

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

**BÚSQUEDA E IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS QUE SE EXPRESAN
DIFERENCIALMENTE EN TUMORES DE CÁNCER DE MAMA TRIPLE
NEGATIVO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS GENÓMICAS

P r e s e n t a :

L.O. Marcos Agustín Muñiz Lino

DIRECTOR DE TESIS:

DR. MARIO CÉSAR LÓPEZ CAMARILLO

México D.F.

Julio 2011

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS ©

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTOR

Dr. Mario César López Camarillo
Profesor Investigador. Laboratorio de Oncogenómica y Proteómica del Cáncer.
Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

ASESORES

Dra. Elena Aréchaga Ocampo
Laboratorio de Oncología Experimental
Instituto Nacional de Cancerología

Dra. Laurence Annie Marchat Marchau
Profesora titular del Programa Institucional de Biomedicina Molecular
Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía
Instituto Politécnico Nacional

Dra. Mavil López Casamichana
Profesora Investigadora. Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

LECTORES DE TESIS

Dra. Elizabeth Álvarez Sánchez
Profesora Investigadora. Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dra. Elena Aréchaga Ocampo
Laboratorio de Oncología Experimental
Instituto Nacional de Cancerología

Dra. Laurence Annie Marchat Marchau
Profesora titular del Programa Institucional de Biomedicina Molecular
Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía
Instituto Politécnico Nacional

Dra. Mavil López Casamichana
Profesora Investigadora. Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

El proyecto de investigación descrito en esta tesis contó con el respaldo académico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, a la cual agradezco profundamente.

Esta tesis forma parte del proyecto financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT: “Búsqueda de marcadores pronósticos mediante el análisis proteómico de biopsias de cáncer de mama triple negativo en población mexicana” (No. 112454).

Agradezco también al CONACyT la beca para estudios de Maestría otorgada durante el periodo agosto 2009 a julio 2011.

Agradezco de manera especial al Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal ICyT-DF el apoyo otorgado mediante el proyecto: ICyT 321 “Implementación de una plataforma de análisis proteómico aplicable al estudio de enfermedades humanas, infecciosas y de importancia veterinaria en el Distrito Federal.”

La mayoría del trabajo experimental plasmado en esta tesis, fue llevado a cabo en el laboratorio de Oncogenómica y Proteómica del Cáncer del Posgrado en Ciencias Genómicas, bajo la tutoría del Dr. César López Camarillo.

La participación del Instituto de Enfermedades de la Mama – FUCAM fue fundamental en este proyecto, le agradezco la donación de las biopsias tumorales y de tejido normal mamario que fueron utilizadas en este estudio.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. César López Camarillo por aceptarme en su grupo de trabajo, por el apoyo y tiempo que incondicionalmente me brindo, así como por ser ejemplo de empeño y dedicación.

A la Dra. Elena Aréchaga Ocampo por todo su apoyo académico, moral y en especie, por la franqueza en sus opiniones, por el ánimo dado, por la amabilidad y el entusiasmo mostrado.

A la Dra. Laurence Annie Marchat por su participación y disponibilidad a lo largo del proyecto y por darme su opinión sobre el mismo.

A la Dra. Mavil López Casamichana por el tiempo, el interés y las críticas realizadas hacia este trabajo.

A la Dra. Elizabeth Álvarez Sánchez por dedicarle tiempo imprevisto a la revisión de esta tesis, por su disponibilidad y por la gran importancia de sus observaciones.

Al Dr. Guillermo Mendoza por el apoyo brindado a este proyecto.

A los profesores del Posgrado en Ciencias Genómicas por las observaciones vertidas a este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio, Itzel López, Olga Hernández, Miguel Ángel Fonseca, Alí Flores, Lidia López, Rubiceli Medina, Ángel Merino y Nayeli Ramírez, por la amistad y el apoyo que me brindaron.

A mis compañeros de generación, Roberto Gamboa, Diana López, José Luis Villalpando, Alma Villalobos, Alí Flores, Miguel Ángel del Moral, Daniel Ortega, y Berenice Gil, que con su apoyo, amistad, humildad y compañerismo hicieron de este periodo una etapa muy agradable en mi vida.

Dedicatorias

A mis padres Rosalina Lino y Marcos Muñiz

Por darme la vida, por su comprensión, por su apoyo y porque a pesar de las circunstancias, me han hecho crecer como un hombre de bien.

A mis hermanos Lina Ángela, Roberto y Eduardo

Por siempre estar presentes cuando los he necesitado, porque todos esos momentos adversos no mermaron en nada la felicidad que hemos y seguiremos compartiendo, y por aguantarme

A mis sobrinos Eyla Natalia y Aarón Eduardo

Por lo esperanzadores que me resultan cuando veo sus ojos, por la alegría que me obsequian y por el cambio tan hermoso que dieron a nuestras vidas

A Dafne Aketzalli

Por entrar a mi vida, por compartir esos momentos conmigo, por la inspiración que me das y por la nobleza y sensibilidad que en ocasiones mal vista por extraños, te caracteriza

A mí querido Instituto Politécnico Nacional

Que a pesar de haberme ofrecido ya dos carreras clínicas, me dio las bases, capacidad y visión para desarrollarme en otras áreas.

Sin ustedes, cualquier grado académico representa nada

INDICE

	Página
ABREVIATURAS	i
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABLAS	iv
I. INTRODUCCIÓN	
1. Antecedentes generales del tema.	1
1.1. Morfología de la glándula mamaria.	1
1.2. Generalidades del cáncer de mama.	2
1.3. Estadísticas de morbilidad y mortalidad del cáncer de mama a nivel mundial.	4
1.4. Estadísticas de morbilidad y mortalidad del cáncer de mama en México.	5
1.5. Clasificación del cáncer de mama.	9
1.5.1. Clasificación clínica del cáncer de mama.	9
1.5.2. Clasificación histopatológica del cáncer de mama.	10
1.5.3. Clasificación del cáncer de mama por receptores hormonales.	12
1.5.4. Clasificación del cáncer de mama por perfiles de expresión génica.	14
2. Estado del arte.	
2.1. El cáncer de mama en México.	17
2.2. Marcadores moleculares del cáncer de mama.	18
3. Antecedentes particulares del proyecto.	
3.1. El cáncer de mama triple negativo.	21
3.2. Genómica del cáncer de mama triple negativo.	22
3.3. Proteómica del cáncer de mama triple negativo.	26
4. Importancia de continuar el estudio.	28
5. Hipótesis.	29

II. OBJETIVOS	
1.1 Objetivo general.	30
1.2 Objetivos particulares.	30
III. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	31
IV. METODOLOGÍA	
1.1. Biopsias de tumores de mama triple negativo y tejido mamario sano.	33
1.2. Extracción de proteínas de biopsias de cáncer de mama triple negativo y tejido mamario sano.	33
1.3. Purificación de proteínas totales de los tumores triple negativo.	34
1.4. Cuantificación de las proteínas purificadas.	35
1.5. Electroforesis de proteínas en doble dimensión (2-D).	36
1.6. Tinción de proteínas en geles con SYPRO Ruby, visualización y fotodocumentación de los geles de doble dimensión.	36
1.7. Análisis de los geles en doble dimensión, escisión de los puntos e identificación mediante espectrometría de masas ESI/MS-MS.	37
1.8. Cultivo y mantenimiento de líneas celulares.	37
1.9. Ensayos de Western blot	38
V. RESULTADOS	
1.1 Selección de las biopsias tumorales utilizadas en la obtención de los perfiles proteómicos.	40
1.2. Extracción, purificación y cuantificación de proteínas de las biopsias de tumores de mama triple negativo.	43
1.3. Perfiles proteómicos de tumores de mama triple negativo y tejido normal.	46
1.4. Análisis comparativo de los perfiles tumorales y normales mediante PDQuest y escisión de puntos.	50
1.5. Identificación de las proteínas seleccionadas mediante espectrometría de masas ESI- MS/MS.	55
1.6. Selección del Inhibidor de la disociación Rho GDP isoforma 2 (Rho GDI2) para validación.	57
1.7. Evaluación de Rho GDI2 en las biopsias originales de las que se obtuvieron los perfiles proteómicos.	62

1.8. Evaluación de Rho GDI2 por Western blot en un número mayor de biopsias de tumores de mama triple negativo, luminales y HER2.	63
1.9. Evaluación de Rho GDI 2 por Western blot en líneas celulares de diferentes órganos.	72
VI. DISCUSIÓN	75
VII. CONCLUSIONES	81
VIII. BIBLIOGRAFÍA	83

ABREVIATURAS

CACU	Cáncer Cervicouterino
ASR	Age Standardized Ratio
DF	Distrito Federal
OMS	Organización Mundial de la Salud
IARC	International Agency for Research of Cancer
FUCAM	Fundación Mexicana de Fomento Educativo para la Prevención y Detección Oportuna del Cáncer de Mama
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
INEGI	Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática
TNM	Tumor, Nódulos, Metástasis
RE	Receptores de Estrógenos
RP	Receptores de Progesterona
HER2	Human Epidermal Receptor 2
GRB7	Growth Factor Receptor-Bound Protein-7 Gene
TN	Triple Negativo
CK	Citoqueratina
BRCA1	Breast Cancer 1
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
CGH	Comparative Genomic Hybridization
KDa	Kilodalton
ml	Mililitro
μl	Microlitro
mg	Miligramo
μg	Microgramo
min	Minutos
M	Molar
mM	Milimolar
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
FGFR2	Fibroblast Growth Factor Receptor 2
BUB3	Budding Uninhibited By Benzimidazoles 3 Homolog
IEF	Isoelectroenfoque
2D-DIGE	Two Dimensional Difference Gel Electrophoresis

HSP70	Heat Shock Protein 70
HSP90	Heat Shock Protein 90
DTT	Ditiotreitol
PAGE	Poliacrilamide Gel Electrophoresis
NaCl	Cloruro de Sodio
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
TEMED	N,N,N',N', Tetrametilen-Diamina
IPG	Isoelectrofocusing pH Gradient
MAT	Microarreglo de Tejidos
IHC	Inmunohistoquímica
V/h	Volts/hora
V	Volts
TA	Temperatura Ambiente
BSA	Bovine Serum Albumin
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PBS	Phosphate Buffer Saline
EDTA	Etilen Diamino Tetra Acético
siRNA	Small Interference Ribonucleic Acid
Rho GDI 2	Rho Guanosin Dissociation Inhibitor 2
ARN	Acido Ribonucleico
GEF	Guanin Exchange Factor
GAP	Guanin Activating Protein
MCF-7	Michigan Cancer Foundation – 7
HPV	Human Papiloma Virus
HV	Hepatitis Virus
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Morfología de la mama.

Figura 2. Incidencia del cáncer de mama a nivel mundial.

Figura 3. Tasas estandarizadas de mortalidad por cáncer de mama y cáncer cervicouterino de 1979 a 2006 en México.

Figura 4. Clasificación histopatológica del cáncer de mama.

Figura 5. Clasificación del cáncer de mama por expresión de receptores hormonales.

Figura 6. Genómica comparativa del cáncer de mama triple negativo.

Figura 7. Diagrama de flujo de la estrategia experimental.

Figura 8. Geles SDS-PAGE que muestran la integridad de los extractos proteicos totales obtenidos de las biopsias.

Figura 9. Perfiles proteómicos en 2D obtenidos de los tejidos mamarios normales y tumorales.

Figura 10. Perfiles proteómicos obtenidos de las biopsias mamarias triple negativo pareadas 95, 97 y 101.

Figura 11. Puntos identificados en el análisis comparativo PDQuest del primer grupo de tumores triple negativo.

Figura 12. Detalle del análisis PDQuest del primer bloque de biopsias.

Figura 13. Puntos identificados en el segundo grupo de biopsias.

Figura 14. Detalle de los puntos escindidos después de incluir el segundo grupo de biopsias.

Figura 15. Análisis de la expresión de Rho GDI2 a través de perfiles proteómicos en 2D.

Figura 16. Regulación de las Rho GTPasas.

Figura 17. Inmunodetección de Rho GDI 2 en las biopsias originales utilizadas para obtener los perfiles proteómicos.

Figura 18. Evaluación a través de Western blot de la expresión de la proteína Rho GDI 2 en biopsias de tejido normal y tumoral triple negativo.

Figura 19. Evaluación a través de Western blot de la expresión de la proteína Rho GDI 2 en biopsias de tejido normal y tumoral con fenotipo luminal.

Figura 20. Evaluación a través de Western blot de la expresión de la proteína Rho GDI 2 en biopsias de tejido normal y tumoral con fenotipo Her2+.

Figura 21. Expresión relativa respecto a tejido normal de Rho GDI 2 en los grupos tumorales triple negativo, luminales y Her2+

Figura 22. Evaluación de la expresión de la proteína Rho GDI2 por Western blot en diversas líneas celulares.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Incidencia y mortalidad del cáncer de mama en el mundo y en México.

Tabla 2. Clasificación del cáncer de mama mediante perfiles globales de expresión génica.

Tabla 3. Marcadores moleculares utilizados en cáncer de mama.

Tabla 4. Genes que se encontraron modulados mediante perfiles de expresión génica de tumores de mama triple negativos.

Tabla 5. Proteínas que presentan expresión diferencial en cáncer de mama triple negativo.

Tabla 6. Características clínicas de las pacientes que participaron en el presente estudio.

Tabla 7. Concentración de las proteínas obtenidas de las muestras tumorales y normales que fueron usadas para obtener los perfiles proteómicos.

Tabla 8. Proteínas identificadas por espectrometría de masas ESI-MS/MS.

Tabla 9. Características clínicas de las pacientes que participaron en la evaluación por Western blot de la expresión de la proteína Rho GDI 2.

Tabla 10. Expresión relativa de Rho GDI2 en las biopsias triple negativo, luminales y Her2+.

Tabla 11. Líneas celulares en las cuales se analizó la expresión de RhoGDI2.

I.INTRODUCCIÓN

1. Antecedentes generales del tema.

1.1. Morfología de la glándula mamaria.

Las glándulas mamarias ó mamas son los órganos encargados de la producción de leche en los mamíferos, están situadas en la pared anterior del tórax y se extienden verticalmente desde la segunda a la sexta costilla y horizontalmente desde el esternón hasta la línea axilar media. Están compuestas por 15 a 20 lóbulos de tejido glandular túbulo-alveolar que se encuentran separados por bandas fibrosas de tejido conectivo, en forma radiada, que alcanzan la dermis para formar los ligamentos suspensorios de la mama. Cada lóbulo mamario termina en un conducto excretor lactífero ó galactofórico que antes de abrirse en el pezón, presenta una dilatación llamada seno o ampolla galactofórica. La areola contiene glándulas sebáceas accesorias que forman pequeñas eminencias llamadas tubérculos de Montgomery. El tejido adiposo de la mama está distribuida en pequeñas celdas adiposas excepto en la región detrás de la areola (Figura 1). El aporte arterial de la mama se establece a través de las arterias mamaria interna, intercostal posterior y ramas de la arteria axilar; las venas de la mama siguen el mismo patrón de las arterias, formando un círculo anastomósico alrededor de la base de los pezones. La glándula mamaria cuenta con dos redes linfáticas, en primer lugar el plexo superficial, por el cual drenan la areola y el pezón, por otro lado el plexo axilar al cual drena la glándula a través de plexos perilobulares. La inervación sensitiva de la mama procede de las ramas cutáneas anterior del segundo al sexto nervios intercostales. Una pequeña zona superior de la piel de la mama está inervada por ramas cutáneas del plexo cervical superficial y ramas del nervio supraclavicular (1).

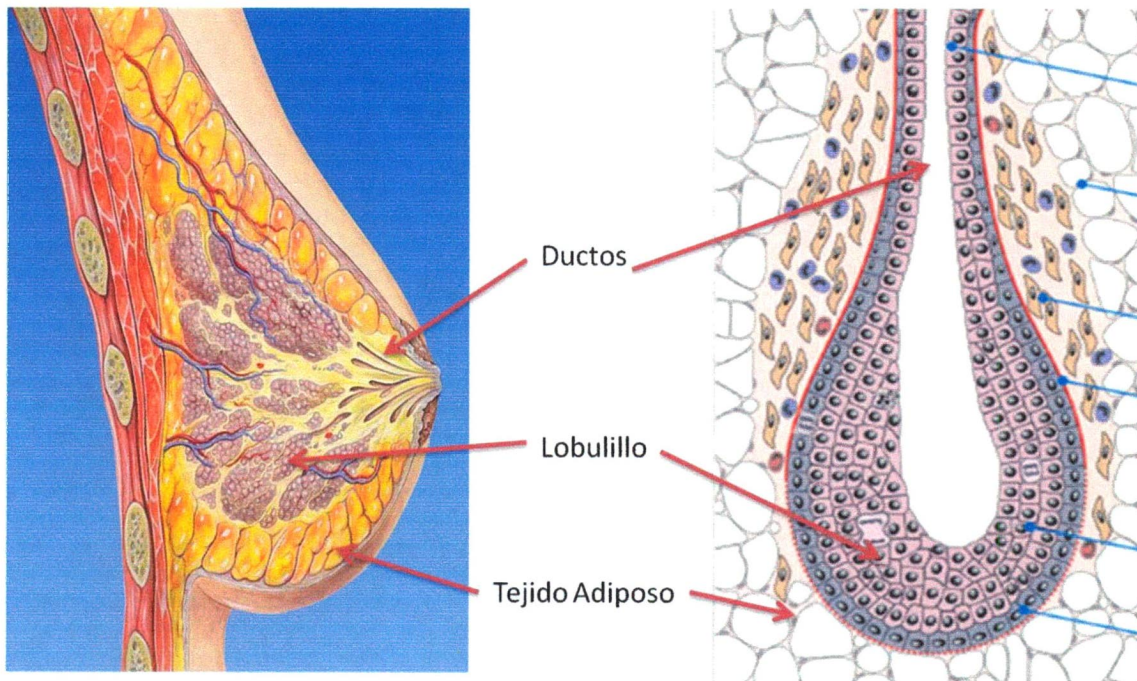


Figura 1. Morfología de la mama. Representaciones gráficas de un corte sagital de una mama y de un corte histológico de una unidad funcional de la glándula mamaria, en las que se observa la estructura básica, compuesta de lobulillos, ductos, tejido de sostén y tejido adiposo. Tomada y modificada de Mark D Sternlicht y col. *Breast Cancer Research* 2006, 8:201. Key stages in mammary gland development (56).

Figura 1. Morfología de la mama. Representaciones gráficas de un corte sagital de una mama y de un corte histológico de una unidad funcional de la glándula mamaria, en las que se observa la estructura básica, compuesta de lobulillos, ductos, tejido de sostén y tejido adiposo. Tomada y modificada de Mark D Steinhilber y col. Breast Cancer Research 2008; 8:201. Key stages in mammary gland development (56).

1.2. Generalidades del cáncer de mama.

El término neoplasia proviene del griego y significa “nuevo crecimiento” y se define como la proliferación anormal y descontrolada de las células de un órgano o tejido. Muchas neoplasias proliferan hasta formar una “masa” o tumor, estos tumores pueden ser malignos o benignos, según lleven a la formación de metástasis o no, respectivamente. El término cáncer es usado ampliamente como sinónimo de neoplasia maligna y es usado de manera general para muchas enfermedades que son caracterizadas por crecimiento anormal y descontrolado de las células, de estas neoplasias las más comunes son los carcinomas, los cuales derivan del tejido epitelial (2).

El cáncer de mama es el cáncer más común en las mujeres a nivel mundial y es la causa más importante de muertes por enfermedades neoplásicas en las mujeres. Alrededor del 80% de las neoplasias de la mama se originan en el epitelio de los ductos que forman la mama (2,3). El cáncer de mama comprende un diverso grupo de enfermedades en términos de presentación, morfología, características biológicas y comportamientos clínicos.

