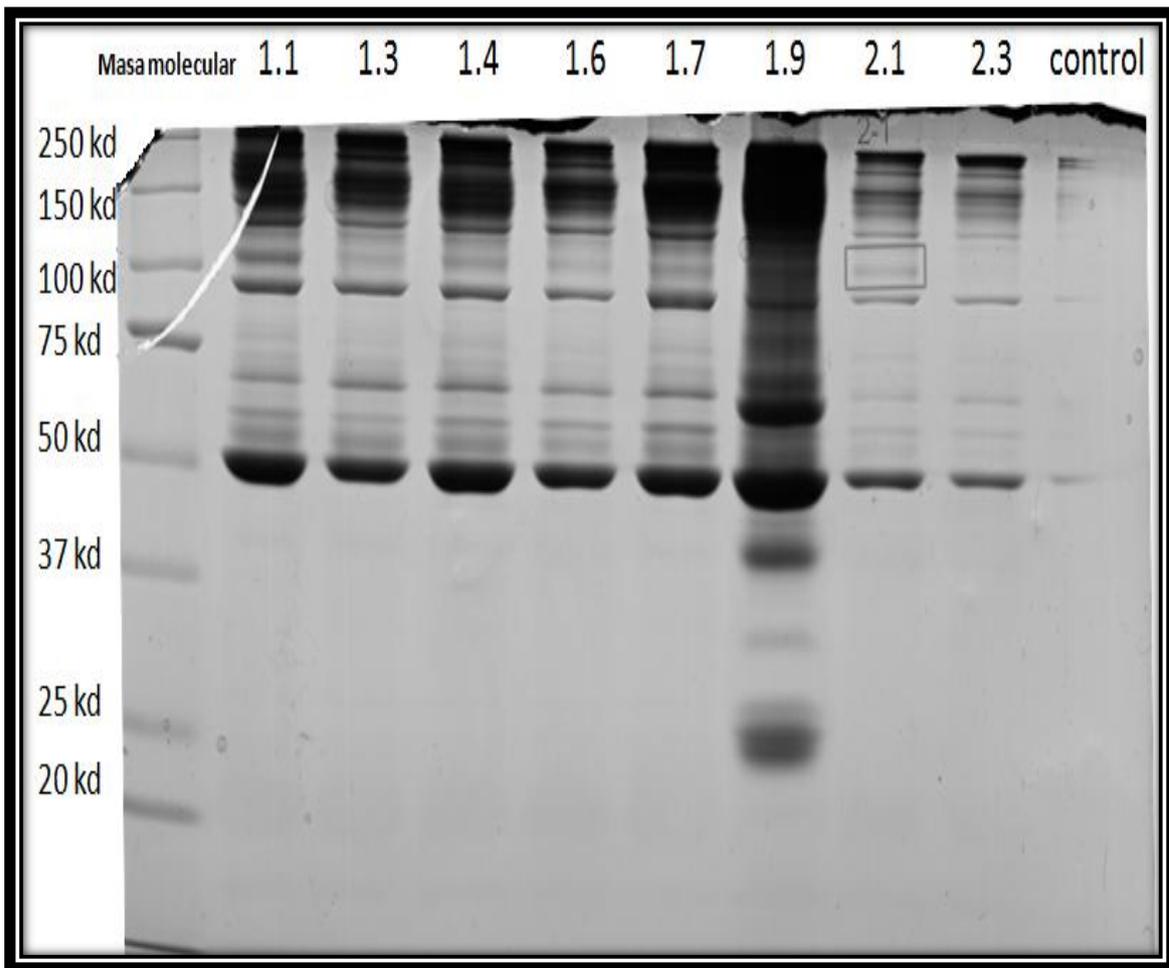


Figura 10 a. Gel de poliacrilamida de las fracciones 1 y 2 obtenidas de los sueros de pacientes con cáncer de mama (1,4, 6) y con enfermedades benignas de la mama (3, 7, 9).