1.3. Estadísticas de morbilidad y mortalidad del cáncer de mama a nivel mundial.

El cáncer de mama es la enfermedad tumoral más frecuente en mujeres de todo el mundo. Según las estadísticas de la agencia internacional Globocan en el año 2008, se registraron 1, 150,000 casos lo que corresponde a una tasa ajustada por edad (ASR, por sus siglas Age Standardized Ratio) de 37.4 por 100,000 mujeres. En los países más desarrollados la ASR es de 67.8 y en los menos desarrollados es de 23.8 (Figura 2). En cuanto a la mortalidad, los datos muestran que el cáncer de mama es la principal causa de muerte por enfermedades oncológicas en las mujeres. En 2002 se registraron 411,000 muertes al año en el mundo a causa de esta enfermedad (11). En los países más y menos desarrollados, las tasas de mortalidad por cáncer de mama fueron de 18.1 y 10.3 respectivamente. Se considera que 1 de cada 8 mujeres en USA desarrollará esta enfermedad y que 1 en 28 tienen riesgo de morir por la misma.

Aunque en los países más desarrollados el número de nuevos casos es mayor que en los países pobres, existe un mayor índice de mortalidad en estos últimos, dando cuenta del efecto en la salud pública de los procedimientos eficaces de detección y tratamiento que se lleva a cabo en los países industrializados (Tabla 1) (5). En la tabla 1 se observa que a pesar de que en los países de mayor desarrollo hay una tasa mayor de incidencia que en los países de menor desarrollo, esta relación no se conserva en cuanto a la mortalidad, debido a que los países menos desarrollados tienen mayores índices de mortalidad por cáncer de mama.

1.4. Estadísticas de morbilidad y mortalidad del cáncer de mama en México.

El cáncer de mama es hoy, a diferencia de hace 15 años, una de las enfermedades con mayor incidencia en la mujer adulta de América Latina y el Caribe. En México, el cáncer de mama es la primera causa de mortalidad por tumores malignos en mujeres, la mortalidad por cáncer de mama superó a la del cáncer cervicouterino desde el año 2006, colocándolo como la segunda causa de muerte en el país en mujeres entre 30 y 54 años, sólo después de las muertes causadas por complicaciones de la Diabetes Mellitus (Figura 3). La tasa de mortalidad por cáncer mamario en México ha registrado un aumento sustancial de 1950 a 2008, pasando de una tasa de 2 por 100,000 mujeres a 9 por 100,000 mujeres (2-5).

Del total de defunciones por cáncer de mama registradas en México en el año 2000, el 70% se concentró en 11 entidades que incluyen el Distrito Federal, Estado de México, Nayarit, Veracruz, Puebla, Guanajuato, Tamaulipas, Coahuila, Jalisco, Nuevo León y Chihuahua. Sin embargo, las tasas más altas de mortalidad se ubican en los estados que cuentan con mejores índices de desarrollo tales como el D.F, Jalisco, Tamaulipas, Coahuila, Nuevo León, Chihuahua, Sonora y Baja California Sur, los cuales presentan tasas superiores a 17 defunciones por cada 100, 000 mujeres.

Cáncer de mama

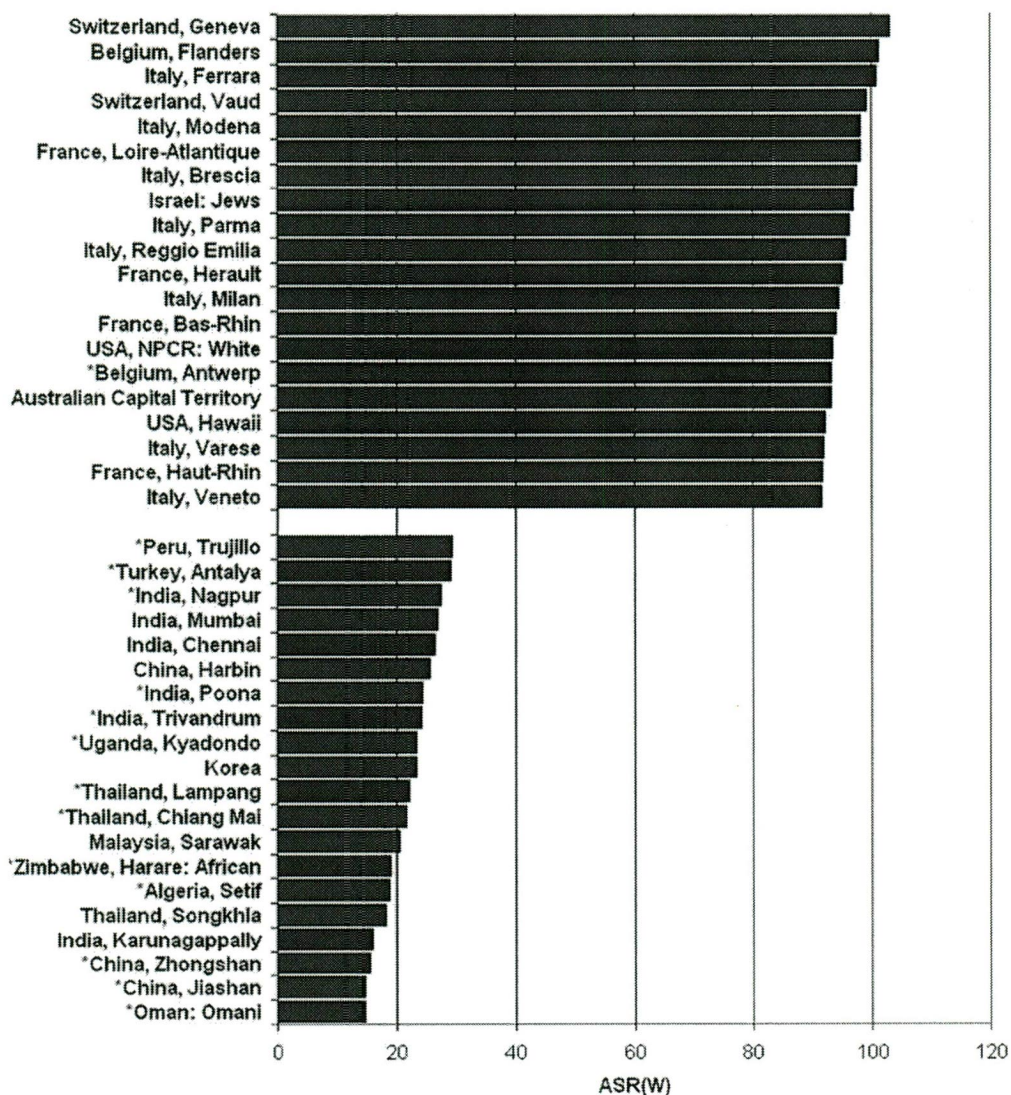


Figura 2. Incidencia del cáncer de mama a nivel mundial. La imagen muestra una proporción mayor de incidencia de cáncer de mama en países desarrollados y una incidencia menor en los países en vías de desarrollo, expresados en ASR (Tasa estandarizada por edad). Tomada y modificada de “World Cancer Report 2008”, World Health Organization (3).

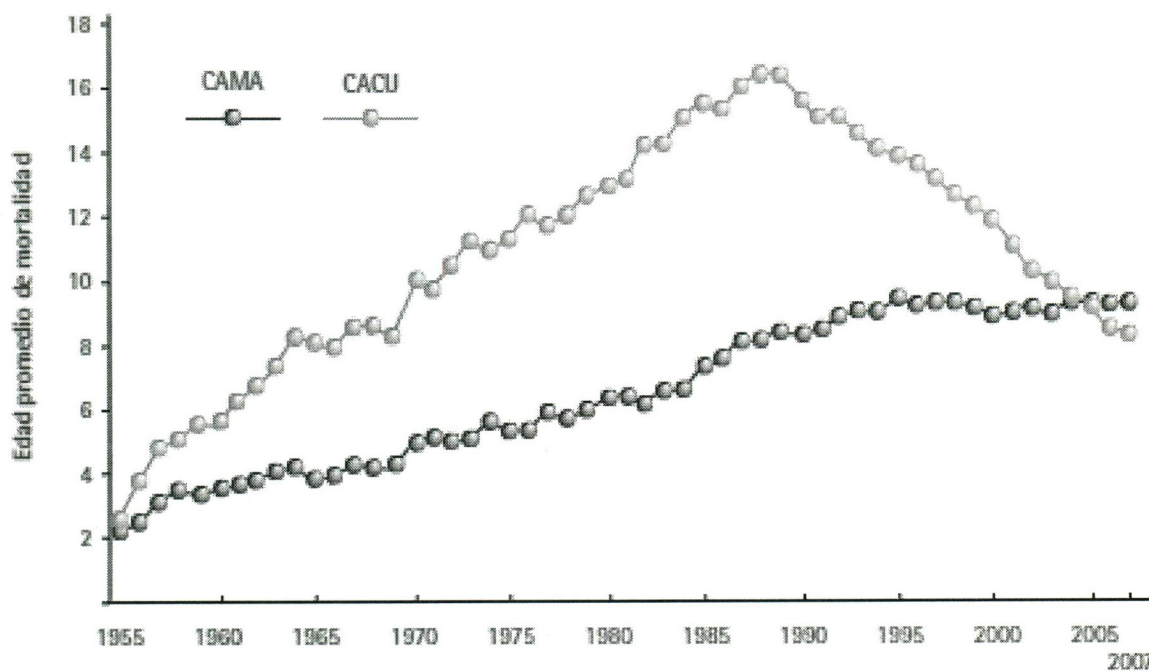


Figura 3. Tasas estandarizadas de mortalidad por cáncer de mama y cáncer cervicouterino de 1979 a 2006 en México. A partir del año 2006 el cáncer de mama (CaMa) superó al cáncer cervicouterino (CaCu) como principal causa de mortalidad por enfermedades oncológicas en mujeres de 30 a 54 años. Tomada de México Reporte Rosa 2009-2010 (56).

Tabla 1. Incidencia y mortalidad del cáncer de mama en el mundo y en México.

Región o país	Nuevos casos	Muertes	ASR (%)	
			Morbilidad	Mortalidad
Mundial	1, 151,298	410, 712	37.4	13.2
Más desarrollados	636, 128	189, 765	67.8	18.1
Menos desarrollados	514, 072	220, 648	23.8	10.3
México	11, 064	4,310	26.4	10.5

Tomada de "World Cancer Report 2008", World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, Lyon (3).

1.5. Clasificación del cáncer de mama.

Actualmente la clasificación del cáncer de mama, involucra la evaluación y análisis de criterios clínicos, histológicos, moleculares, e inmunohistoquímicos (8). El cáncer típicamente es diagnosticado por patólogos en secciones histológicas teñidas generalmente con hematoxilina y eosina, así como por inmunohistoquímica, sin embargo recientemente, muchos tumores han sido caracterizados por sus perfiles moleculares, los cuales complementan a la histopatología y su uso se encuentra en aumento para predecir el pronóstico y la respuesta a la terapia.

Para asegurar una clasificación internacional histopatológica estándar del cáncer, la Organización Mundial de la Salud (OMS) a partir de 1957 publicó “La clasificación OMS de los tumores”, la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) ha sido encargada de la publicación de la clasificación OMS de los tumores desde el año 2000. En las últimas ediciones se refleja el rápido progreso en el entendimiento de los mecanismos moleculares del desarrollo del cáncer, lo que ha dado origen a distintas clasificaciones del cáncer de mama (3).

1.5.1. Clasificación clínica del cáncer de mama.

La clasificación clínica del cáncer de mama comprende el análisis de parámetros patológicos tradicionales, tales como el tamaño tumoral, la invasión de células tumorales a ganglios linfáticos, la proporción de células tumorales en un corte histológico de una biopsia y la presencia o no de metástasis. Esta clasificación clínica constituye la clasificación TNM.

El tamaño de un tumor puede dar idea del tiempo de progresión de la enfermedad. La ausencia de tumor se designa como T0, tumores con tamaño menor a 1 cm son designados como T1, tumores que miden de 1 a 2 cm como T2, y T3 a neoplasias mayores a 2 cm. La invasión a nódulos linfáticos, es designada con la inicial "N", en donde N0, indica la ausencia de infiltrado tumoral en ganglios linfáticos adyacentes a la zona donde está localizado el tumor, N1 cuando están involucrados de 1 a 3 ganglios, N2 cuando existen 3 a 9 ganglios invadidos y N3 para más de 10 ganglios con infiltrado tumoral. El grado histológico suele estratificarse en 2 categorías como tumores de bajo grado y tumores de alto grado, dependiendo de la proporción de células cancerosas presentes en el corte histopatológico. La presencia de metástasis es designada como "M", es establecida como M0 para ausencia de metástasis y M1 para presencia de metástasis, seguido por el órgano y localización de la misma. Estos criterios son ampliamente utilizados en la práctica médica oncológica y han mostrado correlación con el pronóstico de los pacientes (13, 14).

1.5.2. Clasificación histopatológica del cáncer de mama.

Por otro lado, la clasificación clínica del cáncer de mama incluye la clasificación histopatológica, establecida bajo consenso internacional y publicado por la IARC de la OMS en el año 2003, dicha clasificación agrupa los tumores de mama como no invasores e invasores. Los tumores de mama no invasores están subdivididos solo por la localización que pueden presentar, ya sea ductal o lobulillar y los tumores invasores se clasifican, además de por su localización ductal y lobulillar, también por los patrones que puede adoptar el tejido canceroso, es decir, tubular, medular, mucinoso, secretor papilar, adenoide quístico, metaplásico y apócrino (Figura 4) (15).

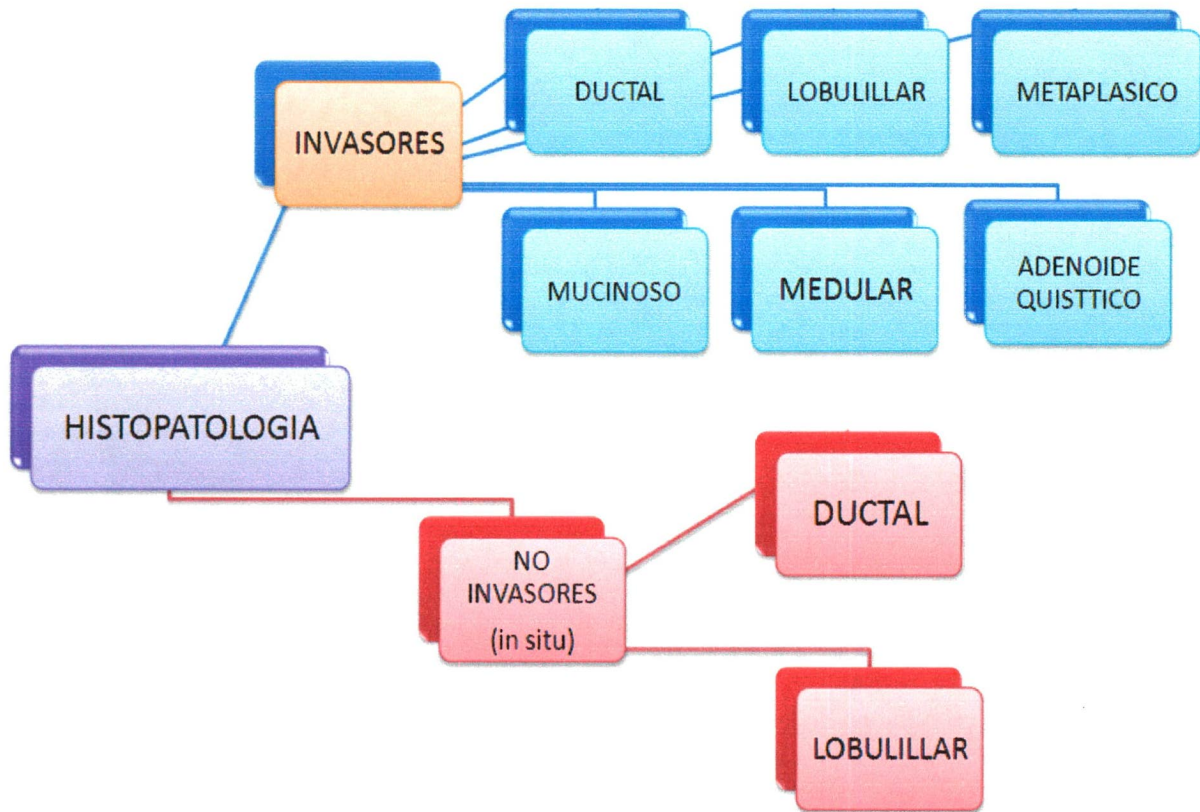


Figura 4. Clasificación histopatológica del cáncer de mama. Histopatológicamente el cáncer de mama suele clasificarse en dos grupos: i) los tumores no invasores, los cuales sólo se subclasifican de acuerdo a la localización la cual puede ser ductal o lobulillar, y ii) los tumores invasores que también se subclasifican de acuerdo a su localización, de igual manera en ductales o lobulillares y por los diferentes patrones histológicos que pueden adoptar, tales como mucinoso, medular, adenoide quístico y metaplásico.

1.5.3. Clasificación del cáncer de mama por receptores hormonales.

La clasificación llevada a cabo mediante técnicas inmunohistoquímicas es usada tradicionalmente en la práctica médica como factor pronóstico y de tratamiento. Esta, agrupa a los tumores de mama en tres tipos, de acuerdo a la presencia o ausencia de los receptores de estrógenos (RE), receptores de progesterona (RP) y sobreexpresión o amplificación del gen del receptor del factor de crecimiento epidermal humano 2 (HER2). En base a tinción inmunohistoquímica de estas proteínas, los tumores pueden clasificarse en tres grupos: i) Luminal, presentan expresión de receptores ER+, PR+ y HER2- y pueden ser tratados con terapia hormonal (tamoxifeno) acompañada de quimioterapia adyuvante; ii) Her2+, que presentan expresión ER+, PR+ y HER2+, los cuales reciben adicionalmente terapia personalizada mediante el uso del anticuerpo monoclonal anti-HER2 Trastuzumab y iii) Triple negativo que no presentan la expresión de receptores (ER-, PR- y HER2-). En consecuencia estos últimos son denominados tumores triple negativo para los cuales a falta de blancos terapéuticos, la quimioterapia representa la única modalidad de terapia sistémica (11).

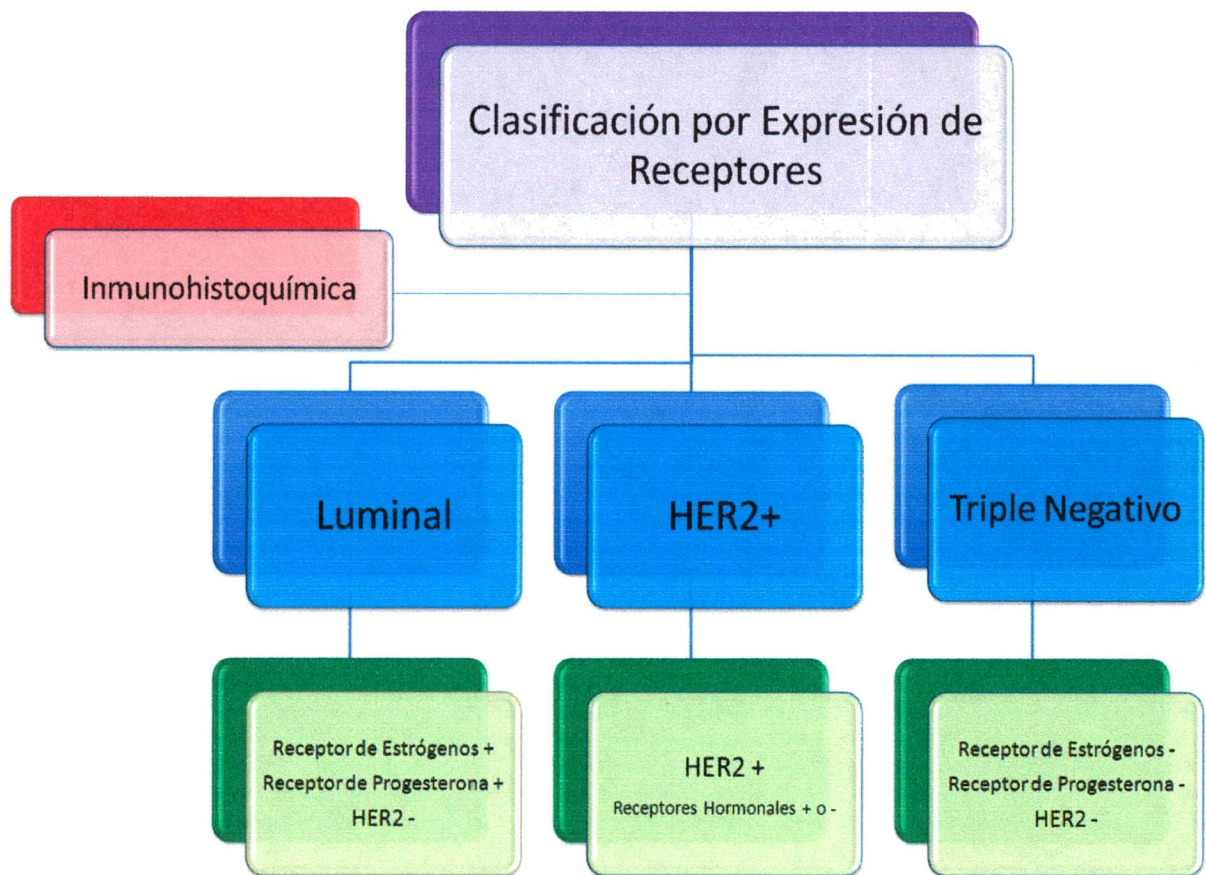


Figura 5. Clasificación del cáncer de mama por expresión de receptores hormonales. Las biopsias de tejido tumoral de cáncer de mama suelen procesarse mediante inmunohistoquímica para analizar la expresión de los receptores de estrógenos, receptores de progesterona y receptores de crecimiento epidermal humano 2 y son clasificados como luminales, HER2 y triple negativos.

1.5.4. Clasificación del cáncer de mama por perfiles de expresión génica.

La tipificación molecular del cáncer de mama está definida por los perfiles globales de expresión génica obtenidos mediante microarreglos de ADN. Recientemente se determinó que la heterogeneidad morfológica y molecular del cáncer de mama puede ser clasificada de acuerdo a estos perfiles de expresión génica mediante el uso de microarreglos de ADN (14). Estos hallazgos han sido corroborados de manera sistémica por varios grupos de investigación (14-18). Estos datos permiten clasificar al cáncer de mama en 5 grupos: luminal A, luminal B, normal-like, HER2/neu y basal-like. Algunos autores los clasifican en 2 grandes grupos basados en la presencia o no del Receptor de Estrógenos (RE), un primer grupo con expresión positiva de dicho receptor y subclasificada en luminal A y luminal B y un segundo grupo sin expresión del receptor de estrógenos el cual es subdividido en 3 tipos, "normal Breast", HER2/neu y basal-like (Tabla 2).

Diversos estudios han validado la utilidad clínica de la clasificación en términos de predicción de recurrencia, metástasis y mortalidad (15-17). Los tumores clasificados como luminales tienen un patrón de expresión que concuerda con el componente epitelial del lumen de los conductos de la glándula mamaria, entre los cuales se hallan las citoqueratinas (CK) 8/18, RE y genes asociados con su activación como LIV1 y CCND1. Menos del 20% de los tumores luminales presentan mutaciones en el gen p53 y con frecuencia son de grado I; el luminal tipo A se caracteriza por la alta expresión del RE y baja expresión de genes relacionados con la proliferación celular en comparación con el luminal tipo B.

En cuanto a los tumores clasificados como RE negativo, encontramos el subtipo HER2 (ERBB2) caracterizado por la sobreexpresión de genes dentro del amplicón ERBB2 localizado en el cromosoma 17q22.24, tales como el gen del receptor de unión a la proteína 7 (GRB7). La sobreexpresión de HER2 implica un pobre pronóstico, originado principalmente por conferir alto riesgo de recaída temprana. El subtipo basal-like es caracterizado por la expresión de genes relacionados a células epiteliales basales y mioepiteliales normales presentes en la mama, además de estar acompañado de alta expresión de CK 5/6 y 17 y genes relacionados a la proliferación celular, como FABP7, p53, p63 y BRCA1 (8, 13, 33, 34). Se ha determinado que el grupo basal-like está enriquecido en tumores triple negativo los cuales poseen un comportamiento más agresivo, presentan un patrón de metástasis diferente y predicen un mal pronóstico a pesar de responder inicialmente a la quimioterapia (21).

Tabla 2. Clasificación del cáncer de mama mediante perfiles globales de expresión génica.

Receptor de Estrógenos Positivo (RE+)		Receptor de Estrógenos Negativo (RE-)		
Luminal A	Luminal B	HER2	Basal-like	Normal breast
Sobreexpresión de: c-kit ATF-3 c-fos fosB jun-D	Sobreexpresión de: Tirosin fosfatasa IV RAD21 BAP1	Sobreexpresión de: HER2 MDR1 Sintasa de ácidos grasos RAL-B RAB6A Fibronectina	Sobreexpresión de: CK 5/6 CK 17 FABP7 p53 p63 BRCA1 Topoisomerasa II	Expresión de genes relacionados a células epiteliales basales y mioepiteliales normales presentes en la mama
Baja expresión de: PCNA CDC2 BUB1 MAD2L1	Baja expresión de: FGFR CXCR4 ATF-4	Baja expresión de: c-Kit c-Myc	MAD2L1 CDC2 PCNA	

2. Estado del arte.

2.1. El cáncer de mama en México.

El 46% de las mujeres mexicanas con cáncer de mama tiene una edad promedio que oscila entre los 40 a los 49 años (40), lo cual contrasta con los datos observados en Estados Unidos, donde la edad promedio de incidencia del cáncer de mama es a los 63 años y para Europa en edad postmenopáusica, es decir, después de los 55 años de edad (7).

En un reporte reciente, se calculó el costo de atención de los pacientes con cáncer de mama tratadas en el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS); se analizó una cohorte de 1904 casos diagnosticados en 2002 y se observó que solo el 12% se diagnostica en fase I temprana, 40% en la fase II y 48% en las fases tardías III y IV. El costo de atención para las mujeres diagnosticadas en la etapa I fue de 74, 522 pesos, comparado con 102, 042 en la etapa II, 154, 018 en la etapa III y 199, 274 en la etapa IV. El costo promedio por año-paciente se estimó en 110, 459 pesos (11).

En México han sido pocos los estudios realizados que tratan de identificar mutaciones genómicas específicas de nuestra población. En 2004, se reportaron cambios cromosómicos encontrados mediante la técnica de hibridación genómica comparativa en cáncer de mama en población mexicana (41).

2.2. Marcadores moleculares del cáncer de mama.

Los análisis histológicos de tumores de mama, por sí solos, no representan una adecuada estrategia para ofrecer un valor pronóstico ni para la planeación de tratamientos específicos. Tradicionalmente, los factores de pronóstico para el cáncer de mama incluían el tamaño tumoral, el estado de los nódulos linfáticos y el grado histológico. El interés en nuevos marcadores de pronóstico está basado en el hecho de que en un significativo número de pacientes en etapa inicial de la enfermedad no pueden evaluarse dichos factores. Nuevas tecnologías para predecir y clasificar el cáncer son constantemente desarrolladas, y han dado lugar a caracterizar molecularmente algunos tipos de tumores.

Un gran número de marcadores moleculares han sido estudiados por su capacidad para predecir el pronóstico y la respuesta a la terapia y han sido clasificados de acuerdo a su utilidad en marcadores de proliferación, marcadores relacionados a angiogénesis y marcadores relacionados a apoptosis (Tabla 3). Los marcadores de la tasa de proliferación son un importante factor pronóstico en cáncer de mama, métodos como la inmunohistoquímica han sido ampliamente utilizados para detectar proteínas sobreexpresadas durante el ciclo celular. A este respecto se ha estudiado ampliamente a Ki-67 como antígeno nuclear encontrado en células en fase proliferativa, pero no en células en fase de arresto del ciclo. Evidencia sugiere que los pacientes que muestran una sobreexpresión de ki-67 en más del 50% de células, tienen un alto riesgo de recurrencia de la enfermedad. Marcadores como el receptor de estrógenos y el receptor de progesterona son evaluados rutinariamente en las biopsias de mujeres que han sido sometidas a cirugía para extirpación tumoral.

Estos receptores actúan como reguladores hormono-dependientes de la transcripción y tienen una función importante en la patofisiología del desarrollo del cáncer de mama. La sobreexpresión de los receptores hormonales, medida por inmunohistoquímica, está claramente establecida como factor pronóstico y además su utilidad en la planeación del tratamiento personalizado es crucial.

Por otra parte, es bien sabido que los tumores sólidos necesitan desarrollar una red de vasos sanguíneos para recibir aporte de nutrientes y en consecuencia sobrevivir, esta formación de vasos llamada angiogénesis está mediada por factores de crecimiento que incluyen el factor de crecimiento endotelial, el factor de crecimiento de células endoteliales derivado de plaquetas y proteínas de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos (44), por lo que son utilizados como marcadores moleculares de angiogénesis.

Bajos niveles de apoptosis pueden llevar a la acumulación de células tumorales. Marcadores moleculares involucrados en procesos de apoptosis, tales como Bcl-2 han sido descritos como factores pronósticos en cáncer de mama. Bcl-2 es una proteína mitocondrial que inhibe la apoptosis desencadenada por radioterapia y quimioterapéuticos. Se ha mostrado que los tumores de cáncer de mama que no presentan la sobreexpresión de Bcl-2 responden mejor al tratamiento con quimioterapéuticos (45).

Tabla 3. Marcadores moleculares utilizados en cáncer de mama.

Marcadores de proliferación	Marcadores de angiogénesis	Marcadores de Apoptosis
Ki-67	Factor de crecimiento endotelial vascular	BCL-2
Receptor de estrógenos	Angiogenina	BCL-X _L
Receptor de progesterona	Angiopoyetina 1	MCL-1
Receptor del factor de crecimiento epidermal humano 2	Factor de crecimiento de los fibroblastos	A-1/BEL-1
Catepsina D	Interleucina B	BCL-W
Plasmina	Leptina	BOO/DIVA
Activador de plasminogéno tipo urokinasa	Factor de crecimiento placentario	NR-13
Colagenasa	Factor de crecimiento endotelial derivado de plaquetas	
Ciclina D	Pleiotropina	
Ciclina E	Factor de crecimiento transformante alfa	
p53		

3. Antecedentes particulares del proyecto.

3.1. El cáncer de mama triple negativo.

Los carcinomas triple negativo representan entre el 16 al 20% de todos los tumores mamarios (20-25) y han despertado gran atención en la comunidad oncológica debido a sus características clínicas. Estos carcinomas son frecuentes en mujeres jóvenes menores de 50 años, Afroamericanas, en su mayoría se presentan como grado histológico 3 y presentan un comportamiento muy agresivo. El pico de recurrencia se observa entre el primer y tercer año y la mayoría de las muertes ocurren durante los 5 años posteriores al inicio de la terapia (22-24). Se ha observado que los tumores triple negativo y basal-like conllevan a una supervivencia más corta después del primer evento de metástasis (27).

Pacientes con carcinomas clasificados como triple negativo que expresan un fenotipo basal, presentan una supervivencia libre de enfermedad significativamente más corta en comparación con aquellas que carecen de la expresión de los marcadores basales CK 5/6 y EGFR, por lo que se debe tener precaución de no igualar un fenotipo triple negativo con un perfil basal-like (25, 30). Por otra parte, se han observado mutaciones en p53 y la proteína BRCA1 se ha encontrado disfuncional en carcinomas triple negativo y basal-like (28, 29). Evidencia circunstancial muestra que esta disfunción está asociada a un incremento en la sensibilidad de los tumores a agentes que inducen cross-linking en el ADN, tales como las sales de platino y los inhibidores de la poli ADP-ribosa (30, 31), por lo que permite vislumbrar nuevas estrategias terapéuticas las cuales se encuentran en desarrollo en pruebas clínicas.

Sin embargo, aunque los carcinomas triple negativo responden a la quimioterapia neoadyuvante (21, 32), la supervivencia de las pacientes es baja, por lo que su manejo requiere de métodos de intervención aun más agresivos. En consecuencia, el desarrollo de nuevas terapias sistémicas basadas en las características biológicas de estos tumores es de gran importancia y puede representar un gran desafío que sólo puede superarse en base al conocimiento de la gran complejidad de este grupo heterogéneo de carcinomas.

3.2. Genómica del cáncer de mama triple negativo.

En los tumores de mama triple negativo aún no se han identificado marcadores moleculares específicos que pudieran ser utilizados para valorar su pronóstico o su respuesta al tratamiento, sin embargo algunos estudios se han diseñado para caracterizar el perfil de expresión genético de dichos de tumores. Al respecto, en 2007 (42) fue publicado un estudio en el cual a través de perfiles globales de expresión génica mediante microarreglos de ADN se analizaron 102 tumores de mama invasivos con fenotipos luminales y HER2+, así como 97 tumores de mama triple negativo. El perfil de expresión que fue descrito se agrupó en conjuntos de genes que incluyeron citoqueratinas basales, genes de proliferación, genes apócrino-luminales, genes apócrino-basales, genes de proteínas reguladas por interferón y genes asociados a inmunoglobulinas (Tabla 4).

Por otro lado, un análisis basado en microarreglos de alta resolución de hibridación genómica comparativa (aCGH) en tumores de mama triple negativo para la localización de genes sobreexpresados y amplificados, concluyó que los tumores de mama triple negativo son genéticamente heterogéneos. Aunque se lograron identificar genes significativamente sobreexpresados y amplificados como los oncogenes FGFR2, BUB3, RAB20, PKN1, y NOTCH3, ningún foco de amplificación estuvo presente en una alta frecuencia (Figura 6). La amplificación y sobreexpresión del gen FGFR2 en un subgrupo que apenas representa el 4% de los tumores triple negativo analizados (n=165), ejemplifica la alta heterogeneidad genética de dichos tumores (38).

Tabla 4. Genes que se encontraron modulados mediante perfiles de expresión génica de tumores de mama triple negativo.

Citoqueratinas basales	Proliferación	Apócrino- luminales	Apócrino- basales	Regulados por interferón	Asociados a inmunoglobulinas
CK5	BUB1	AR	EGFR	STAT1	IGHG1
CK6	BIRC5	FASN	CLDN1	CASP1	IGHG3
CK12	H2AFZ	MSX2	VLDLR	IFIH1	IgLL1
CK16	CCNA2			CXCL10	IGHV1-69
CK17	CDC2				

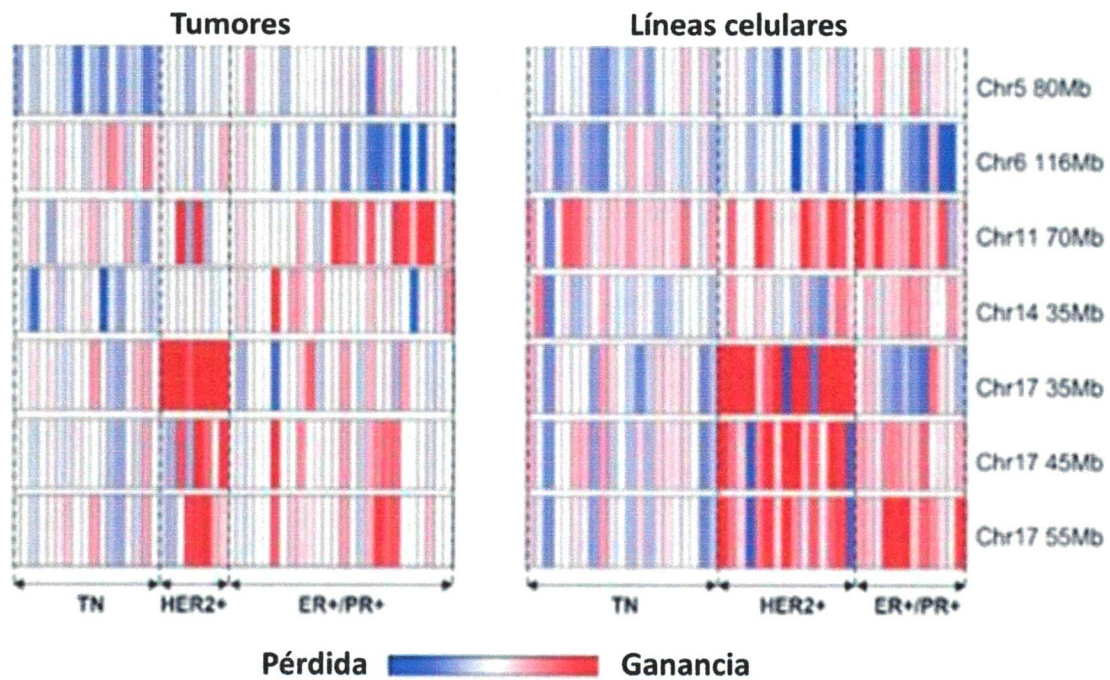


Figura 6. Genómica comparativa del cáncer de mama triple negativo. Alteraciones en el número de copias génicas asociadas a subtipos de cáncer de mama. Tanto en las biopsias de los tumores triple negativos como en las líneas celulares con fenotipo triple negativo muestran mayor pérdida en el número de copias de genes localizados en el cromosoma 17. Tomada y modificada de Turner N y col. *Oncogene* 2010, 29, 2013-2023 (38).

3.3. Proteómica del cáncer de mama triple negativo.

Recientemente, se ha demostrado que los perfiles de expresión de proteínas pueden mejorar la exactitud de detección y pronóstico del cáncer de mama. En este estudio, mediante el uso de proteómica y espectrometría de masas con desorción/ionización laser de superficie y tiempo de vuelo (SELDI-TOF MS), se describió que los subgrupos identificados por perfiles proteómicos son análogos a la clasificación de los tumores basados en perfiles de expresión génica, es decir, luminales, basales y HER2 (36).

La gran heterogeneidad genética y las características clínicas de los tumores de mama triple negativo han despertado el interés de la comunidad por encontrar moléculas específicas de dichos tumores. Características como la alta tasa de metástasis de los tumores triple negativo han sido evaluadas en modelos de metástasis de cáncer de mama triple negativo en ratón TA2, los cuales espontáneamente desarrollan cáncer de mama con un fenotipo triple negativo y producen metástasis pulmonar. En este estudio, a través de la evaluación de perfiles proteómicos, fueron identificadas y validadas por inmunohistoquímica 8 proteínas (14-3 -3, HSP70, HSP90, moesina, tubulina, actina, vimentina y CK 18) que se expresaron diferencialmente entre tumores de mama triple negativo metastásicos y no metastásicos (43). Perfiles diferenciales de expresión proteómica en cáncer de mama triple negativo han sido obtenidos recientemente utilizando técnicas con marcaje fluorescente de proteínas (2D-DIGE). En este estudio se describieron patrones de expresión diferencial de varias proteínas como enzimas glicolíticas, CK's y proteínas estructurales, además de validarlas a través de Western blot e inmunohistoquímica (Tabla 5) (37).

Tabla 5. Proteínas que presentan expresión diferencial en cáncer de mama triple negativo.

Enzimas glicolíticas	Citoqueratinas	Proteínas Estructurales
MDH2	8	Vimentina
PGK1	9	Fibronectina
TKT	14	L-plastina
Aldolasa 1	17	Anexina
	19	NME1-NME2

4. IMPORTANCIA DE CONTINUAR CON EL ESTUDIO

El cáncer de mama es actualmente la primera causa de muerte por cáncer en mujeres en todo el mundo y representa un problema alarmante en México, con una tendencia a seguir aumentando.