1.1=fracción 1 de la muestra 1

1.6=fracción 1 de la muestra 6

2.1=fracción 2 de la muestra 1

1.3=fracción 1 de la muestra 3

1.7=fracción 1 de la muestra 7

2.3= fracción 2 de la muestra 3

1.4=fracción 1 de la muestra 4

1.9=fracción 1 de la muestra 9

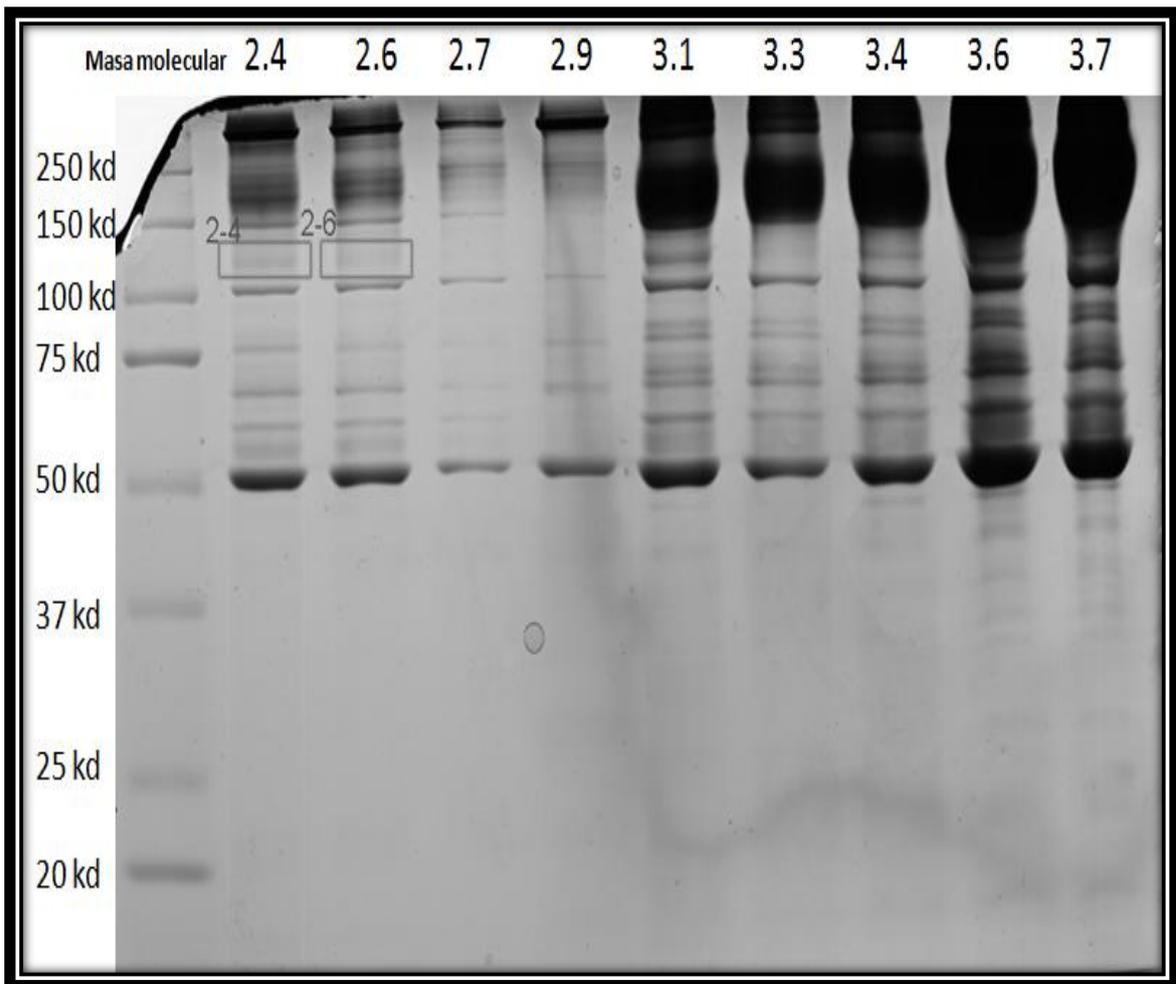


Figura 10 b. Gel de poliacrilamida de las fracciones 2 y 3 obtenidas de los sueros de pacientes con cáncer de mama (1,4, 6) y con enfermedades benignas de la mama (3, 7, 9).

2.4=fracción 2 de la muestra 4

2.9=fracción 2 de la muestra 9

3.4=fracción 3 de la muestra 4

2.6=fracción 2 de la muestra 6

3.1=fracción 3 de la muestra 1

3.6=fracción 3 de la muestra 6

2.7=fracción 2 de la muestra 7

3.3=fracción 3 de la muestra 3

3.7=fracción 3 de la muestra 7

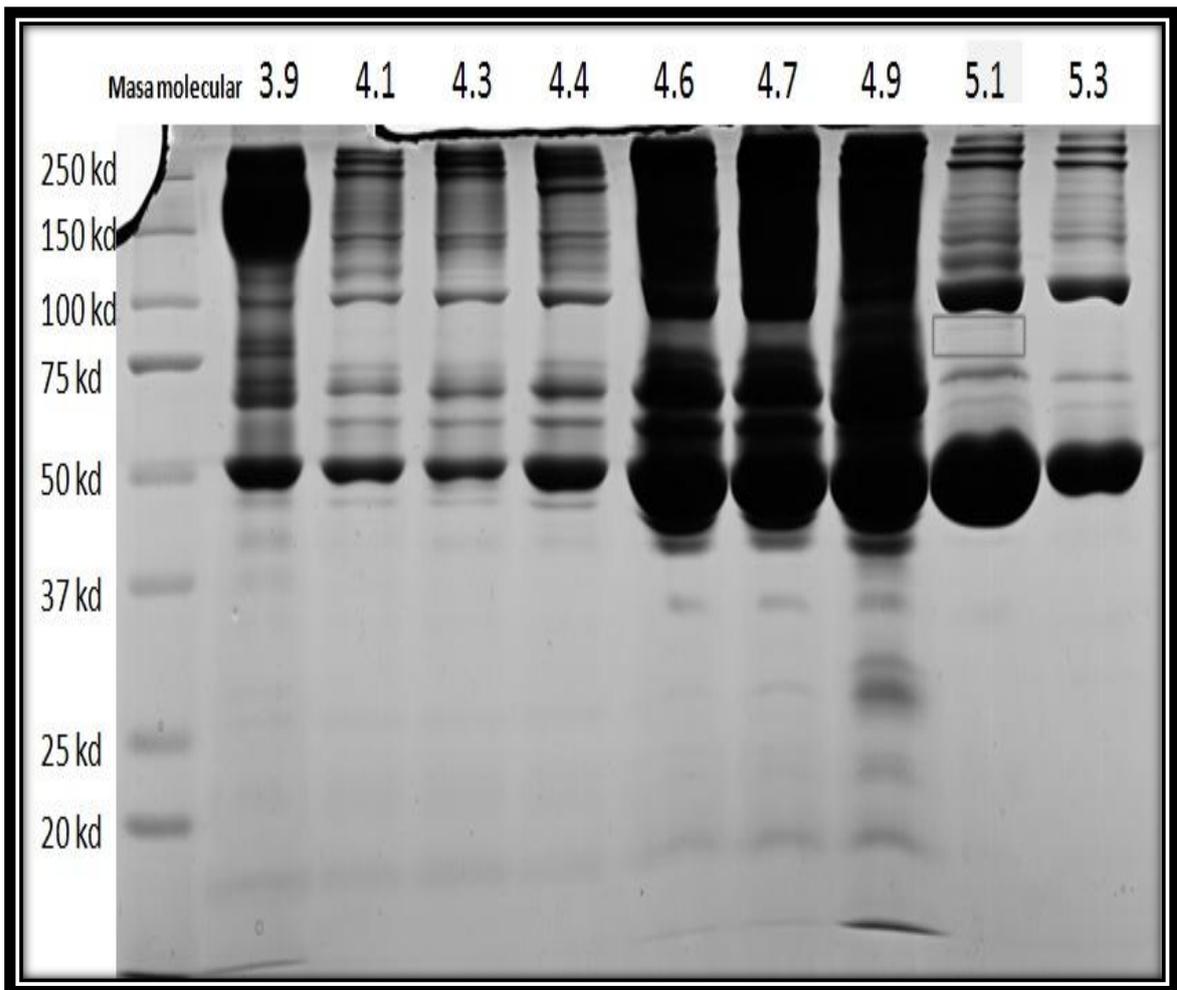


Figura 10 c. Gel de poliacrilamida de las fracciones 3,4 y 5 obtenidas de los sueros de pacientes con cáncer de mama (1,4, 6) y con enfermedades benignas de la mama (3, 7, 9).

3.9=fracción 3 de la muestra 9

4.4=fracción 4 de la muestra 4

4.9=fracción 4 de la muestra 9

4.1=fracción 4 de la muestra 1

4.6=fracción 4 de la muestra 6

5.1=fracción 5 de la muestra 1

4.3=fracción 4 de la muestra 3

4.7=fracción 4 de la muestra 7

5.3=fracción 5 de la muestra 3

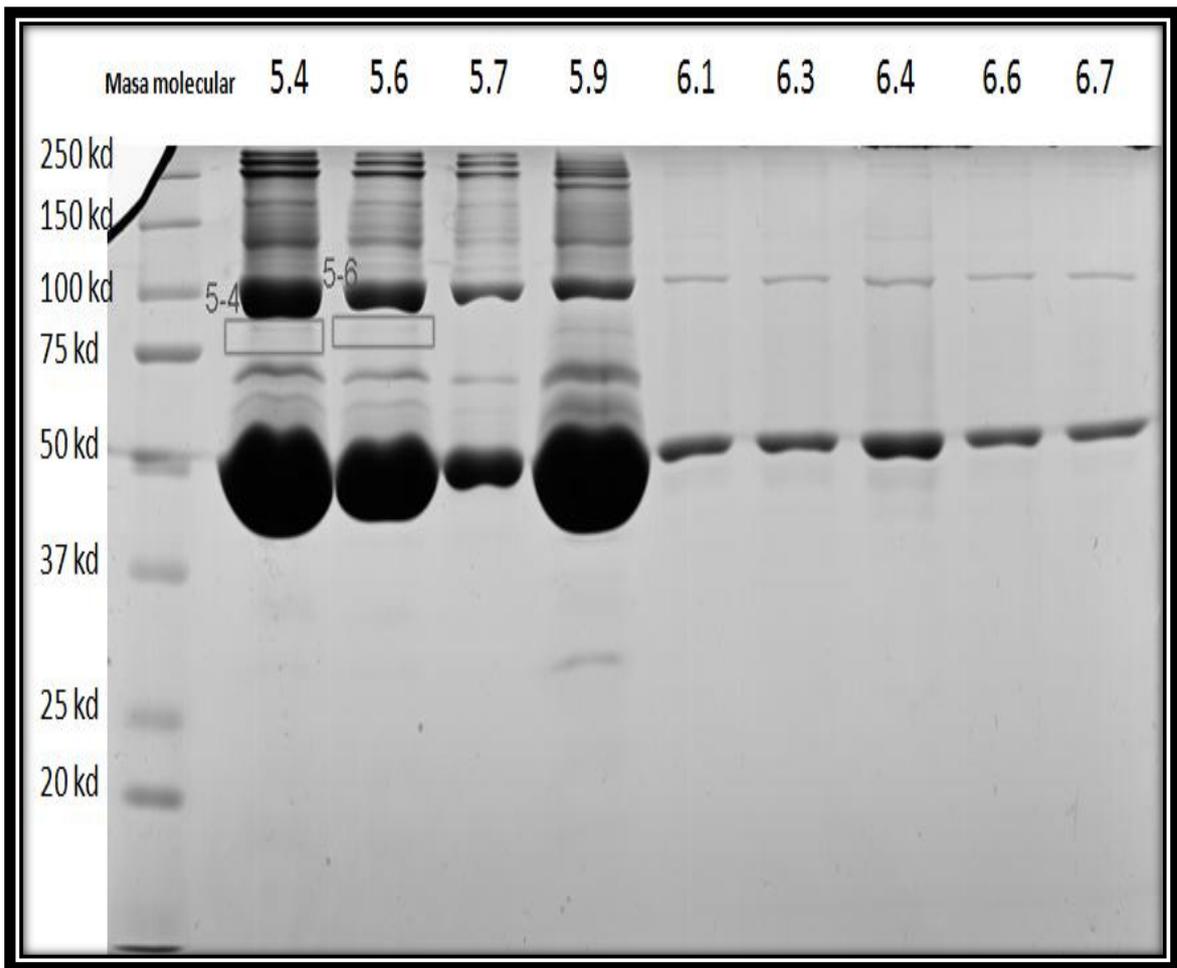


Figura 10 d. Gel de poliacrilamida de las fracciones 5 y 6 obtenidas de los sueros de pacientes con cáncer de mama (1,4, 6) y con enfermedades benignas de la mama (3, 7, 9).

5.4=fracción 5 de la muestra 4

5.9=fracción 5 de la muestra 9

6.4=fracción 6 de la muestra 4

5.6=fracción 5 de la muestra 6

6.1=fracción 6 de la muestra 1

6.6=fracción 6 de la muestra 6

5.7=fracción 5 de la muestra 7

6.3=fracción 6 de la muestra 3

6.7=fracción 6 de la muestra 7

En la fracción 2 de las muestras 1, 4 y 6 (Fig. 10 a y b), podemos observar una banda que se encuentra alrededor de 100 kDa, que solo se observa en las muestras con cáncer y no en las muestras de casos benignos. En la fracción 5 de las muestras 1,4 y 6 (Fig. 10 c y d), podemos observar una banda alrededor de 75 kDa, que solo se observa en las muestras con cáncer y no en las muestras de casos benignos.

Los resultados que arrojaron los análisis con un programa de procesamiento de imágenes (Image J v. 1.44) de los geles 1D (Figuras 11 a-e) muestran claras diferencias entre las fracciones 2 de las muestras de pacientes con cáncer de mama canicular con respecto a pacientes con enfermedad benigna de la mama, en ellas se puede observar un patrón diferente de estas fracciones proteicas ya que al parecer se encuentran bandas de proteínas (picos) que a simple vista no se pueden diferenciar en el gel de poliacrilamida y que se distinguen solamente en las muestras de cáncer. Además en esta fracción no se observan bandas que denotan la presencia de proteínas abundantes en el suero. Por lo que esta fracción fue seleccionada para un análisis más profundo de los cambios de las proteínas en la condición de cáncer a través de microarreglos de anticuerpos.

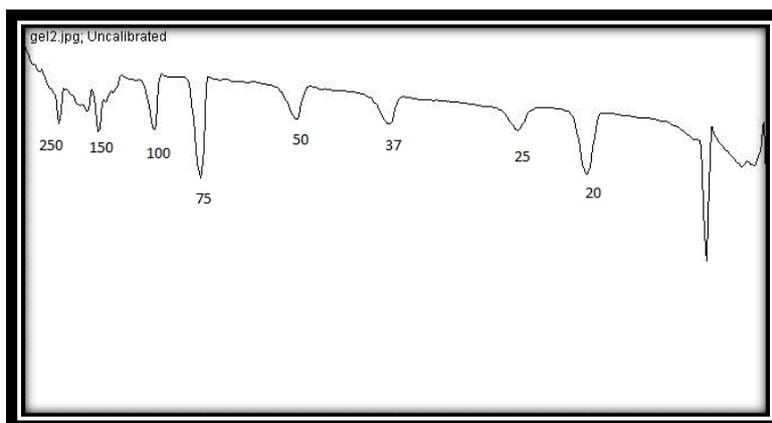


Figura 11 a. Marcadores de peso molecular Análisis de imagen del gel (10.c) de las fracciones 2 de los sueros 4,6 y 7,9 con el programa Image J v. 1.44. El análisis muestra varios picos correspondientes a bandas de proteínas en el gel. Usando unidades de densidad óptica(UDO). Las flechas señalan las diferencias entre sueros de pacientes con cáncer de mama y con enfermedad benigna de la mama.