El análisis proteómico de los tumores de cáncer de mama pueden dar indicios de los mecanismos que participan en la carcinogénesis en este tejido glandular, a la vez que proteínas identificadas pudieran ser candidatas a ser utilizadas como nuevos blancos moleculares para estudio, pronóstico o tratamiento del cáncer de mama con fenotipo triple negativo. La mejora de las estrategias de detección oportuna de este padecimiento, puede permitir el desarrollo de mejores servicios médicos y métodos novedosos de la detección de la predisposición al cáncer, así como el establecimiento de terapias personalizadas.

El interés concreto en el estudio de los carcinomas triple negativo se debe a la falta de terapias dirigidas contra este grupo de pacientes, lo cual se refleja en un aumento en el índice de mortalidad y número de recaídas. Para desarrollar nuevas estrategias contra los carcinomas triple negativo, es esencial conocer las proteínas participantes y dilucidar las rutas celulares específicas que se ven afectadas durante el proceso de carcinogénesis de este subgrupo de tumores.

5. HIPÓTESIS

Los tumores de mama con fenotipo triple negativo presentarán perfiles proteómicos diferenciales en comparación con el tejido mamario sano y con otros fenotipos, por lo que las proteínas que presenten expresión diferencial podrían estar involucradas en el desarrollo y/o progresión del cáncer de mama triple negativo.

II. OBJETIVOS.

1.1 Objetivo general.

Búsqueda e identificación de proteínas que se expresen diferencialmente entre tejido mamario sano y biopsias de tejido de cáncer de mama con fenotipo triple negativo.

1.2. Objetivos particulares.

1. Obtener y comparar los perfiles proteómicos de biopsias de cáncer de mama triple negativo, así como de las biopsias de tejido sano provenientes de la misma paciente.
2. Identificar por los menos 5 proteínas que presenten expresión entre tumores de mama triple negativo y tejido mamario sano.
3. Validar la expresión de una de las proteínas identificadas como diferenciales en un mayor número de biopsias mamarias.
4. Correlacionar la expresión de las proteínas identificadas con la información clínica de los pacientes.
5. Analizar la expresión de al menos una de las proteínas identificadas, en líneas celulares tumorales de mama, cervix, pulmón, hígado y próstata.

III. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.

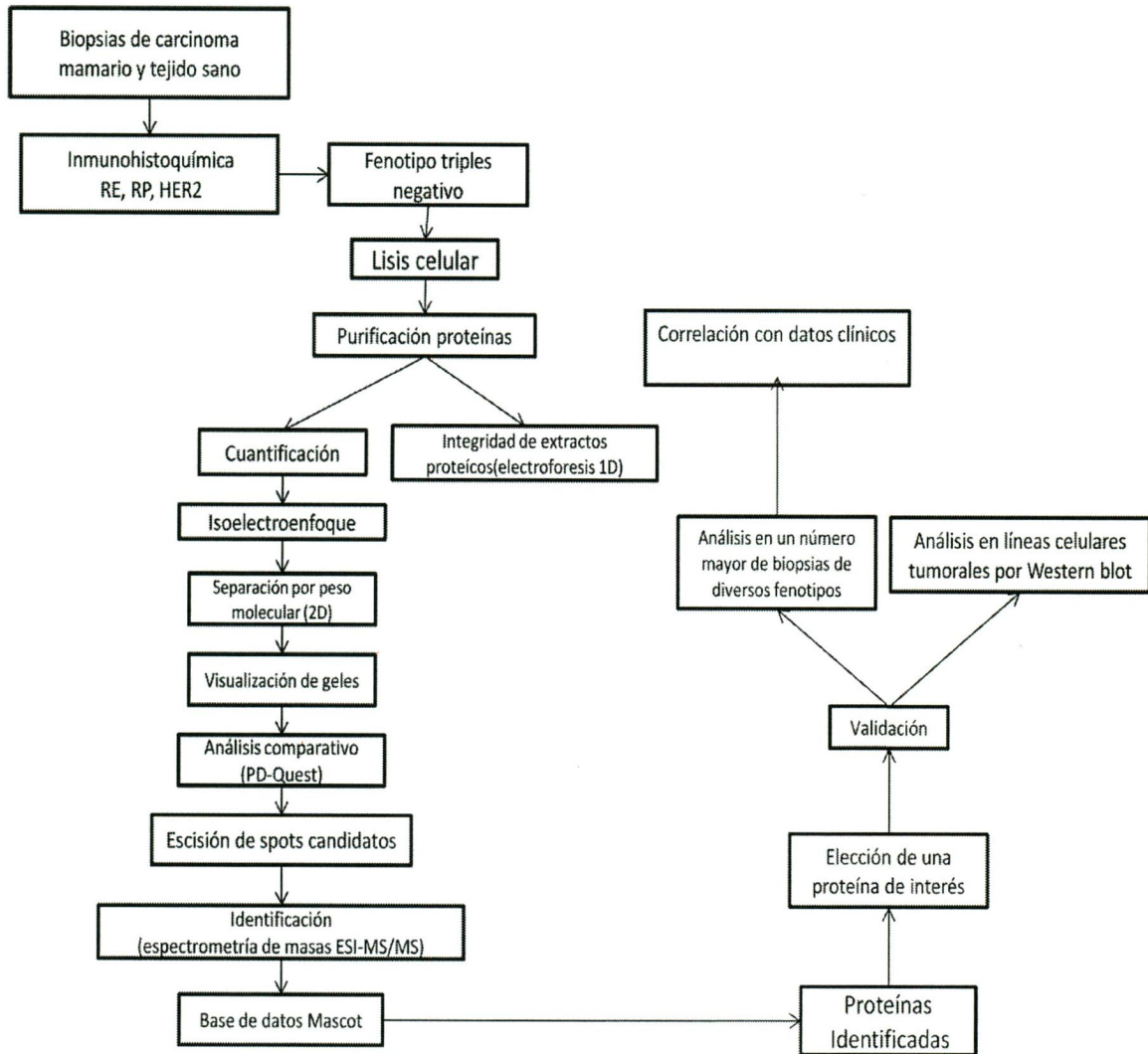


Figura 7. Diagrama de flujo de la estrategia experimental. Tanto el tejido tumoral como el tejido sano fueron procesados siguiendo el protocolo de electroforesis en doble dimensión, iniciando por la extracción, purificación, cuantificación y evaluación de la integridad de extractos, para después llevar a cabo la separación proteica por punto

isoeléctrico mediante isoelectroenfoque y posteriormente separación en gel por peso molecular. Después de llevar a cabo el protocolo de tinción, visualización y fotodocumentación, se procedió al análisis comparativo de los perfiles mediante el software PDQuest, para después escindir los spots candidatos e identificarlos mediante espectrometría de masas ESI-MS/MS. Una proteína fue elegida para llevar a cabo la validación, por un lado mediante el análisis de su expresión en un número mayor de biopsias de tejido sano y tumoral y por otro, mediante el análisis de su expresión en diversas líneas celulares.

IV. METODOLOGÍA

1.1 Biopsias de tumores de mama triple negativo y tejido mamario sano.

Tras haber obtenido el consentimiento informado de las pacientes, las biopsias fueron obtenidas por médicos cirujanos del FUCAM, los especímenes fueron analizados por un médico patólogo, quien evaluó la celularidad de la muestra a través de una impronta, a fin de seleccionar las muestras con una celularidad de por lo menos 70%, las cuales fueron limpiadas, fraccionadas y preservadas en el crioprotector tissue-tek a una temperatura de -80 °C. Los criterios de inclusión fueron los siguientes: a) pacientes con diagnóstico de cáncer de mama primario, b) pacientes que no hayan tenido tratamiento previo, c) que se cuente con su expediente clínico íntegro. Los criterios de inclusión tumorales fueron: a) diagnóstico histopatológico, b) tamaño igual o mayor a 0.5 cm, c) celularidad de por lo menos 70%, d) fenotipo triple negativo y e) poseer tejido mamario sano adyacente de la misma paciente.

1.2 Extracción de proteínas de biopsias de cáncer de mama triple negativo y tejido sano.

Las muestras fueron homogenizadas en 0.960 ml de buffer TNTE 0.5% a 4°C mezclado con inhibidores de proteasas (COMPLETE ROCHE), la homogenización se llevó a cabo con disrupción flexible utilizando el equipo rotor TissueRuptor (QIAGEN), el producto homogenizado fue centrifugado a 14,000 rpm/5 min 4°C. Con el sobrenadante recuperado se procedió a realizar la purificación de proteínas.

1.3. Purificación de proteínas totales de los tumores triple negativo.

La purificación de las proteínas se llevó a cabo mediante el kit "readyprep 2-D Cleanup kit" (BioRad), el cual facilita la preparación de muestras con baja conductividad ideales para el isoelectroenfoque (IEF) y la electroforesis en 2D. Además de concentrar las muestras que son muy diluidas. El kit puede ser empleado con casi cualquier muestra de proteína reduciendo el barrido, tinción de fondo y otros artefactos asociados con sustancias que contaminan las muestras 2D/IEF. Se transfirieron 500 µg de proteína en un volumen final de 100 µl a un tubo de microcentrifuga, se adicionaron 300 µl de agente precipitante 1 a la muestra de proteína y se mezcló con vortex. Se incubó por 15 min, se adicionaron 300 µl del agente precipitante 2 y se mezcló con vortex. Se centrifugó el tubo a 14000 rpm por 5 min a 4°C hasta formar una pastilla, se desechó el sobrenadante cuidadosamente con ayuda de una pipeta y se adicionaron 40 µl del agente de lavado 1 en la parte superficial de la pastilla. Se centrifugó el tubo a 14000 rpm por 5 min a 4°C y con una pipeta se removió el sobrenadante. Se adicionaron 25 µl de agua ultrapura en la parte superior de la pastilla y se resuspendió con vortex durante 20 s. Se adicionó 1 ml de agente de lavado 2 (pre-enfriado a -20°C al menos 1h) y 5 µl del aditivo de lavado 2 y se mezcló con vortex por un min. Se incubó el tubo a -20°C por 30 min, mezclando con vortex cada 10 min, se centrifugó el tubo a 14,000 rpm por 5 min 4°C y se desechó el sobrenadante. La pastilla se secó a temperatura ambiente durante 5 min y se resuspendió en 150 µl de buffer de rehidratación (Urea 8M, CHAPS 4% y DTT 80 mM), preparado inmediatamente antes de usarse. Se agitó vigorosamente durante 30 s y el tubo se incubó a temperatura ambiente durante 5 min, se agitó una vez más durante 1 min hasta que la pastilla fue

resuspendida totalmente. Finalmente se centrifugó el tubo a 14,000 rpm por 5 min 4°C para clarificar la muestra de proteínas. Se recuperó el sobrenadante, el cual se utilizó para rehidratar las tiras de isoelectroenfoque.

1.4. Cuantificación de las proteínas purificadas.

Se pasó la solución de Bradford de 4°C (temperatura de almacenamiento) a temperatura ambiente, se preparó una curva estándar con proteína BSA (Bovine Serum Albumin) con rango de 0 a 25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, colocando cantidades de 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20 y 25 μl de BSA a concentración conocida de 1 mg/ml, así como la cantidad suficiente de NaCl para alcanzar un volumen total de 20 μl . De la muestra de proteínas totales problema se colocó 1 μl . Inmediatamente antes de llevar a cabo la medición espectrofotométrica se adicionaron 500 μl solución de Bradford y se incubó durante 3 min.

Los estándares y la muestra se mezclaron perfectamente durante 20 s en vortex y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente. La absorbancia de los estándares y la muestra de extractos se midieron en espectrofotómetro a 595 nm. El estándar número 1 (0.0 μg de proteína) se utilizó como blanco. Después de cuantificar los extractos totales se analizó su integridad en geles SDS-PAGE al 12%, normalmente se colocaron en cada carril 40 μg de proteínas purificadas.

1.5. Electroforesis de proteínas en doble dimensión (2-D).

200 µg de proteínas fueron diluidas en buffer de rehidratación (8M de urea, 4% de CHAPS, 80 mM DTT, 0.5% de anfotericina B pH 3-10, azul de bromofenol 0.002%) en un volumen final de 200µl. Las muestras se aplicaron en tiras de IPG de 11 cm, pH 4-7 (Bio-Rad). El isoelectroenfoque (IEF) se realizó en un sistema de IPGphor (Bio-Rad), a una corriente de 50 ampers/tira. Los parámetros de enfoque fueron los siguientes: paso 1 gradiente de 0 a 250V por 30 min, paso 2 gradiente de 250 V a 8,000 V por 4 hrs, paso 3 constante a 8,000 V, hasta dar un total de 50,000 volts/hr. Previo a la segunda dimensión, las proteínas fueron reducidas con DTT y alquiladas con iodoacetamida en solución de equilibrio (6M de urea, 2% SDS, 0.375M de Tris-HCl pH 8.8, 20% de glicerol con 2% de DTT para solución del primer lavado y 2.5% de iodoacetamida para el segundo lavado). Las proteínas presentes en la tira IPG fueron resueltas mediante SDS-PAGE al 13% usando un sistema de electroforesis vertical (Hoefer) a 200 V constante.

1.6. Tinción de proteínas en geles con SYPRO Ruby, visualización y fotodocumentación de los geles de doble dimensión.

Los geles fueron agitados en solución de fijación (metanol 50%, ácido acético 7%) durante 1 h, posteriormente les fue agregado el reactivo SYPRO Ruby (Invitrogen) durante toda la noche. A las 12 hrs, el reactivo fue decantado y los geles fueron colocados en agitación durante 30 min en solución de lavado (metanol 10%, ácido acético 7%). Finalmente, los geles fueron lavados con agua durante 5 min y

visualizados en el fotodocumentador Fuji Film FLA 5100 utilizando una emisión de excitación de 532 nm.

1.7. Análisis de los geles en doble dimensión, escisión de los puntos e identificación mediante espectrometría de masas ESI/MS-MS.

Las geles teñidos con SYPRO Ruby protein gel stain (Invitrogen) fueron analizados comparativamente con el software PDQuest (BioRad) y los puntos identificados como diferencialmente expresados fueron escindidos del gel de manera manual utilizando puntas de pipetas de 1 a 250 μ L estériles. Las proteínas se identificaron por espectrometría de masas ESI/MS-MS. El análisis se realizó mediante la digestión de los péptidos utilizando tripsina para su posterior conversión a iones en fase gaseosa mediante una ionización-desorción laser y separación según su relación masa-carga (m/z). El análisis de masas de los péptidos se realizó utilizando la base de datos MASCOT. Los péptidos se identificaron comparando con las secuencias de humano en las bases de datos del NCBI. Finalmente, se realizó un análisis bioinformático estándar de las secuencias predichas de aminoácidos utilizando los programas BLAST, Clustal W, Pfam y Prosite, entre otros.

1.8. Cultivo y mantenimiento de líneas celulares.

Las líneas celulares de próstata DU-145 y PWR-1E, de pulmón A-549 y H-1944, de cérvix HeLa, de hígado HepG2 y de mama MCF-7 y MDA-MB231 fueron descongeladas directamente de -80°C a 37°C y resuspendidas en 1 ml de medio de cultivo DMEM o DMEM-F12, según fuera la línea de la que se tratara. Se centrifugó a

1200 rpm por 5 min a 4 °C, se retiró el medio de cultivo sobrenadante y la pastilla de células fue nuevamente resuspendida en 1 ml de medio de cultivo, el cual fue agregado a las cajas de 25cm². Posteriormente, se incubó durante 4 hrs y las células adheridas fueron lavadas con PBS y colocadas en medio de cultivo nuevo. Una vez que las células llegaron al 80% de confluencia, fueron divididas para lo cual se agregó una solución de 1.5ml de PBS-EDTA con 64 µl de tripsina al 0.25% y se incubó durante 5 min para después centrifugarlas a 1600 rpm durante 5 min a 4°C. La pastilla celular obtenida fue resuspendida en 2 ml de medio de cultivo y sembradas en 2 cajas de 25 cm² o 75 cm². Una vez que las líneas celulares contaban ya con 3 pases de división, se procedió a obtener extractos proteicos, despegando las células con solución PBS-EDTA-Tripsina y una vez obtenida la pastilla por centrifugación se resuspendió en una solución de 960 µl TNTE 0.5% y 40 µl de Inhibidores de proteasas 20 mM, la cual se incubó en hielo durante 15 min en agitación, para después centrifugarlas a 14000 rpm durante 5 min a 4°C, que permitió obtener la fracción soluble proteica que fue almacenada a -80°C para después ser analizadas por Western blot.

1.9. Ensayos de Western blot

40 µg de muestra de extractos totales de proteínas obtenidas de las líneas celulares de cáncer cervicouterino (HeLa y SiHa), próstata (DU145), próstata normal (PWR-1E), pulmón (H1944 y A-549), colon (SW480), mama (MCF7 y MDA-MB231) e hígado (HepG2) fueron calentadas a 90°C durante 5 min y cargadas con micropuntas en geles de acrilamida al 13% y se realizó electroforesis. El gel se equilibró en 50 ml de buffer de transferencia durante 10 min. Las proteínas fueron transferidas a membranas

de nitrocelulosa en cámara húmeda con una corriente de 400 mA durante 1 h. Posteriormente las membranas fueron bloqueadas con 25 ml de PBS- leche 5% durante 1 hr. Las membranas fueron lavadas en 2 ocasiones con 25 ml de PBS-Tween 0.1% durante 2 min. Después de esto las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario en dilución 1:100 con PBS durante toda la noche. Al día siguiente las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario correspondiente en dilución 1:2000 en PBS-Tween 0.1% durante 1 hora. Las membranas fueron lavadas en 3 ocasiones durante 10 min con 25 ml de PBS-Tween 0.1%. La unión del anticuerpo primario con la proteína de interés fue evidenciada mediante quimioluminiscencia y autoradiografía usando el kit ECL (Amersham).

V. RESULTADOS

1.1. Selección de las biopsias tumorales utilizadas en la obtención de los perfiles proteómicos.

En el presente estudio se utilizaron biopsias de tumores de mama que fueron donadas en colaboración con el Instituto de Enfermedades de la mama - FUCAM. Para la obtención de los perfiles proteómicos se seleccionaron un total de 7 biopsias de pacientes que previo diagnóstico de cáncer de mama primario y obtención de consentimiento informado fueron sometidas a cirugía. La edad de las pacientes osciló entre los 40 a 60 años. En cuanto al tamaño, 3 tumores tuvieron un tamaño menor a 2 cm, 3 tumores un tamaño entre 2 a 5 cm y 1 tumor fue mayor a 5 cm en el momento del acto quirúrgico, sin embargo, para este estudio solo se utilizaron secciones de 8 mm a 1.5 cm.

Los tumores triple negativo en su mayoría se presentan histológicamente como invasivos, por lo cual se seleccionaron 4 tumores ductales invasivos, 1 carcinoma adenoide quístico, 1 carcinoma lobulillar y 1 carcinoma ductal *in situ*. La expresión de receptores de los 7 tumores utilizados fue negativa para receptor de estrógenos, receptor de progesterona y receptor del factor de crecimiento epidermal humano 2, es decir, presentaban un fenotipo triple negativo. En cuanto al estadio clínico, 3 pacientes se encontraban en etapa I (tamaño tumoral menor a 2 cm, sin invasión de ganglios linfáticos y sin presencia de metástasis) y 4 pacientes en etapa II (tamaño tumoral mayor a 2 cm, sin invasión a ganglios linfáticos o con invasión en 1 a 3 ganglios y sin metástasis).

En cuanto al estadio nodular, 4 pacientes no tenían invasión metastásica, 1 paciente tenía involucramiento grado 1 y de 2 pacientes se desconocía su estado de invasión ganglionar (Tabla 6).

De cada una de las pacientes se contó tanto con muestra tumoral como con tejido mamario normal, mismo que fue obtenido en el mismo acto quirúrgico de tejido sano adyacente a la zona donde se presentó el tumor.