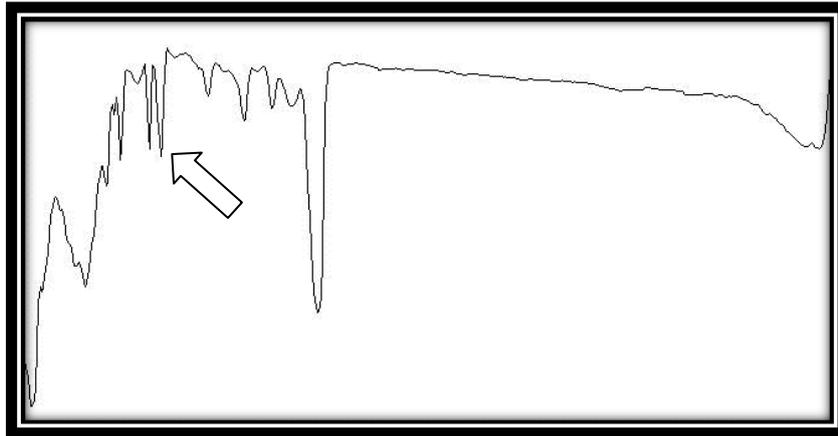


Figura 11 b. Fracción 2 del suero 4 (2.4) Marcadores de peso molecular Análisis de imagen del gel (10.c) de las fracciones 2 de los sueros 4,6 y 7,9 con el programa Image J v. 1.44. El análisis muestra varios picos correspondientes a bandas de proteínas en el gel. Las flechas señalan las diferencias entre sueros de pacientes con cáncer de mama y con enfermedad benigna de la mama.



Figura 11 c. Fracción 2 del suero 6 (2.6) Fracción 2 del suero 4 (2.4) Marcadores de peso molecular Análisis de imagen del gel (10.c) de las fracciones 2 de los sueros 4,6 y 7,9 con el programa Image J v. 1.44. El análisis muestra varios picos correspondientes a bandas de proteínas en el gel. Las flechas señalan las diferencias entre sueros de pacientes con cáncer de mama y con enfermedad benigna de la mama.

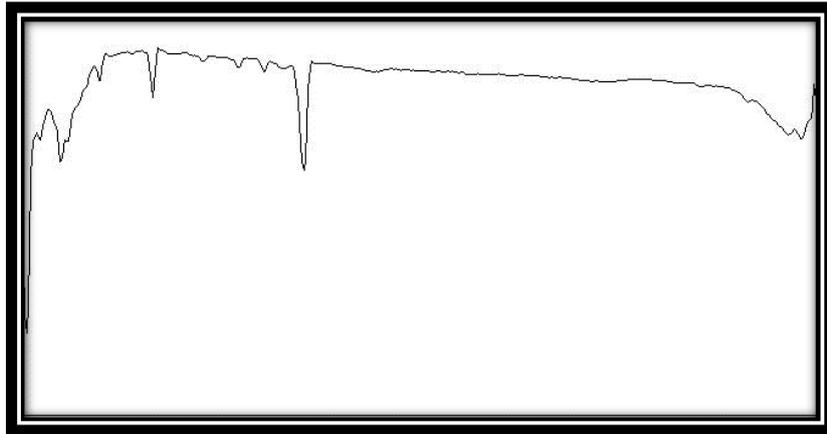


Figura 11 d. Fracción 2 del suero 7 (2.7)Fracción 2 del suero 6 (2.6)Fracción 2 del suero 4 (2.4)Marcadores de peso molecular Análisis de imagen del gel (10.c) de las fracciones 2 de los sueros 4,6 y 7,9 con el programa Image J v. 1.44. El análisis muestra varios picos correspondientes a bandas de proteínas en el gel.



Figura 11 e. Fracción 2 del suero 9 (2.9)Fracción 2 del suero 7 (2.7)Fracción 2 del suero 6 (2.6)Fracción 2 del suero 4 (2.4)Marcadores de peso molecular Análisis de imagen del gel (10.c) de las fracciones 2 de los sueros 4,6 y 7,9 con el programa Image J v. 1.44. El análisis muestra varios picos correspondientes a bandas de proteínas en el gel.

8.2 Identificación de bandas de proteínas de sueros de pacientes con cáncer de mama por espectrometría de masas.

Decidimos identificar la banda de 100 kDa de la fracción 2 y la de 75 kDa de la fracción 5 de las muestras de pacientes con cáncer mama ya que estas podían separarse visualmente y manualmente del gel y así enviarlas para su análisis por espectrometría de masas.

La identificación se realizó por triplicado para asegurar la identidad de las proteínas anteriormente seleccionadas, y como se observa en la tabla 3 se encontraron las mismas proteínas en cada muestra ;en cambio en la tabla 4 observamos que de las 3 muestras , 2 muestran la misma proteína, y en una no se logra detectar la presencia de la proteína Haptoglobina.

Tabla 3. Identificación de la banda a 100kDa de la fracción 2 de tres sueros de pacientes con cáncer de mama

Fracción/ no. de banda	Nombre de la proteína	Número de acceso (UniProt)	Número de péptidos identificados	Score (Protein pilot)
Fracción 2 muestra de suero 1 (2.1)	C1 inhibidor de la proteasa Haptoglobina	P05155	14	86
		P00738	7	48
Fracción 2 muestra de suero 4 (2.4)	C1 inhibidor de la proteasa Haptoglobina	P05155	14	86
		P00738	7	48
Fracción 2 muestra de suero 6 (2.6)	C1 inhibidor de la proteasa	P05155	14	86

En la fracción 5:

Tabla 4. Identificación de la banda a 75 kDa en la fracción 5 de sueros de pacientes con cáncer de mama.

Fracción	Proteína identificada	Número de acceso (UniProt)	Número de péptidos identificados	Score (Protein pilot)
Fracción 5 muestra de suero 1 (5.1)	Serotransferrina	P02787	17	93
Fracción 5 muestra de suero 4 (5.4)	N/D *	--	--	--
Fracción 5 muestra de suero 6 (5.6)	Serotransferrina	P02787	17	93

*No detectada

8.3 Preparación de las muestras de proteína de suero para el microarreglo de anticuerpos.

Después del fraccionamiento, la proteína de la fracción 2 de suero a partir de 100 microlitros de muestra fue:

Tabla 5. Fracción 2 de las muestras de suero de cáncer de mama.

Fracciones / muestras	Volumen (microlitros)	Concentración ($\mu\text{L}/\mu\text{g}$)	Cantidad total (microgramos)
Cáncer			
Fracción 2, muestra 1	110	6.774	745.14
Fracción 2, muestra 4	130	8.706	1131.78
Fracción 2, muestra 6	140	9.005	1260.7
Enfermedad benigna de la mama			
Fracción 2, muestra 3	100	5.558	555.8
Fracción 2, muestra 7	130	8.773	1140.49
Fracción 2, muestra 9	115	4.702	540.73

Cómo se puede ver por los resultados en la muestra con cáncer se obtuvieron rendimientos de alrededor de 1 mg por muestra. Sin embargo con la de enfermedad benigna de la mama 2 de las 3 muestras tuvieron rendimiento de 500 microgramos. Esta cantidad fue suficiente para llevar a cabo los experimentos de electroforesis en gel de y los de microarreglos de anticuerpos.

8.4. Estudio de las proteínas de suero con el microarreglo Panorama p53 de las proteínas de la vía p53 en muestras de enfermedad benigna y cáncer de mama.

Los resultados del procesamiento de la fracción 2 de los 6 sueros de las pacientes con enfermedades benignas y cáncer de mama en microarreglos de anticuerpos se presentan en la Figura 12.

En la tabla 7 del apéndice se observan los valores promedio intensidad de fluorescencia de todas las proteínas del microarreglo de las 6 réplicas de los microarreglos.

En la figura 12, se observan 2 bloques de proteínas de datos donde al menos 4 de cada 6 experimentos en 1) son subexpresadas en cáncer y en 2) son sobreexpresadas en cáncer en la mayoría de las proteínas . También se puede observar que las replicas tienen comportamientos parecidos como los de la 1 y 4 que presentan variaciones en los valores con relación a los otros experimentos, lo que hace difícil tener un valor promedio replicable para las proteínas del microarreglo. Por lo que en estos experimentos estas diferencias pudieron derivarse de alguna falla técnica en el procesamiento del microarreglo. Por lo que en algunos casos se omitieron estos datos para el cálculo del valor promedio de la relación de la fluorescencia C/B.

Sin embargo para un 87% de los valores de intensidad de fluorescencia de las proteínas del microarreglos se pudo calcular una relación C/B de aproximadamente 1 tomando en cuenta la desviación estandar. Por lo que aunque de acuerdo al dendograma hay disminución o aumento en la relación C/B la desviación entre los datos hace que la relación sea siempre próxima a 1. Las proteínas cuyos valores consistentemente se observaron aumentados o disminuidos en cáncer se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 6. Proteínas de la vía p53 subexpresadas y sobreexpresadas en microarreglos de anticuerpos consistentemente en los pacientes de cáncer de mama canalicular.

Nombre de la proteína	Valor promedio (±desviación estándar) N=6
Incrementadas	
Caspasa 3 (activa)	1.41 ± 0.35
DR5	2.37 ± 0.6
MTBP	2.26 ± 0.55
PERP	4.33 ± 2.57
PUMA	2.58 ± 0.47
Disminuidas	
b-catenina (p-ser 33)	0.47 ± 0.11
BID	0.72 ± 0.17
GRP75	0.68 ± 0.27
HSP70	0.55 ± 0.21

9. DISCUSIÓN

La alta prevalencia de cáncer de mama ha llevado a mejorar el diagnóstico y las formas de detección, siendo de gran ayuda como respaldo y/o confirmación de las mastografías el uso de biomarcadores, en este caso proteínas para mejorar el diagnóstico y pronóstico en las mujeres jóvenes.

Las proteínas ofrecen información detallada sobre las condiciones de salud del tejido, lo que permite la identificación del tipo de cáncer y el riesgo, con esto provocando un tratamiento más eficaz y mejor orientado. Algunos estudios han correlacionado el pronóstico del cáncer de mama con las proteínas en el tumor, tales como receptores de hormonas, HER-2, plasminógeno uroquinasa.

Para el cáncer de mama, sin embargo, en la actualidad hay muy pocos marcadores séricos de uso clínico. Algunos estudios han identificado como posibles marcadores de cáncer de mama las proteínas CA 15.3, BR 27.29, antígeno de polipéptido tisular (TPA), polipéptido tejido antígeno específico (TPS), *shed* HER-2, y BC1, BC2, y BC3. Sin embargo, otros estudios encontraron una falta de capacidad diagnóstica suficiente en proteínas de suero, incluyendo CA 15.3, CA 125, CA 19.9, CA 125, BR 27.29, y el antígeno carcinoembrionario (CEA). El Grupo Europeo de marcadores tumorales identificó las MUC-1 glicoproteínas mucina CA 15.3 y BR 27.29 como los mejores marcadores séricos de cáncer de mama, pero no podrían recomendar estas proteínas para el diagnóstico debido a la baja sensibilidad. (Jesneck, *et al.*, 2009) El objetivo de este trabajo fue el uso de las tecnologías proteómicas en el descubrimiento de nuevos biomarcadores de cáncer de mama utilizando suero de la sangre como fuente de proteoma.

Inicialmente tomamos en cuenta que la mayoría de los estudios que se han realizado en este campo, se han orientado hacia escanear sólo una proteína durante el seguimiento del cáncer, en grupos de muestra grandes y de aquí aún no se han encontrado biomarcadores con un 100% de especificidad y sensibilidad para cáncer de mama. Derivado de todo este conocimiento la nueva expectativa es encontrar un grupo de marcadores, en este caso proteínas, que en conjunto puedan permitir una detección del cáncer confiable. Para el descubrimiento de nuevos biomarcadores se ha aprovechado la aparición de nuevas tecnologías y de ahí se han obtenido marcadores que actualmente se utilizan para un mejor diagnóstico, pronóstico o predicción de la

enfermedad. En este estudio se trato de identificar un número grande de proteínas a través del uso de técnicas proteómicas para su propuesta como biomarcadores de cáncer de mama canalicular.