Tabla 6. Características clínicas de las pacientes que participaron en el presente estudio.

Características	Total
Pacientes	7
Edad (años)	
40 – 50	2
51 – 60	5
Tamaño del tumor (cm)	
<2	3
>2	3
>5	1
Tipo histológico	
Carcinoma adenoide quístico	1
Carcinoma lobulillar	1
Carcinoma ductal in situ	1
Carcinoma ductal invasivo	4
Expresión de receptores	
Triple negativo	7
Estadio clínico	
I	3
II	4
Estadio nodular	
N0	4
N1	1
Desconocido	2

1.2. Extracción, purificación y cuantificación de proteínas de las biopsias de tumores de mama triple negativo.

De acuerdo a la metodología descrita previamente, se procedió a obtener los proteomas de las muestras de tejido normal y tejido tumoral de mama, procediendo con la extracción, purificación y cuantificación de las proteínas totales obtenidas de cada una de las biopsias. En una primera etapa fueron seleccionadas y procesadas las muestras 35, 94, 104 y 181, tanto el tumor como el tejido normal de cada una de ellas y en una segunda etapa las biopsias 95, 97 y 101. Se inició con su descongelamiento y retiro de material crioprotector (Tissue tek), para después llevar a cabo disrupción flexible del total de la muestra mediante el equipo TissueRuptor (Quiagen) en buffer TNTE adicionado con inhibidores de proteasas, el cual permitió la obtención de proteínas totales. Dichos extractos fueron procesados mediante el kit de purificación readyprep 2-D Cleanup kit (BioRad) y cuantificados a través del método espectrofotométrico de Bradford (Tabla 7).

Finalmente los extractos purificados fueron visualizados en un gel de poliacrilamida para corroborar la integridad de las proteínas. Se observó que las proteínas purificadas contaban con una adecuada calidad de extracción, sin embargo se hizo evidente la gran cantidad de proteínas con peso molecular aproximado a 60 kDa, que corresponde al peso molecular aproximado de la albumina la cual representó un problema en la obtención de perfiles proteómicos en 2D (Figura 8).

Tabla 7. Concentración de las proteínas obtenidas de las muestras tumorales y normales que fueron usadas para obtener los perfiles proteómicos.

Número de muestra	Tejido tumoral ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Tejido normal ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
35	10.5222	12.0612
94	11.1275	24.2115
104	2.800	4.907
181	2.65175	7.888
95	2.382	2.612
97	11.9745	12.032
101	5.4455	5.599

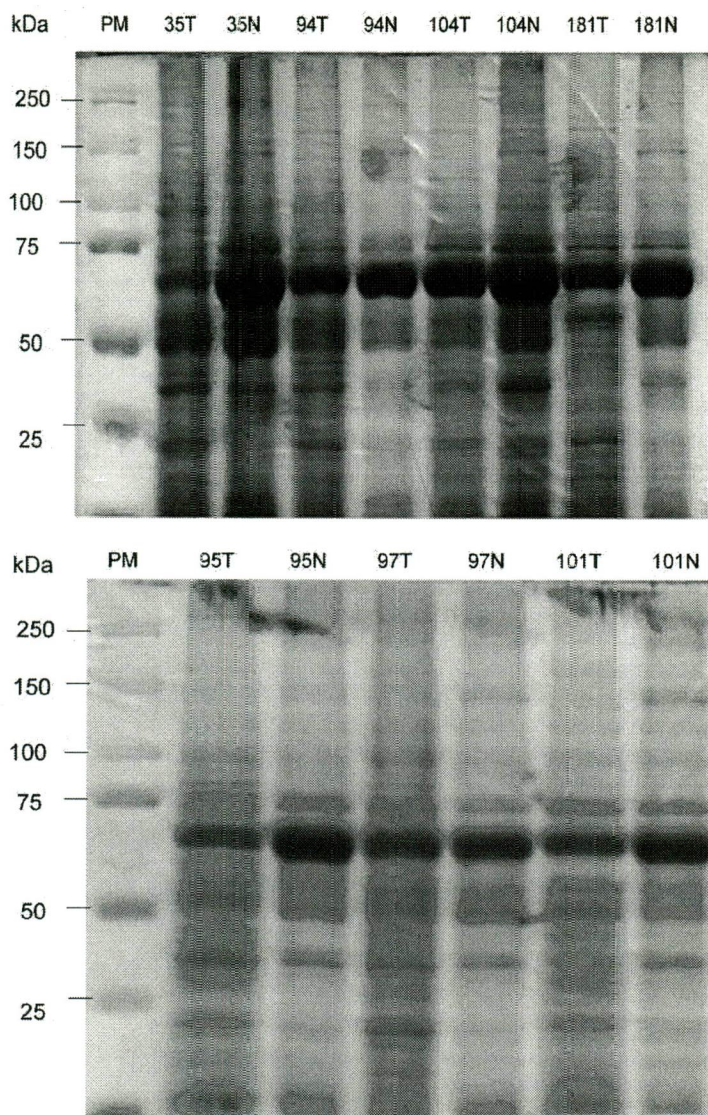


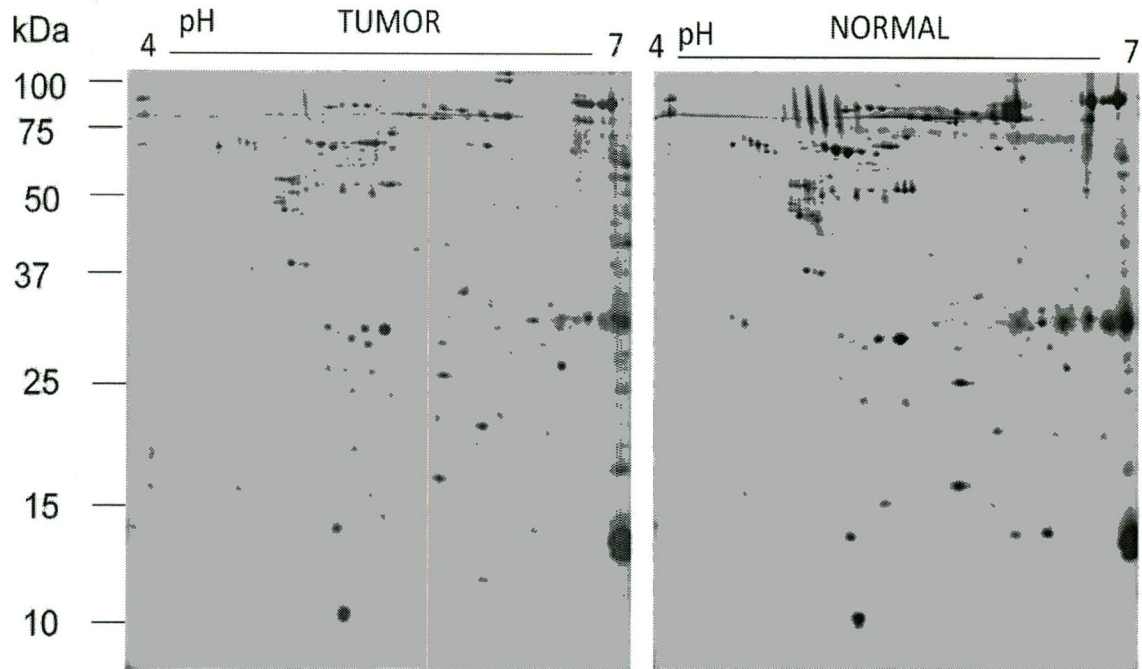
Figura 8. Geles SDS-PAGE que muestran la integridad de los extractos proteicos totales obtenidos de las biopsias. Una vez obtenidas, purificadas y cuantificadas las proteínas de las biopsias normales y tumorales 35, 94, 104 y 181, 95, 97 y 101, fueron resueltas mediante electroforesis en geles de PAGE-SDS al 12% para evaluar que los extractos proteicos no estuvieran degradados y así poder iniciar el protocolo de isoelectroenfoque. Se observa una adecuada calidad y cantidad de proteínas de alto y bajo peso molecular.

1.3. Perfiles proteómicos de tumores de mama triple negativo y tejido normal.

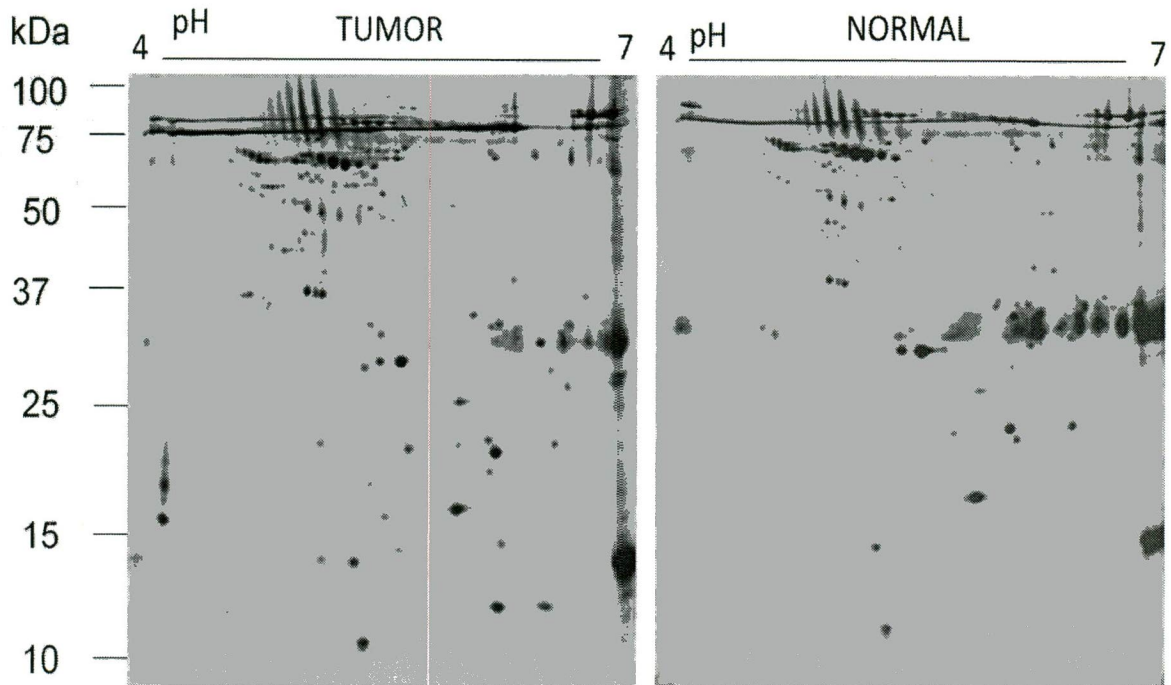
Una vez calculada la cantidad total de proteínas de cada una de las muestras, se continuó con la obtención del proteoma de las mismas. Para lo cual, inicialmente se llevó a cabo la rehidratación de tiras de gradiente de pH inmovilizado de 11 cm, pH 4-7 con 200 μ g de proteína purificada para su separación por punto isoeléctrico. A continuación se inició la separación electroforética por peso molecular, finalmente se realizó tinción de los geles para su visualización y documentación tal como se describe en materiales y métodos.

En una primera etapa se procesaron las muestras 35, 94, 104 y 181 (Figura 9) de las cuales se obtuvo un perfil proteómico tumoral y un perfil proteómico normal a excepción de la muestra 181, de la cual solo se logró obtener exitosamente el perfil proteómico de tejido tumoral. Ya que el perfil de tejido normal no contaba con la adecuada calidad para ser incluido en el análisis comparativo éste fue descartado. Posteriormente, fueron procesadas las muestras 95, 97 y 101 (Figura 10), de las cuales los perfiles contaron con resolución adecuada. En total se obtuvieron 13 perfiles proteómicos (6 perfiles normales y 7 perfiles tumorales), mismos que fueron incluidos en el análisis comparativo PDQuest.

MUESTRA 35



MUESTRA 94



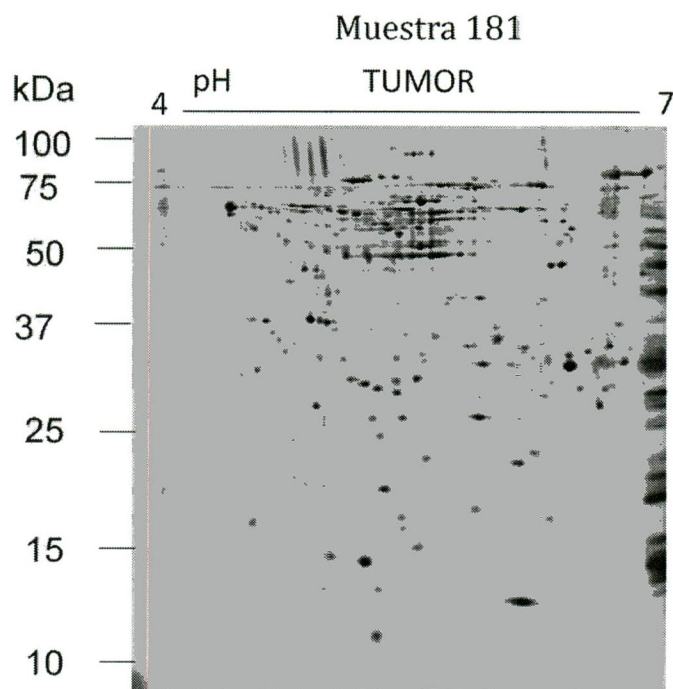
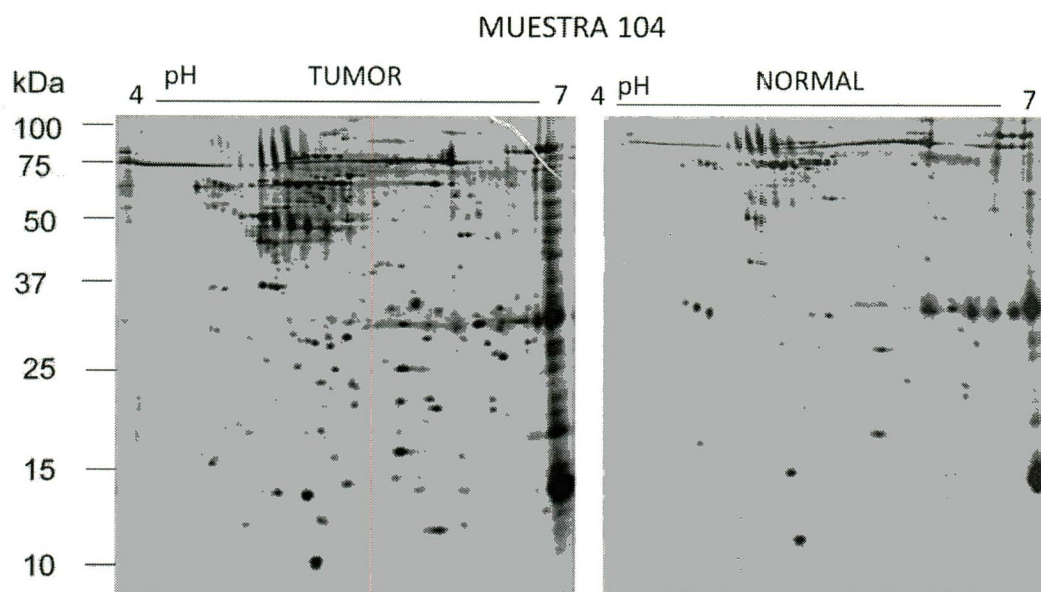


Figura 9. Perfiles proteómicos en 2D obtenidos de los tejidos mamarios normales y tumorales. Muestras pareadas 35, 94, 104 y 181. De la muestra 181 solo se logró obtener el perfil proteómico del tejido tumoral. Se observa una adecuada resolución y enfoque de los puntos, además de patrones similares y reproducibles. Se aprecian una gran cantidad de puntos en los pesos de 75 a 15 kDa y poca abundancia de puntos por arriba de 75 kDa.

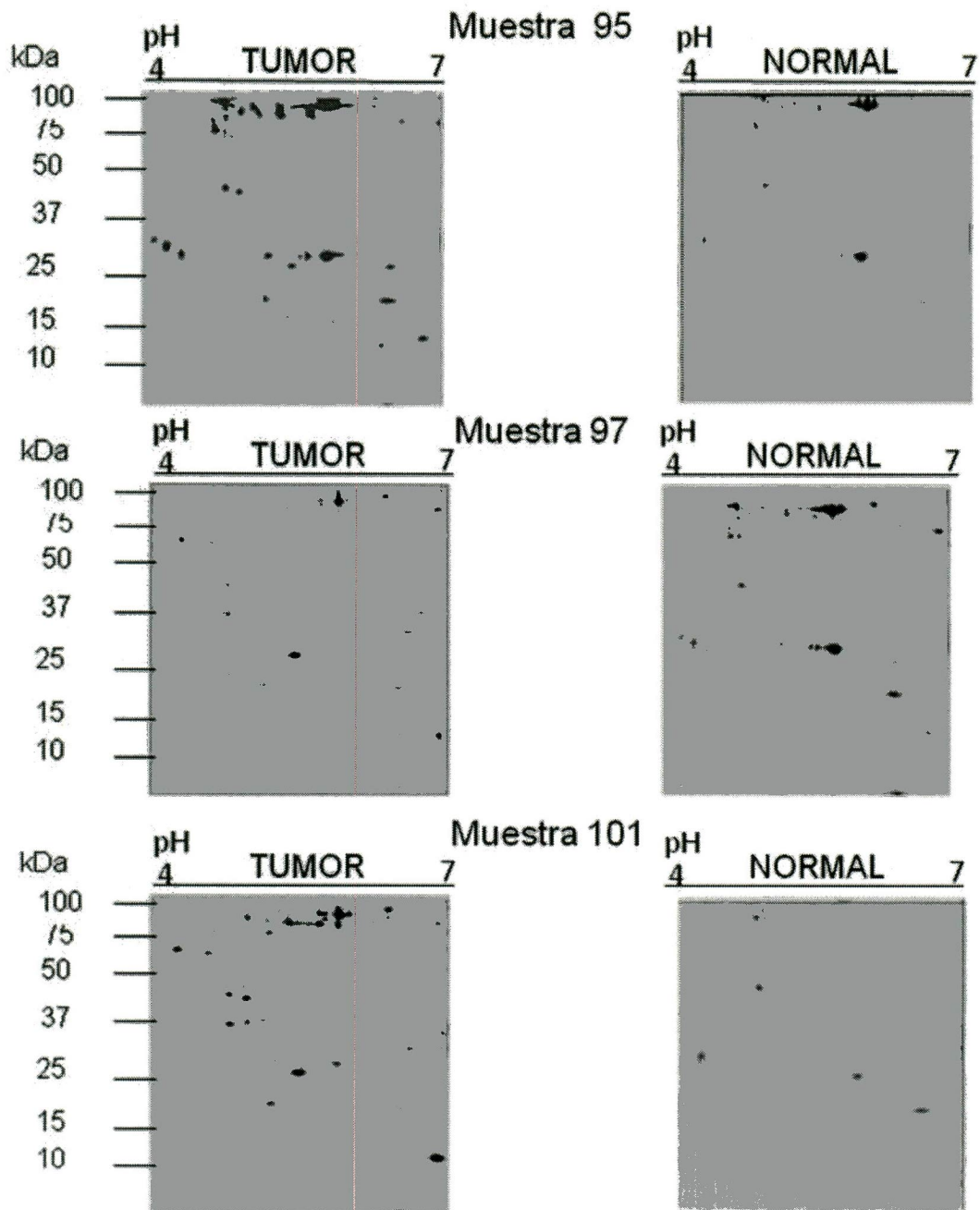


Figura 10. Perfiles proteómicos obtenidos de las biopsias mamarias triple negativo pareadas 95, 97 y 101. De las 3 muestras se lograron obtener tanto los perfiles tumorales como normales. Al igual que en los perfiles de las muestras 35, 94, 104 y 181, se observa una adecuada resolución, enfoque de los puntos y patrones similares y reproducibles.