Algunos estudios han detectado biomarcadores de cáncer de mama mediante la espectrometría de masas. También se está implementando otras tecnologías como la detección de las proteínas en fase inversa de microarreglos. Aunque estos estudios han demostrado correlaciones entre las proteínas del suero y cáncer de mama, a menudo no está claro cómo estas correlaciones se traducen en aplicabilidad clínica para el diagnóstico (Jesneck, *et al.*, 2009). Nuestros datos indican que algunas proteínas de suero pueden diferenciar entre la presencia de cáncer de mama y una lesión benigna de la mama.

Como es el caso de la mayoría de los cánceres, el suero así como el plasma son las fuentes de biomoléculas preferidas en los estudios de biomarcadores de mama debido a que en éstos se reflejan las respuestas a los procesos fisiológicos y patológicos del cuerpo humano. El suero nos proporcionan una buena fuente de información sobre las proteínas secretadas por el tumor, también de las proteínas del tejido normal y plasma que son destruidos por proteasas específicas del tumor, y de las proteínas involucradas en una respuesta general o una respuesta local por el tumor. A pesar de la dificultad que surge de esta compleja estructura, los métodos de toma de muestras y la facilidad en repetirlo hacen que sea muy adecuado. Sin embargo en esta etapa de descubrimiento de biomarcadores es donde se obtienen datos de tecnologías como la espectrometría de masas para proponer proteínas que se verificarán en las muestras de pacientes con alguna otra técnica que ya es aceptada y cuyos datos corroborarán lo obtenido en la primera parte.

Del análisis con la espectrometría de masas se encontró en las bandas las cuales sólo se observaron en sueros de pacientes con cáncer, el C1 inhibidor de la proteasa, la haptoglobina y la serotransferrina. Hablando respecto al C1 inhibidor de la proteasa podemos comentar que la activación del complejo C1 está bajo el control del inhibidor-C1, desempeñando un papel que puede ser decisivo en la regulación de importantes vías fisiológicas incluyendo la activación del complemento, coagulación de la sangre, la fibrinólisis y la generación de cininas. Además es un inhibidor muy eficaz de FXIIa, la quimotripsina y la calicreína.

En tanto que la haptoglobina es una proteína que se combina con la hemoglobina plasmática libre, evitando la pérdida de hierro a través de los riñones y protege los riñones de daños por la hemoglobina, mientras que a la hemoglobina la hace accesible a las enzimas de degradación; la haptoglobina sin escindir, también conocida como la zonulina, juega un papel en la permeabilidad intestinal, permitiendo el desmontaje de las uniones estrechas intercelulares, y el control del equilibrio entre la tolerancia y la inmunidad a los antígenos no propios. La serotransferrina es parte de la familia de las transferrinas, éstas son proteínas de transporte vinculantes de hierro que pueden unirse a dos iones Fe^{3+} en asociación con la unión de un anión, generalmente bicarbonato. Es responsable del transporte de hierro a partir de los sitios de absorción y la degradación del hemo a los sitios de almacenamiento y utilización. La transferrina sérica también puede tener un papel en la estimulación de la proliferación celular.

Otra observación importante es que se presenta de forma consistente un aumento en algunas proteínas de respuesta inmune en pacientes con cáncer.

La respuesta inmune tiene un papel preponderante con respecto al cáncer ya que el sistema inmunitario ataca y elimina no solamente las bacterias y otras sustancias extrañas, sino también las células del cáncer. Una célula cancerosa no es una célula extraña; es una célula cuya función biológica ha sido alterada de tal forma que no responde a los mecanismos normales del cuerpo que controlan el crecimiento y la reproducción de la misma. Las células anormales pueden continuar creciendo, transformándose en cáncer.¹

El sistema inmune es una red intrincada en la que participan diferentes tipos de células y de moléculas, la acción coordinada de todos sus elementos permite que se desarrolle una respuesta eficaz contra la célula tumoral. Sin embargo, los tumores presentan diversos mecanismos de evasión que permiten el desarrollo del mismo,^r su papel fundamental en el control del desarrollo de una célula cancerosa, es ejemplificado por una sorprendente estadística: el cáncer tiene 100 veces más posibilidades de aparecer en las personas que toman fármacos que inhiben el sistema inmunitario, que en las que tienen un sistema inmunitario normal.¹

A pesar de la inmunovigilancia, las células tumorales comúnmente presentan mecanismos de evasión a la respuesta inmune, que permiten su crecimiento eficiente.^m

Los resultados encontrados gracias al análisis de los microarreglos y su graficación nos dan una señal de congruencia con la actividad biológica de MTBP que interviene en la progresión del ciclo celular y puede estar involucrada con la formación de tumores. Pero para el resto de las proteínas del microarreglo los resultados encontrados llaman la atención ya que proteínas como la caspasa 3 que se activa durante la apoptosis se encuentra incrementada en cáncer de mama lo cual resulta interesante ya que se esperaría que se secretaran a la sangre moléculas mayormente relacionadas con la proliferación, y no con el proceso de apoptosis.

Un razonamiento similar se puede aplicar con respecto a PUMA, DR5 , y PERP. Con respecto a PUMA se encontró que es también un mediador clave de la ruta apoptótica inducida por p53. PUMA puede jugar un papel fundamental en la determinación del destino celular (muerte celular programada vs arresto del ciclo celular) en respuesta a la activación de p53; en tanto que DR5 , responde a la radiación y al daño de DNA, esta involucrada en la activación de las caspasas y la apoptosis celular.^p Por otro lado PERP , en algunos estudios se encontró que la pérdida de PERP afecta a la homeostasis epitelial mamaria causando la acumulación de células inflamatorias alrededor de epitelio maduro mamario. Además, se muestra la reducción de expresión PERP en muchas líneas celulares de cáncer de mama humano en comparación con las células no transformadas. Es importante señalar que la deficiencia PERP también promueve el desarrollo del cáncer de mama de ratón (Dusek, *et al.*, 2012). Debido al fundamento de las técnicas que se realizaron, desconocemos las condiciones en las que se encuentran estas proteínas, ya que podrían ser disfuncionales o presentar alguna mutación.

En cuanto a b-catenina (p-ser 33), BID, GRP75, HSP70, se esperaba encontrar valores incrementados debido a las funciones que estas realizan , en cambio se encontraron disminuidas.

Llegamos a la conclusión anterior ya que b-catenina (p-ser 33) forma parte de las proteínas que tiene que ver con la regulación del crecimiento celular y la adhesión entre las células. BID es miembro de la familia BCL-2 (que regula la muerte celular) y también es un mediador de daño mitocondrial. GRP75, juega un papel en la proliferación celular, respuesta al estrés y el mantenimiento de las mitocondrias, tiene que ver con las proteínas de choque térmico. Y por ultimo HSP70, tiene que ver con la

respuesta inmune, y se localiza en el citoplasma y en el núcleo de la célula; alteraciones ambientales, tales como un aumento repentino de temperatura, inducen la síntesis de este tipo de proteínas de choque térmico (estrés) .ⁿ

Finalmente cabe señalar que la mayoría de las proteínas identificadas en este trabajo han sido descritas a nivel celular , pero en la presente investigación el hecho de que los resultados sean obtenidos a partir de una muestra de suero sanguíneo , establecen la posibilidad de una prueba diagnóstica y pronostica mas factible.

10. CONCLUSIONES

En general, las proteínas del suero identificadas y seleccionadas (C1 inhibidor de la proteasa, Haptoglobina y serotransferrina) a través de la técnica de electroforesis mostraron capacidad moderada para detectar cáncer. Sin embargo, probablemente son más indicativos de efectos secundarios como inflamación no específica de malignidad.

Todas las proteínas de la vía de p53 estudiadas a través del microarreglo de anticuerpos tienen gran potencial para ser verificados como biomarcadores.

Con los resultados obtenidos podríamos pensar en que es una respuesta del organismo a un cáncer ya establecido, y con esto sentar un antecedente para diferenciar cáncer de una lesión benigna, sin métodos más invasivos que una toma de muestra de sangre.

11. PERSPECTIVAS

Se requiere un estudio con un mayor número de muestras de suero de pacientes que permita la verificación de las proteínas identificadas por estos estudios para su propuesta como biomarcadores de cáncer de mama. Asimismo después de la verificación un estudio a nivel clínico para su validación como biomarcador para diagnóstico de cáncer de mama y poder establecer los valores de referencia adecuados.

12. BIBLIOGRAFÍA.

1. Alquobaili F, Miller S., Muhie S., Day A., Jett M., and Hammamieh R.(2010). Estrogen receptor-dependent genomic expression profiles in breast cancer cells in response to fatty acids. *J Carcinog.* 8:17.
2. Baskın Y. and Yiğitbaşı T.(2010). Clinical Proteomics of Breast Cancer. *Curr Genomics.* 11(7): 528–536.
3. Camerini A., Donati S, Viacava P., Siclari O., Puccetti C., Tartarelli G., Valsuani C., De Luca F., Martini L., Cavazzana A., and Amoroso D.(2011). Evaluation of HER2 and p53 expression in predicting response to docetaxel-based first-line chemotherapy in advanced breast cancer, *J Exp Clin Cancer Res.* 30(1): 38.
4. Cummings S. R., Tice J. A., Bauer S., Browner W.S., Cuzick J., Ziv E., Vogel V., Shepherd J., Vachon C., Smith-Bindman R., and Kerlikowske K.(2009). Prevention of Breast Cancer in Postmenopausal Women: Approaches to Estimating and Reducing Risk. *J Natl Cancer Inst.* 101(6): 384–398.
5. Dusek R.L., Bascom J.L., Vogel H., Baron S., Borowsky A.D., Bissell M.J., Attardi L.D. (2012). Deficiency of the p53/p63 target Perp alters mammary gland homeostasis and promotes cancer. *Breast Cancer Res.* 14(2):R65.
6. Hawthorn L., Luce J., Stein L., Rothschild J.(2010). Integration of transcript expression, copy number and LOH analysis of infiltrating ductal carcinoma of the breast. *BMC Cancer.*10: 460.
7. Jesneck J.L., Mukherjee S., Yurkovetsky Z., Clyde M., Marks J. R., Lokshin A. E., and Lo J. Y.(2009).Do serum biomarkers really measure breast cancer?.*BMC Cancer* 9: 164.
8. Jin H. and Zangar R. C.(2009). Protein Modifications as Potential Biomarkers in Breast Cancer. *Biomark Insights.* 4: 191–200.
9. Kang U., Ahn Y., Lee J. W., Kim Y., Kim J., Yu M., Noh D., and Lee C.(2010). Differential profiling of breast cancer plasma proteome by isotope-coded affinity tagging method reveals biotinidase as a breast cancer biomarker; *BMC Cancer.* 10: 114.
10. Liu C., Volinia S., Alder H., Rugge M., Croce C.M., and Rosenberg A.(2009). MicroRNA expression profiling of male breast cancer. *Breast Cancer Res.*11(4): R58.

11. NORMA Oficial Mexicana NOM-041-SSA2-2011. Para la prevención, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer de mama.
12. Sahab Z.J., Semaan S.M., and Sang Q.A.(2007). Methodology and Applications of Disease Biomarker Identification in Human Serum. *Biomark Insights*. 2: 21–43.
13. Suzuki K. y Matsubara H. (2011). Recent Advances in p53 Research and Cancer Treatment. *J. Biomed. Biotech*. 2011: 1-7.
14. Wolf-Yadlin A., Sevecka M., and MacBeath G.(2009). Dissecting Protein Function and Signaling Using Protein Microarrays. *Curr Opin Chem Biol*. 13(4): 398–405.
15. Wu P. y Grainger D. W. (2006). Comparison of hydroxylated print additives on antibody microarray performance. *J Proteome Res*. 5(11): 2956–2965.
16. Yarmush M. L. y Jayaraman A. (2002). Advances in proteomic technologies. *Ann. Rev. Bio. Eng*. 4: 349-373.
17. Zhong L, Ge K., Zu J., Zhao L., Shen W., Wang J., Zhang X.,¹ Gao X., Hu W., Yen Y.,² and Kernstine K.H.(2008). Autoantibodies as potential biomarkers for breast cancer. *Breast Cancer Res*.10(3): R40.