1.4. Análisis comparativo de los perfiles tumorales y normales mediante PDQuest y escisión de puntos.

Con los perfiles proteómicos obtenidos se procedió a realizar el análisis bioinformático con el software PDQuest (BioRad) para identificar los puntos que contaran con variabilidad en la expresión de las proteínas presentes en las biopsias. De un primer análisis se obtuvieron 12 puntos (Figura 11) que presentaron diferencias consistentes en tamaño y número de píxeles por área, 4 de ellos, correspondientes a los puntos número 1, 2, 3 y 9 se encontraron sobreexpresados en el tejido normal y 8 puntos se observaron sobreexpresados en el tejido tumoral (puntos 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11 y 12). Estos puntos fueron finalmente visualizados en un transiluminador UV y cortados manualmente de los geles con puntas de pipeta de 200 μ l para después almacenarlos en 30 μ l de agua ultrapura y referidos para su identificación por espectrometría de masas (Figura 12).

Un segundo análisis fue llevado a cabo ahora incluyendo las muestras 95, 97 y 101 (Figura 13) y del cual se lograron validar los 12 puntos que ya habían sido localizados en el primer análisis, además de la identificación de otros 4 puntos que se observaron en mayor cantidad en los tumores, mismos que también fueron escindidos de los geles representativos e identificados por espectrometría de masas (Figura 14).

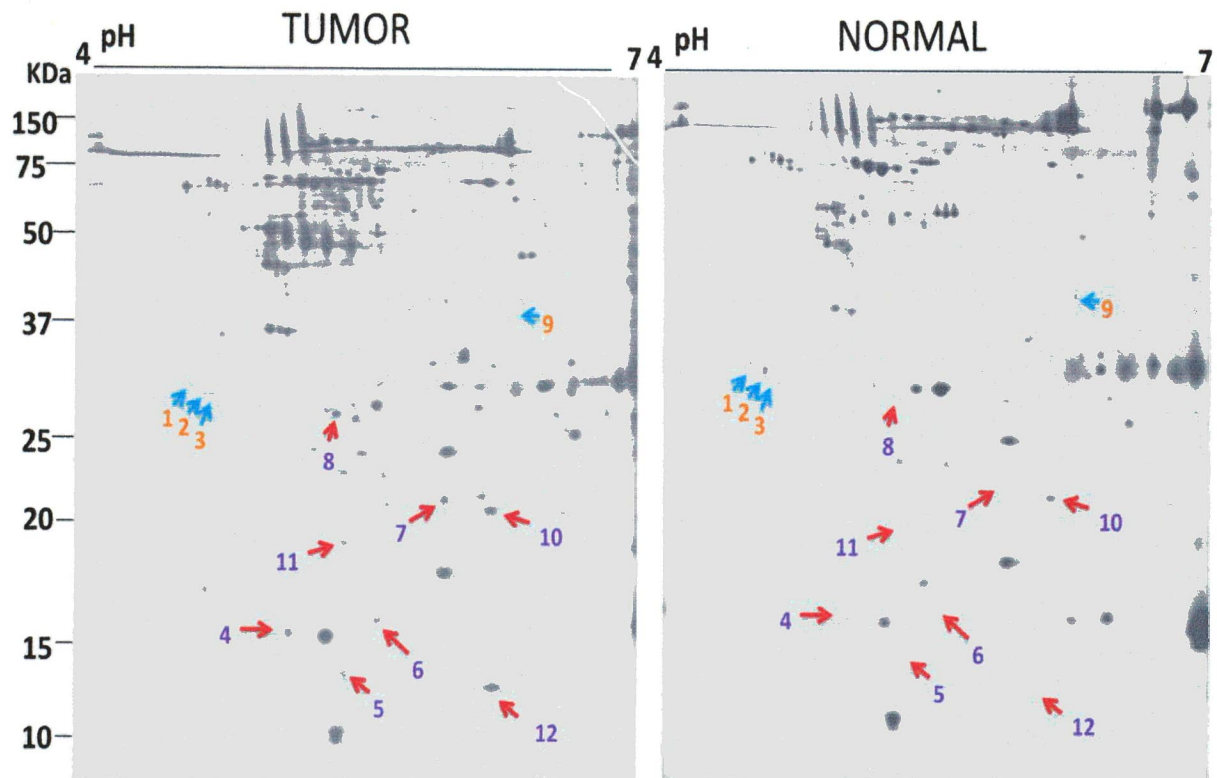


Figura 11. Puntos identificados en el análisis comparativo PDQuest del primer grupo de tumores triple negativo. Geles representativos del análisis informático PDQuest del primer grupo de biopsias de las cuales se obtuvieron 12 puntos que presentaron diferencias consistentes en tamaño y número de píxeles por área. 4 de ellos correspondientes a los puntos número 1, 2, 3 y 9 (flechas azules) se encontraron sobreexpresados en el tejido normal y 8 puntos (4, 5, 6, 7, 8, 10, 11 y 12) sobreexpresados en el tejido tumoral (flechas rojas).

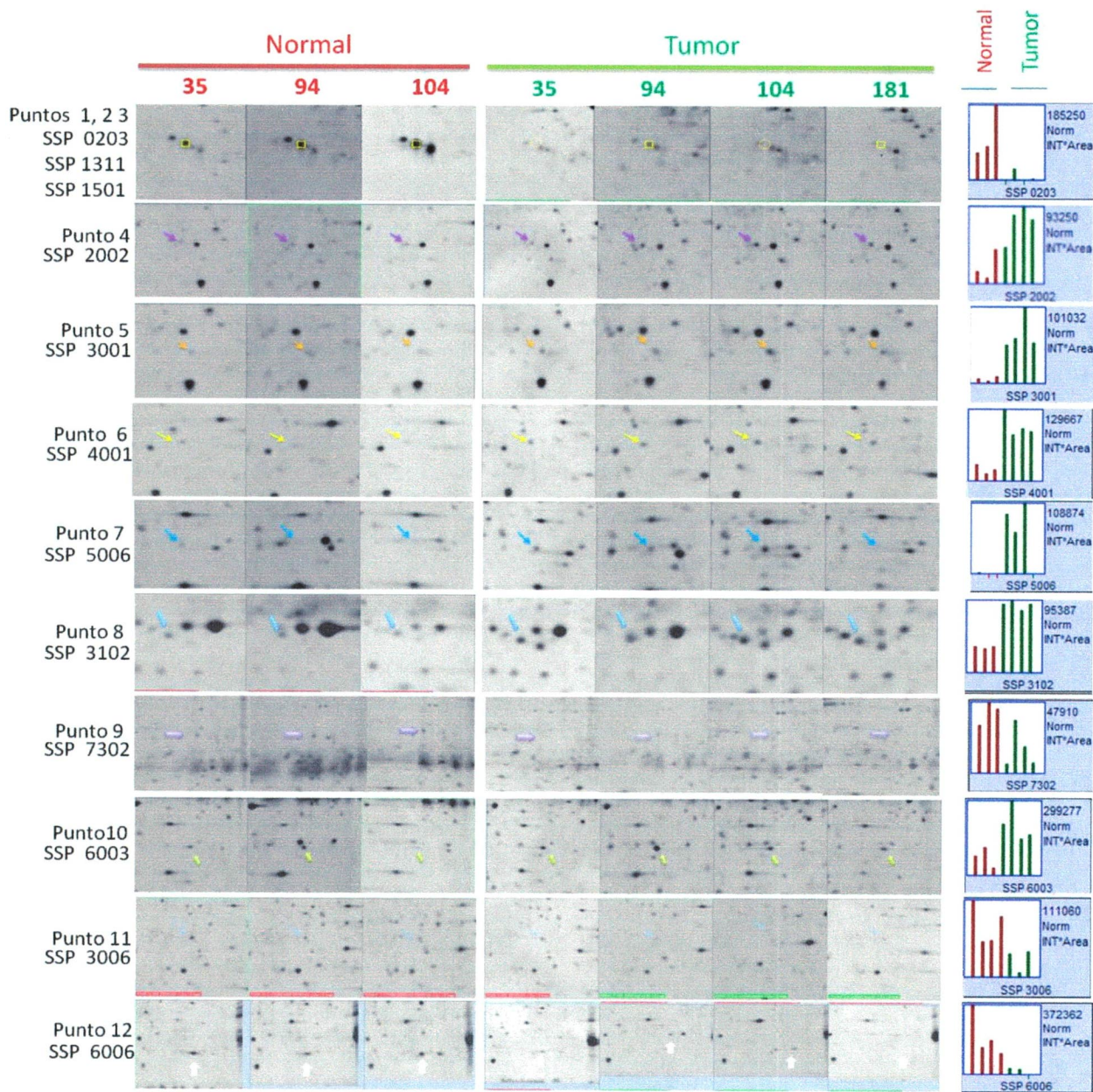


Figura 12. Detalle del análisis PDQuest del primer bloque de muestras. La figura muestra cada uno de los puntos seleccionados para su escisión en las muestras 35, 94, 104 y tumor 181 y la densitometría obtenida para cada uno de ellos. De los 12 puntos localizados, 4 fueron encontrados sobreexpresados en el tejido normal (1, 2, 3 y 9) y 8 puntos se observan sobreexpresados en el tejido tumoral (4, 5, 6, 7, 8, 10, 11 y 12). Se muestra la densitometría del lado derecho donde las barras rojas representan puntos específicos de cada uno de los tumores analizados, mientras las barras verdes representan a los tejidos normales.

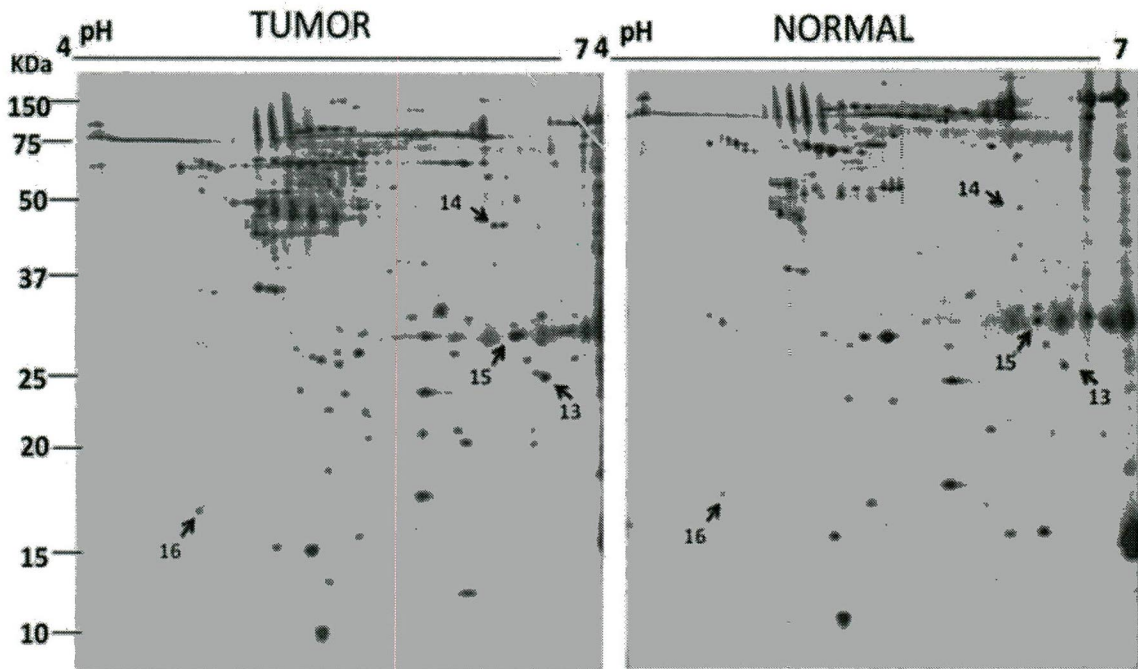


Figura 13. Puntos identificados en el segundo grupo de biopsias. En el segundo grupo de muestras (95, 97 y 101) se validaron los 12 puntos que se encontraron como diferenciales en el primer análisis, además se identificaron 4 nuevos puntos a los que le fue asignado el numeral 13 a 16, mismos que también fueron escindidos de los geles para su posterior identificación. La imagen muestra 2 geles representativos donde son señalados los 4 puntos en cuestión.

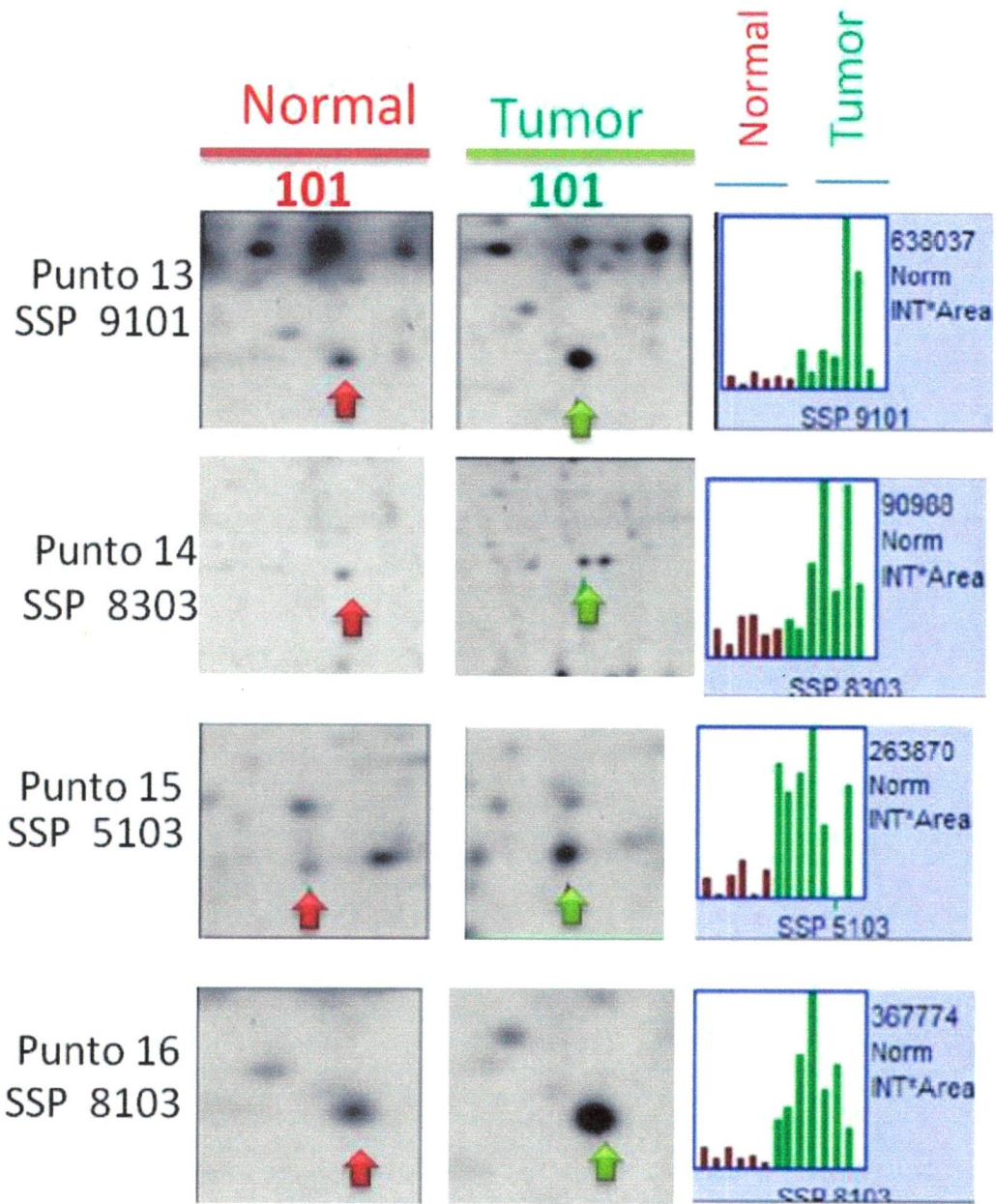


Figura 14. Detalle de los puntos escindidos después de incluir el segundo grupo de biopsias. Tras obtener el perfil proteómico de un segundo grupo de muestras (95, 97 y 101), se llevó a cabo un nuevo análisis. La figura muestra el detalle de cada uno de los puntos identificados y la densitometría obtenida para ellos, los 4 puntos se encontraron sobreexpresados en el tejido tumoral.

1.5. Identificación de las proteínas seleccionadas mediante espectrometría de masas ESI-MS/MS.

Como se mencionó anteriormente, los 16 puntos que fueron seleccionados mediante el análisis PDQuest fueron escindidos manualmente, colocados en 30 μ l de agua ultrapura y referidos para su identificación por espectrometría de masas ESI-MS/MS. Se logró la identificación de los 16 puntos seleccionados, 4 de las proteínas identificadas correspondieron a la proteína plasmática albúmina (puntos 1, 2, 3 y 9), la cual fue sobreexpresada en el tejido normal. Las 12 proteínas sobreexpresadas en el tejido tumoral (Tabla 8) correspondieron al precursor mitocondrial de citocromo oxidasa C, subunidad 5 (punto 4), miotrofina (punto 5), dominio de unión a SH3 de proteínas ricas en ácido glutámico (punto 6), subunidad ligera de la ferritina (punto 7), inhibidor de la disociación de Rho GDP-2 (punto 8), superóxido dismutasa Cu/Zn (punto 10), factor de inicio de la traducción 5A-1, isoforma B (punto 11), proteína de unión a Acyl – CoA isoforma 1 (punto 12), enzima conjugada a ubiquitina E2 N (punto 13), proteína de shock térmico 27 (punto 14), complejo activador del proteasoma subunidad 1 isoforma 1 (punto 15) y DJ-1 (punto 16). Un total de 12 proteínas de interés fueron identificadas, todas ellas se encontraron sobreexpresadas en el tejido tumoral. La tabla 8 muestra el nombre de la proteína identificada, el score obtenido, el número de péptidos y su secuencia, el porcentaje de cobertura de dichos péptidos en la secuencia de la proteína completa y su función en el entorno celular.

Tabla 8. Proteínas identificadas por espectrometría de masas ESI-MS/MS.