13. CIBERGRAFÍA

- a. <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/contenidos/estadisticas/2011/cancer11.asp?s=inegi&c=2780&ep=50>
- b. <http://www.upch.edu.pe/ehas/pediatria/lactancia%20materna/Clase%20301%20-%202010.htm>
- c. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0034-83762006000100008&script=sci_arttext
- d. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/documentos/DOCSAL7205.pdf>
- e. <http://www.bccancer.bc.ca/PPI/TypesofCancer/Breast/default.htm>
- f. http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75262002000500009
- g. http://www.breastcancer.org/es/sintomas/diagnostico/estado_hormonal
- h. maging.ubmmedica.com/cancernetwork/forpatients/pdfs/July-09-Pt-Guide_GEN_revs2-2.pdf
- i. <http://www.breastcancer.org/es/sintomas/diagnostico/her2>
- j. <http://www.spps.gob.mx/programas-y-proyectos/cancer-de-mama.html>
- k. <http://www.who.int/topics/cancer/breastcancer/es/index1.html>
- l. <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/Bulletin/p53ablist.pdf>
- m. http://www.msdsalud.es/manual-merck-hogar.aspx?u=/publicaciones/mmerck_hogar/seccion_15/seccion_15_163.html
- n. http://bvs.insp.mx/rsp/articulos/articulo_e4.php?id=001671

14. APÉNDICE

Tabla 7. Valores promedio de los 6 datos de fluorescencia en el microarreglo de las proteínas de la vía p53 (Panorama SIGMA) de la relación de cáncer/benigno (C/B)

	Promedio (C/B)	Desviación estándar
ACETYLATED PROTEIN	0.61707752	0.35415308
Apaf1	1.12806927	1.12041552
ATM	0.92132357	0.11693667
ATM	0.9702465	0.14668359
BACH1	0.8395155	0.78847526
BAK	0.83230151	0.24607567
BAP1	0.71537703	0.24284962
b CATENIN	0.68893976	0.15472713
b CATENIN (pSer 33/37)	0.54645334	0.24483278
b CATENIN (pSer 45)	0.92577876	0.22774464
b CATENIN (pSer 33)	0.46866094	0.1137106
Bax	0.66840805	0.25760233
Bax	0.7232279	0.24626388
BID	0.71703297	0.17034495
Bcl-2	1.16182617	0.27772454
Bcl-2	33334.0716	51638.4316
Bcl-x	0.79822166	0.36545901
Bcl-xl	0.98189219	0.34938842
Caspase 3	0.99550349	0.2052016
Caspase 3, Active	1.41085715	0.34839458
Caspase 6	0.86920754	0.13466547
Caspase 9	0.71696274	0.4927689
Caspase 9	0.57581019	0.28011201
Cdc25A	33333.3712	51638.974
Cdc25c	0.90270365	0.14985109

c-Abl	0.9781536	0.14771574
Cdk1(p34cdc2)	1.2230615	1.01262003
Cdk4	0.83199271	0.15424816
Cdk7/CAK	0.72217379	0.25670483
Chk1	0.81945847	0.25188146
Chk2	0.89305199	0.20716254
Chk2	0.97253049	0.10680791
C-Myc	0.63000986	0.3391444
COX II	0.81533102	0.34486528
Cyclin A	0.81491449	0.33307614
Cyclin D1	1.17923114	0.30161466
Cyclin D1	0.96773905	0.62102687
Cyclin B1	1.22655393	0.32865582
Cyclin H	3.61275011	4.19214044
Daxx	0.95165966	0.09647323
DR5	12.4116179	15.7146838
E2F1	0.80810403	0.38919761
E2F2	1.00181279	0.07946826
E2F3	0.94837024	0.3131603
E2F4	0.81077614	0.2809504
FADD	1.19976938	0.41455623
Falkor/PHD1	1.3592511	0.69688693
FAS (CD95/AP0-1)	0.98059858	0.31452367
FAS LIGAND	0.86029588	0.34218842
GADD 153	29.7078577	45.3040126
GRP 75	0.324532	0.29972655
HDAC-1	30.1990943	45.3958202
HDAC-1	24.8830529	37.1428335
HSP 70	0.54635	0.2084538
HSP 90	33333.3387	51638.9992
JNK	23.6105968	35.1892989

JNK, Activated (Diphosphorylated JNK)	1.15434994	0.7508289
MAD1	0.92147864	0.36927158
MAD2	0.9415949	0.42753334
MAP Kinase Kinase (MEK, MAPKK)	0.78065903	0.35145435
MAP Kinase Kinase 4 (MKK4, SEK1, JNKK1)	0.88815101	0.21057242
MTBP	2.2552182	0.54745259
14-3-3 (Theta/tau)	1.83663931	1.5591272
MDM2	1.45179721	0.62635534
MDM2	1.24657736	0.55501
MDMX	0.91388805	0.44608169
p16INK4a/CDKN2	0.99357123	0.47707567
P14arf	1.37342272	0.61730108
p21WAF1/Cip1	1.01415381	0.94378946
P19INK4d	1.1163021	0.22196249
p38 MAP Kinase	0.8891116	0.33600771
p38 MAP Kinase, Activated (Diphosphorylated p38	1.01187596	1.00005352
p38 MAP Kinase, Non- Activated	0.95307055	0.07772115
p53	0.92052259	0.27772819
p53DINP1/SIP	1.25085997	0.91698798
p53R2 N terminal	1.14431867	0.67863757
PHOSPHO P53 (pSer 392)	16667.1352	40824.1096
P63	1.75154568	1.2401971
P63	1.58948412	0.84545691
p57kip2	1.51902046	0.61543838
PCAF	1.56416079	1.09925145
Proliferating Cell Nuclear Antigen	33333.2891	51639.0376

PERP	3.0914939	2.76993942
PEST	2.47707425	1.55809273
Phosphoserine	0.94097285	0.50099841
Phosphoserine	0.93398051	0.19328497
Phosphotyrosine	0.65098001	0.31017773
PID/MTA2	1.63221504	1.65779509
PKB a	0.89743343	0.21973875
PKB Phospho Ser 473	1.01596926	0.08004686
PKB Phospho Thr 308	0.96389105	0.05938537
PML	1.11873276	1.04019204
Protein Kinase C?	0.95310799	0.17902581
PTEN	1.15345693	0.27010525
PTEN	0.98842511	0.23687133
PUMA/bbc 3	2.58275358	0.46881447
p300/CBP	0.86204726	0.50819539
Siah2	0.64549724	0.39951487
Raf-1 /c-Raf	0.94204575	0.20936641
Raf-1	0.9836394	0.31405482
Retinoblastoma	1.04150597	0.29067626
phospho-Retinoblastoma (pSer 795)	1.25479968	0.2493704
SP1	0.77503382	0.50518003
Ubiquitin	0.84669885	0.40435401
Ubiquitin	1.00027643	0.17292873
b Actin	1.20476321	0.2805231
Actin	1.06094735	0.64811866
b Tubulin I	0.93268766	0.10054948
Ezrin	0.93211363	0.07798852
Fibronectin	1.00836655	0.17284955
Pan Cadherin	0.94742114	0.0451509
Pan Cytokeratin	0.93571981	0.20427647