Proteína	Score / Péptidos con Match / % de Cobertura	MS/MS Secuencia peptídica (ion score)	Función
Citocromo Oxidasa C, subunidad 5ª, precursor mitocondrial	45 /3/30	⁸⁸ IIDAALR ⁹⁴ (38) ⁹⁹ LNDFASTVR ¹⁰⁷ (45) ¹²¹ EIYPYVIQELRPTLNELGISTPEELGLDKV ¹⁵⁰ (28)	Transporte de electrones mitocondrial
Miotrofina	46 /4/29	¹² NGDLDEVKDYVAK ²⁴ (15) ⁸⁶ LLLSK ⁹⁰ (21) ⁹⁸ GPDGLTAFEATDNQAIK ¹¹⁴ (46)	Morfogénesis y musculo liso
Dominio de unión a SH3 de proteínas rica en ácido glutámico	104 /5/46	⁵ VYIASSSGSTAIK ¹⁷ (46) ²⁰ QQDVLGFLEANK ³¹ (62) ⁷⁷ GDYDAFFEAR ⁸⁶ (44) ⁸⁷ ENNAVYAFLGLTAPPGSK ¹⁰⁴ (46)	Interactúa selectivamente con el dominio SH3 domain (Src homology 3)
Subunidad ligera de la Ferritina	56 /7/26	⁷⁴ KLNQALLDLHALGSAR ⁸⁹ (24) ¹²³ LGGPEAGLGEYLFER ¹³⁷ (60)	Homeostasis del Hierro
Inhibidor de la disociación de Rho GDP-2	57 /5/11	²² LNYKPPPQK ³⁰ (21) ⁶⁴ APNVVTR ⁷¹ (57) ¹¹⁸ DIVSGLK ¹²⁴ (15) ¹⁷³ NPRPVVMAK ¹⁸¹ (64)	Regula el intercambio GDP/GTP
Superoxido Dismutasa Cu/Zn	82 /5/28	⁸⁰ HVGDLGNVTADK ⁹¹ (82) ⁸⁰ HVGDLGNVTADKNGVADSVISLSDGHCII GR ¹¹⁵ (85)	Oxidoreductasa antioxidante
Factor de inicio de la traducción 5 A-1, isoforma B	118 /5/30	⁵³ VHLVGDIFTGK ⁶⁷ (83) ⁸⁷ NDFQLIGIQDGYLSLLQDSGEVR ¹⁰⁹ (30) ¹¹⁰ EDLRLPEGDLGK ¹²¹ (47)	Factor de inicio de la Traducción
Proteína de unión a Acyl – CoA isoform 1	60 /4/29	⁵¹ QATVGDINTERPGMLDFTGK ⁷⁰ (43) ⁹⁰ AYINKVEELK ⁹⁹ (60)	Transportador intracelular de acyl-CoA esterés
Enzima Conjugada a ubiquitina E2 N	120 /5/36	¹⁵ LLAEPVPGIK ²⁴ (69) ³⁴ YFHVVIAGPQDSPFEGGTFK ⁵³ (66) ⁵⁴ LELFLPEEYMAAPK ⁶⁸ (46) ¹³¹ TNEAQAIETAR ¹⁴¹ (54)	Activación transcripcional, ciclo celular y diferenciación
Proteína de shock térmico 27	287 /13/56	⁵ RVPFSLR ¹² (40) ²⁸ LFDQAFGLPR ³⁷ (60) ⁸⁰ QLSSGVSEIR ⁸⁹ (60) ⁹⁵ VSLDVNHFADELTVK ¹¹² (105) ¹¹³ TKDGVVEITGK ¹²³ (82) ¹⁴¹ KYTLPPGVDPTQVSSLSPEGLTVEAPMPK ¹⁷¹ (125) ¹⁷² LATQSNEITIPVTFESR ¹⁷⁸ (91)	Organización de actina Resistencia a estres
Complejo activador del proteasoma subunidad 1 isoforma 1	199 /7/26	⁵⁹ APLDIPVDPVK ⁷⁰ (82) ¹¹⁰ IVLLQR ¹¹⁶ (42) ¹⁴² IEDGNNGFVAVQEK ¹⁵⁵ (136) ¹⁵⁶ VFELMTSLHTK ¹⁶⁶ (44) ¹⁶⁷ LEGFHTQISK ¹⁷⁶ (37) ²²¹ NAYAVLYDIILK ²³² (30)	Ensamble de inmunoproteasoma
DJ-1	199 /7/42	⁶ ALVILAK ¹² (32) ³³ TVAGLAGK ⁴¹ (57) ⁶⁴ EGPYDVVVLPGGNGLGAQNLSESAAVK ⁸⁹ (93) ¹⁰⁰ GLIAAICAGPTALLAHEIGFGSK ¹²² (61) ¹⁴⁹ DGLILTSR ¹⁵⁶ (58) ¹⁸³ APLVKLD ¹⁸⁹ (40)	Estrés oxidativo, Chaperona Redox-sensible Transcripción receptor de androgeno-dependiente

1.6. Selección del Inhibidor de la disociación Rho GDP, isoforma 2 (Rho GDI2) para validación.

El inhibidor de la disociación de Rho GDP isoforma 2 (Rho GDI2) fue localizado con regulación modulada en todos los perfiles proteómicos realizados, en los cuales se observó sobreexpresada el doble en los tejidos tumorales respecto al tejido normal (Figura 15). La elección de Rho GDI2 se basó en los datos publicados que sugieren un papel en el proceso de tumorigénesis (46, 48-52), y una probable función de supresor de metástasis (47).

Las GTPasas de la familia Rho pertenecen a una familia de pequeñas proteínas que actúan como “switches” moleculares que convierten señales extracelulares en múltiples efectos celulares. Estas llevan a cabo sus funciones a través del intercambio de la forma Rho GDP a Rho GTP, es decir de un estado inactivo a un estado activo en el cual puede interactuar con sus efectores y promover los efectos de este. Existen 3 clases generales de reguladores de la señalización de las proteínas Rho entre las cuales se encuentran los factores intercambiadores de guanina (GEF, por sus siglas en inglés), las proteínas GTPasas-activadoras (GAP, por sus siglas en inglés) y los inhibidores de la disociación de Rho (Rho GDIS, por sus siglas en inglés). Las proteínas GEF controlan la liberación de GDP de la proteína Rho y su intercambio por GTP, los reguladores GAP controlan la función de la GTPasa para hidrolizar GTP a GDP, controlando la tasa natural de la conformación activa a inactiva. Las proteínas GDI forman un complejo con las proteínas Rho en estado inactivo secuestrándolas e impidiendo su anclaje a los receptores de membrana dependientes de proteína G (52).

Rho GDI 2 también es conocida con los nombres D4-GDI y Ly-GDI, esta pertenece a la familia de los inhibidores de la disociación de las Rho GTPasas (Rho GDIs). Esta familia incluye a las isoformas Rho GDI, Rho GDI 2 y Rho GDI 3, las cuales controlan la distribución celular de las Rho GTPasas, sus interacciones con factores intercambiadores de guanina (GEFs) y con proteínas GTPasas-activadoras (GAPs), así como la interacción con sus proteínas efectoras (Figura 16).

En contraste con Rho GDI, la cual se expresa en todos los tejidos, Rho GDI 2 se ha observado que se expresa predominantemente en células T y B (46), sin embargo, estudios recientes han mostrado que Rho GDI 2 es también expresada en neoplasias de tejido no hematopoyético incluyendo ovario y cáncer de vejiga, sugiriendo que esta proteína puede tener una función importante en la progresión tumoral (47).

La familia Rho de GTPasas pequeñas incluyen a Rac1, Cdc42, Rho A, Rho B y Rho C y han sido implicadas en la regulación de diversos aspectos celulares, como motilidad e invasión, así como polaridad celular, organización del citoesqueleto, transducción de señales del ambiente extracelular, progresión del ciclo celular, apoptosis, expresión génica y tráfico vesicular (48). Por ejemplo, Rac1 el principal regulador de Rho GDI 2, es un regulador clave del tráfico vesicular e invasión dependiente de Tiam-1. La activación de Rac1 y Cdc42 induce la motilidad e invasividad de células epiteliales mamarias (49). Recientemente se ha encontrado que la línea celular de cáncer de mama MDA-MB231 que es caracterizada por poseer una tasa alta de invasividad y fenotipo triple negativo, presenta un aumento en la expresión de Rho GDI 2 en comparación con las líneas celulares de mama MCF-7 que posee un

fenotipo HER2+ y baja tasa de invasividad y con la línea celular MCF-12A, la cual es considerada no tumoral. Adicionalmente, en dicho estudio fue descrito que la inhibición de la expresión de Rho GDI2 mediante el uso de un ARN pequeño de interferencia (siRNA, por sus siglas en inglés) dirigido contra el transcrito de Rho GDI 2, efectivamente bloqueaba la motilidad y el potencial invasivo *in vitro* de la línea celular MDA-MB231 y que las células carentes de dicha proteína revertían a un fenotipo de epitelio de mama normal cuando fueron crecidas en matrigel (49). Importantemente a pesar de estas observaciones, Rho GDI 2 no ha sido asociada en específico al fenotipo triple negativo de cáncer de mama. Por lo cual con el interés concreto de estudiarla bajo dicho contexto, se procedió a su elección para su evaluación y en su caso, validación.

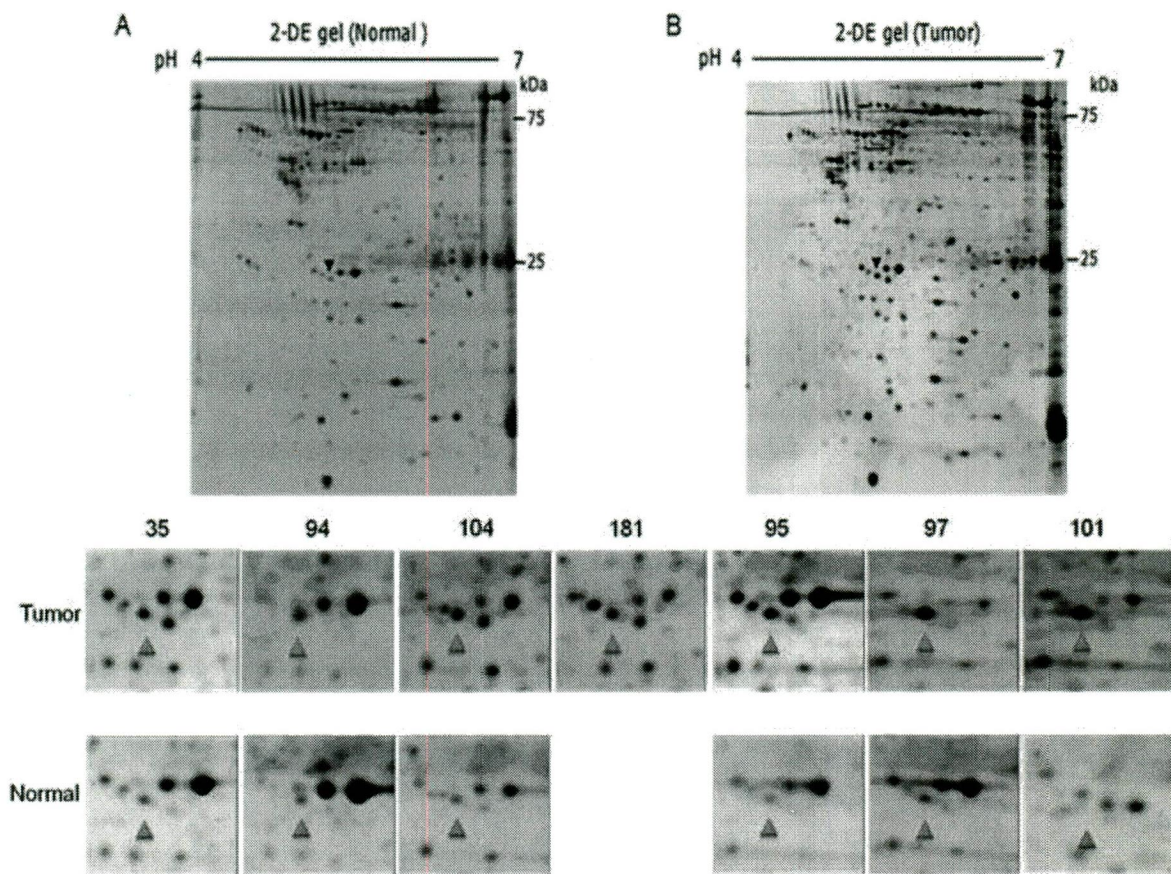


Figura 15. Análisis de la expresión de Rho GDI 2 a través de perfiles proteómicos en 2D. En la figura se observa una vista general de 2 geles representativos donde se señala el punto correspondiente a Rho GDI 2. En el panel inferior se observa el detalle de todos los geles en doble dimensión analizados, donde se observa la mayor presencia de Rho GDI2 en las muestras tumorales. De la muestra 181, el perfil normal no fue adecuado para su comparación.

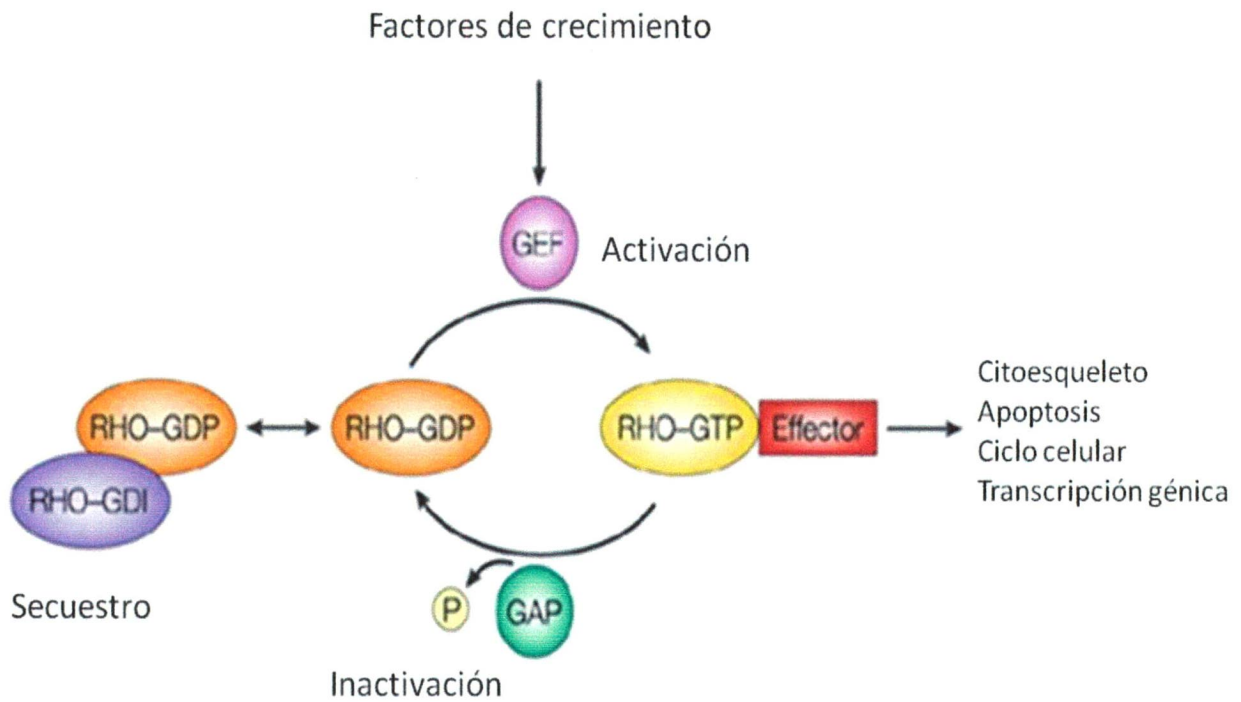


Figura 16. Regulación de las Rho GTPasas. Existen diferentes reguladores de las Rho GTPasas, las proteínas Rho GDI secuestran a las Rho GTPasas en el citosol, manteniendo a éstas en un estado inactivo. Los factores intercambiadores de guanina (GEF) actúan como reguladores positivos de las Rho GTPasas al llevar a cabo el paso de GDP a GTP mediante la transferencia de un fosfato que a su vez promueve la interacción de las Rho GTPasas con sus proteínas efectoras. Al catalizar el paso de GTP a GDP mediante la pérdida de un fosfato, las proteínas activadoras de GTPasas (GAP) llevan a la inactivación de las GTPasas Rho, permitiendo ahora su interacción con las Rho GDI. Tomada y modificada de Erik Sahai, *Nature Reviews Cancer* 2002.

1.7. Evaluación de Rho GDI2 en las biopsias originales de las que se obtuvieron los perfiles proteómicos.

Con el fin de iniciar la validación de una de las proteínas localizadas e identificadas como sobreexpresadas en los perfiles proteómicos de los tumores de mama triple negativo, se llevó a cabo la inmunodetección de la proteína Rho GDI2 en los extractos purificados, de los cuales aún había material disponible para llevar a cabo un ensayo de Western blot. Estos extractos pertenecían a los mismos que fueron utilizados para la obtención de los perfiles proteómicos por electroforesis en doble dimensión (Figura 17). En el caso de las muestras 35 y 94 la inmunodetección se llevo a cabo con 80 μ g de extractos proteicos purificados y para el caso de las muestras 95 y 101 se llevo a cabo con 18 μ g. No fue posible realizar la inmunodetección de actina como control por la falta de extractos suficientes. La banda correspondiente a Rho GDI 2 de 28 KDa se observa incrementada en los tejidos tumorales para la muestra 35 y 94. Para las muestras 95 y 101 prácticamente no se aprecia la detección de Rho GDI 2 en los tejidos normales, esto, aunque correlaciona con lo observado en los perfiles proteómicos, es controversial por lo mencionado anteriormente sobre la falta de extractos disponibles para realizar la detección de actina como control.

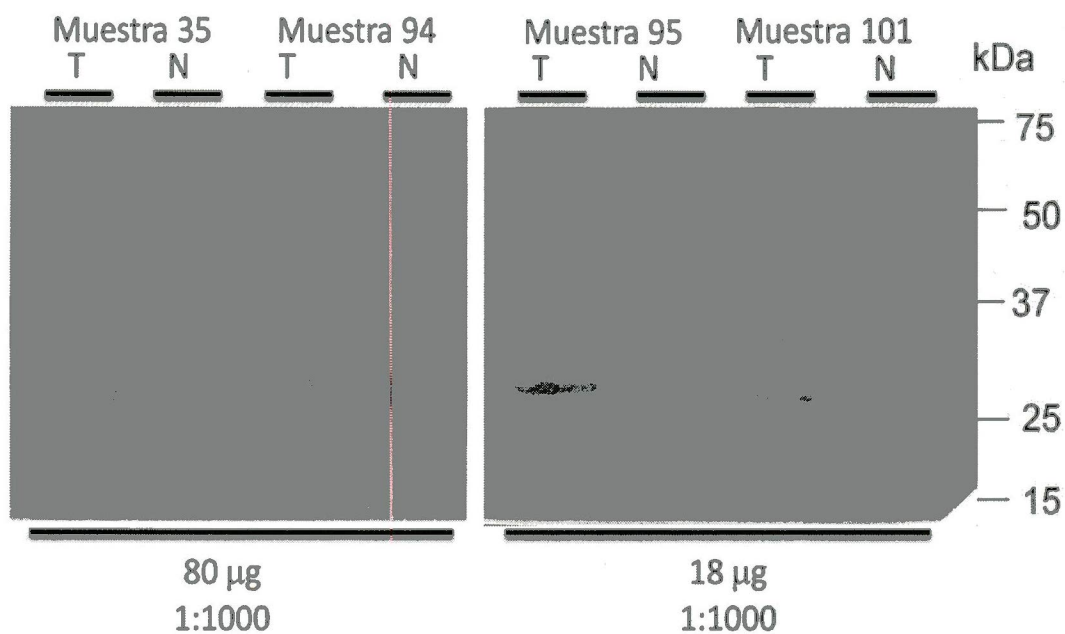


Figura 17. Inmunodetección de Rho GDI 2 en las biopsias originales utilizadas para obtener los perfiles proteómicos. Las biopsias número 35, 94, 95 y 101 se analizaron mediante Western blot. Se inmunodetectó a Rho GDI 2 (28 kDa) la cual se observó sobreexpresada en el tejido tumoral, conforme a lo previamente observado en los perfiles proteómicos. Debido a la falta de cantidad suficiente de proteínas de las biopsias 95 y 101 se cargaron en los geles 18µg de extractos totales.

1.8. Evaluación de Rho GDI2 por Western blot en un número mayor de biopsias de tumores de mama triple negativo, luminales y HER2.

Con el objetivo de evaluar la expresión de la proteína Rho GDI 2 en un número mayor de muestras, se llevó a cabo la inmunodetección a través de Western blot de la proteína de interés en biopsias de tejido normal y de tejido tumoral con diferente clasificación en base a su expresión de receptores hormonales. Para ello fueron seleccionadas 32 muestras correspondientes a las biopsias de tejido normal y tumoral de 16 pacientes. Se seleccionaron biopsias normales y tumorales de 5 pacientes con tumores clasificados como triple negativo, distintas a las que se usaron para la obtención de los perfiles proteómicos, así como biopsias de 7 pacientes con tumores clasificados como luminales y 4 pacientes con tumores clasificados como Her2+. Las características de las biopsias y las características clínicas de las pacientes incluidas en este ensayo están resumidas en la Tabla 9.

Tras la inmunodetección de Rho GDI 2 en las biopsias de tumores luminales, Her2+ y triple negativo, se observa que de manera general la proteína Rho GDI 2 se encuentra sobreexpresada en las biopsias de tumores triple negativo en comparación con el tejido normal (Figura 18) misma condición que se observa para los tumores luminales (Figura 19) y en mayor proporción para los tumores que sobreexpresan Her2+ (Figura 20). La expresión de Rho GDI 2 en las biopsias tumorales triple negativo fue 1.41 veces mayor que en el tejido normal. Los tumores clasificados como luminales muestran 1.14 veces mayor expresión de Rho GDI 2 que su contraparte normal. La expresión relativa de Rho GDI 2 en los tumores Her2+ es de 1.71 veces respecto a sus tejidos normales, estos promedios de expresión relativa para los subgrupos triple

negativo, luminal y Her2+ se muestran en la Figura 21. Los valores de expresión relativa de Rho GDI2 de cada uno de los tejidos tumorales respecto al tejido normal son mostrados en la tabla 10.

Tabla 9. Características clínicas de las pacientes que participaron en la evaluación por Western blot de la expresión de Rho GDI 2.

Características	Total
Pacientes	16
Biopsias Normales	16
Biopsias tumorales	16
Total de biopsias procesadas	32
Edad (años)	
30 – 40	2
40 – 50	2
51 – 60	5
Mayor a 61	7
Tamaño del tumor (cm)	
<2	2
>2	12
>5	2
Tipo histológico	
Carcinoma ductal in situ	1
Carcinoma ductal invasivo	14
Carcinoma Mixto	1
Expresión de receptores	
Triple negativo	5
Luminal	7
Her2+	4
Estadio clínico	
I	4
II	11
III	1
Estadio nodular	
N0	4
N1	4
Desconocido	8

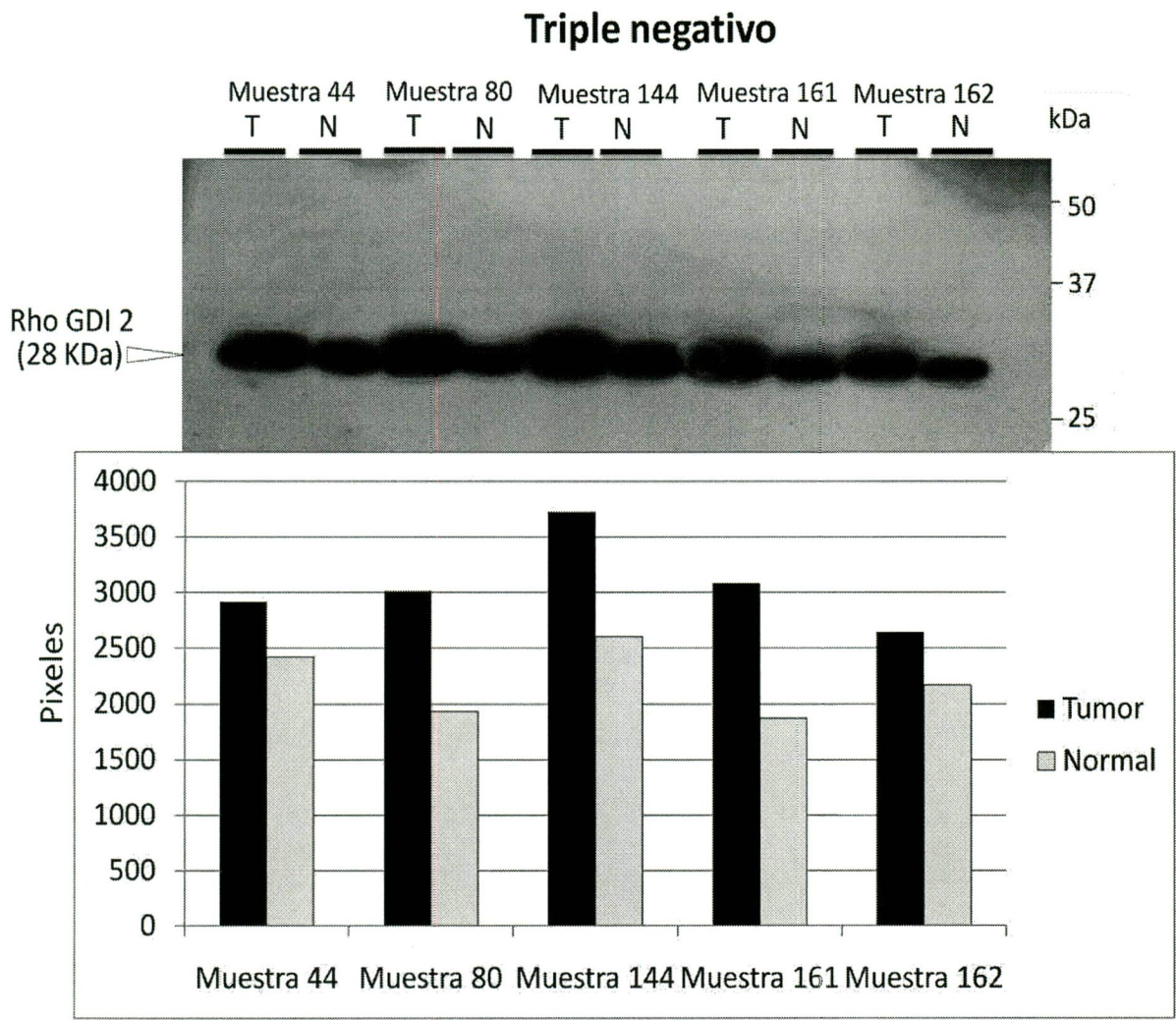


Figura 18. Evaluación a través de Western blot de la expresión de la proteína Rho GDI 2 en biopsias de tejido normal y tumoral triple negativo. De manera generalizada, las biopsias de tumores de mama triple negativo muestran una mayor expresión de la proteína Rho GDI 2 en comparación con la expresión de dicha proteína en biopsias de tejido normal.

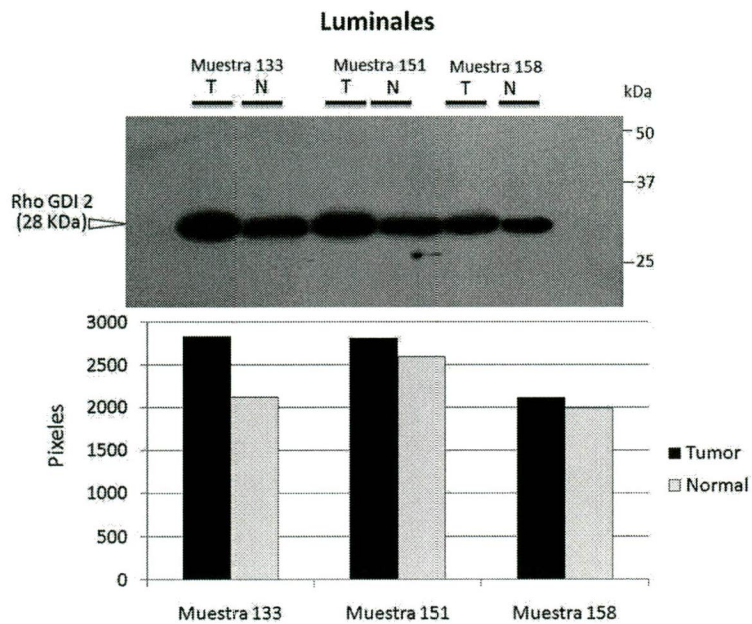
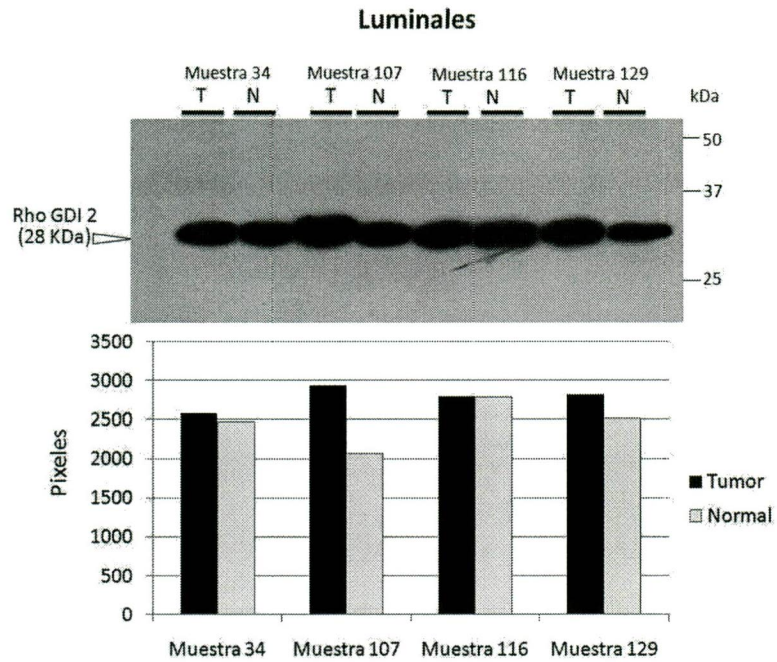


Figura 19. Evaluación a través de Western blot de la expresión de la proteína Rho GDI 2 en biopsias de tejido normal y tumoral con fenotipo luminal. En las biopsias de tejido tumoral 107 y 133 se observa mayor expresión de Rho GDI 2, respecto al tejido normal, mientras que en los tumores 34, 116, 129, 151 y 158 no se aprecia sobreexpresión significativa.

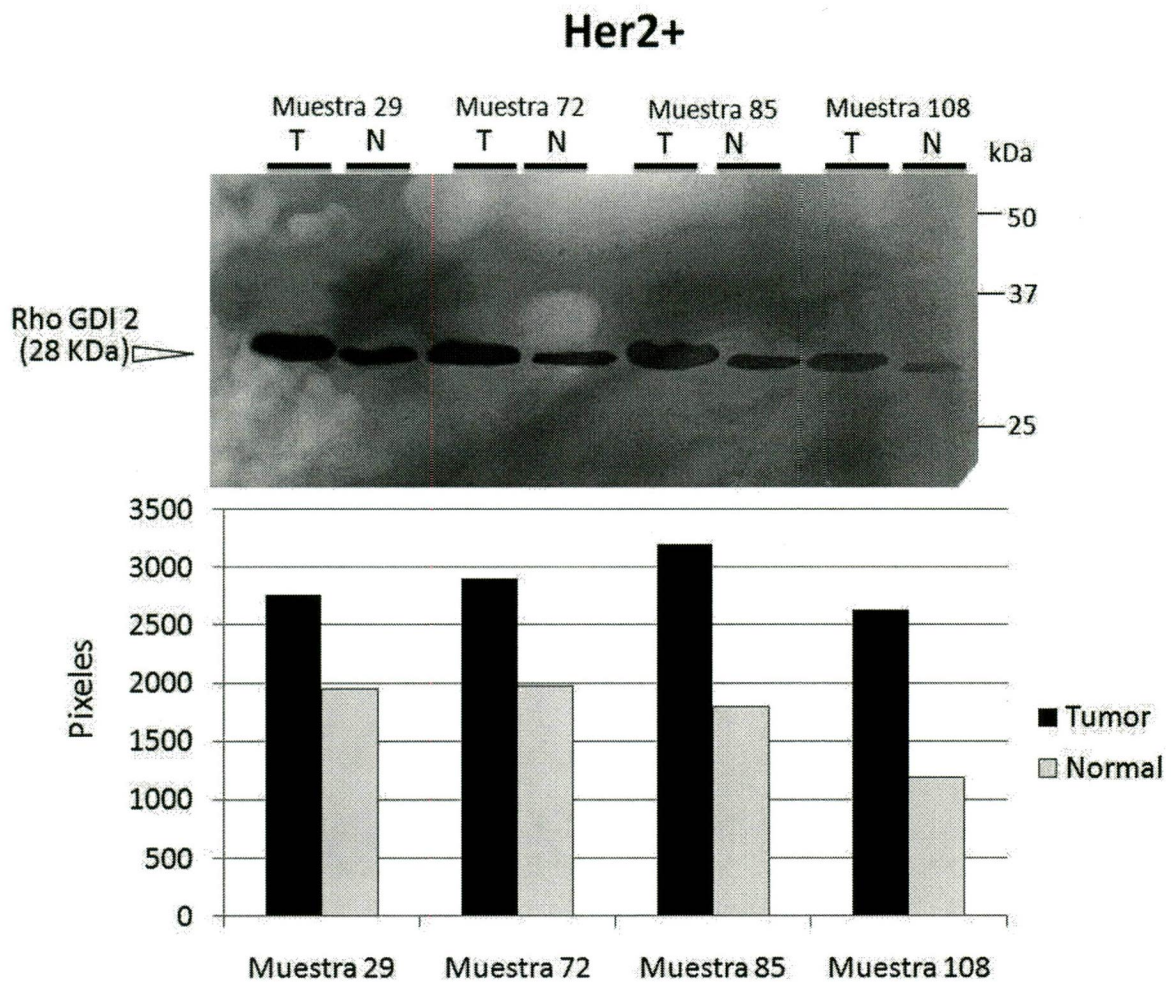


Figura 20. Evaluación a través de Western blot de la expresión de la proteína Rho GDI 2 en biopsias de tejido normal y tumoral con fenotipo Her2+. La proteína Rho GDI 2 se observa expresada en mayor cantidad en todas las biopsias de tejido tumoral.

Tabla 10. Expresión relativa de Rho GDI 2 en las biopsias triple negativo, luminales y Her2+.

Triple negativo			Luminal			Her2+		
Biopsia	Expresión Relativa	Promedio	Biopsia	Expresión Relativa	Promedio	Biopsia	Expresión Relativa	Promedio
44	1.20		34	1.04		29	1.41	
80	1.56		107	1.42		72	1.47	
144	1.43		133	1.33		85	1.78	
161	1.65	1.41	151	1.082	1.14	108	2.21	1.71
162	1.21		116	1.00				
			129	1.11				
			158	1.06				

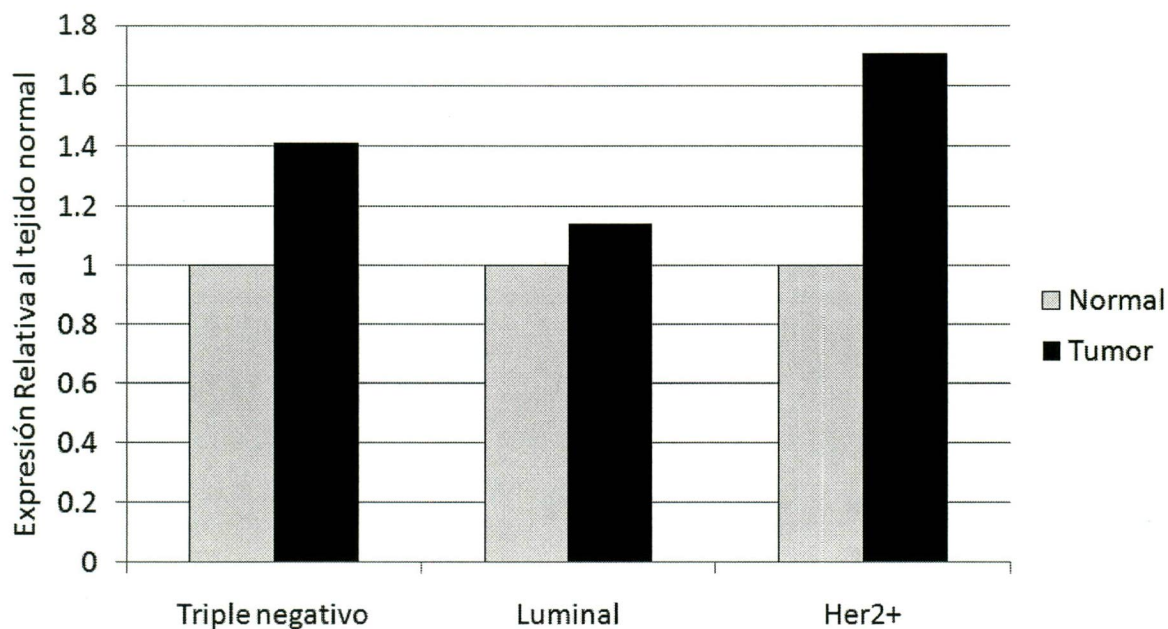


Figura 21. Expresión relativa respecto a tejido normal de Rho GDI 2 en los grupos tumorales triple negativo, luminales y Her2+. En la gráfica se muestra el promedio de la expresión de Rho GDI 2 en las biopsias de los tejidos tumorales triple negativo, luminal y Her2+ relativa a la expresión de la misma proteína en las biopsias de tejido normal. La expresión de Rho GDI 2 en las biopsias tumorales triple negativo fue 1.41 veces mayor que en el tejido normal. Los tumores clasificados como luminales mostraron 1.14 veces mayor expresión de Rho GDI 2 que su contraparte normal. La expresión relativa de Rho GDI 2 en los tumores Her2+ fue 1.71 veces respecto a sus tejidos mamarios normales.

1.9. Evaluación de Rho GDI 2 por Western blot en líneas celulares de diferentes órganos.

A fin de evaluar la expresión de la proteína Rho GDI 2 en diversos tipos tumorales de otros órganos (Tabla 11), se llevaron a cabo ensayos de Western blot en extractos totales de las líneas celulares H-1944, A-549 (Pulmón), HeLa (Cérvix), HepG2 (Hígado), DU-145, PWR-1E (Próstata), MCF-7 y MDA-MB231 (Mama). De inicio se llevó a cabo el mantenimiento y cultivo de las líneas celulares con medio DMEM F-12 (A-549, H-1944, DU-145, PWR-1E) o con medio DMEM (MDA-MB231, MCF-7, HeLa y HepG2) ambos complementados con 10% de suero fetal bovino, se llevó a cabo la extracción proteica total según lo descrito en la metodología y se procedió a llevar a cabo la inmunodetección.

Las líneas celulares pulmonares (A-549 y H-1944) mostraron una baja expresión de Rho GDI 2, la cual fue más evidente en la línea celular A-549 que mostró una muy baja expresión respecto a su control de actina. Las líneas celulares prostáticas (DU-145 y PWR-1E) de igual manera mostraron una baja expresión de Rho GDI 2 respecto al control de actina. Interesantemente la línea celular normal de próstata PWR-1E tuvo una menor expresión de Rho GDI 2 respecto a la línea tumoral DU-145. La línea celular proveniente de carcinoma hepático HepG2 mostró una expresión alta respecto a actina y a otras líneas. De igual manera que la línea celular de mama MDA-MB231 mostró una alta expresión de dicha proteína, contrario a las líneas celulares de mama MCF-7 y de cérvix HeLa que presentaron una expresión casi nula de Rho GDI 2. (Figura 21). Estos datos muestran que existe una expresión heterogénea de Rho GDI2 tanto en líneas diferentes de tumores de mama, como en líneas tumorales de órganos como pulmón, cérvix, hígado y próstata.

Tabla 11. Líneas celulares en las cuales se analizó la expresión de Rho GDI 2.

Línea celular	Tejido	Características
MCF-7	Mama	Tumor primario, carcinoma ductal invasivo, tipo luminal RE+, RP+ HER2+
MDA-MB231	Mama	Tumor primario, adenocarcinoma, triple negativo
A-549	Pulmón	Adenocarcinoma de células basales de alveolos pulmonares, tomada de sitio metastásico
H-1944	Pulmón	Adenocarcinoma de células no pequeñas, tomada de sitio metastásico
HeLa	Cérvix	Tumor primario, adenocarcinoma, HPV18+
PWR-1E	Próstata normal	No tumoral, inmortalizada con el adenovirus 12-SV40
DU-145	Próstata tumoral	Adenocarcinoma, tomada de sitio metastásico (cerebro), moderado potencial metastásico.
HepG2	Hígado	Tumor primario no metastásico, carcinoma hepatocelular HV-

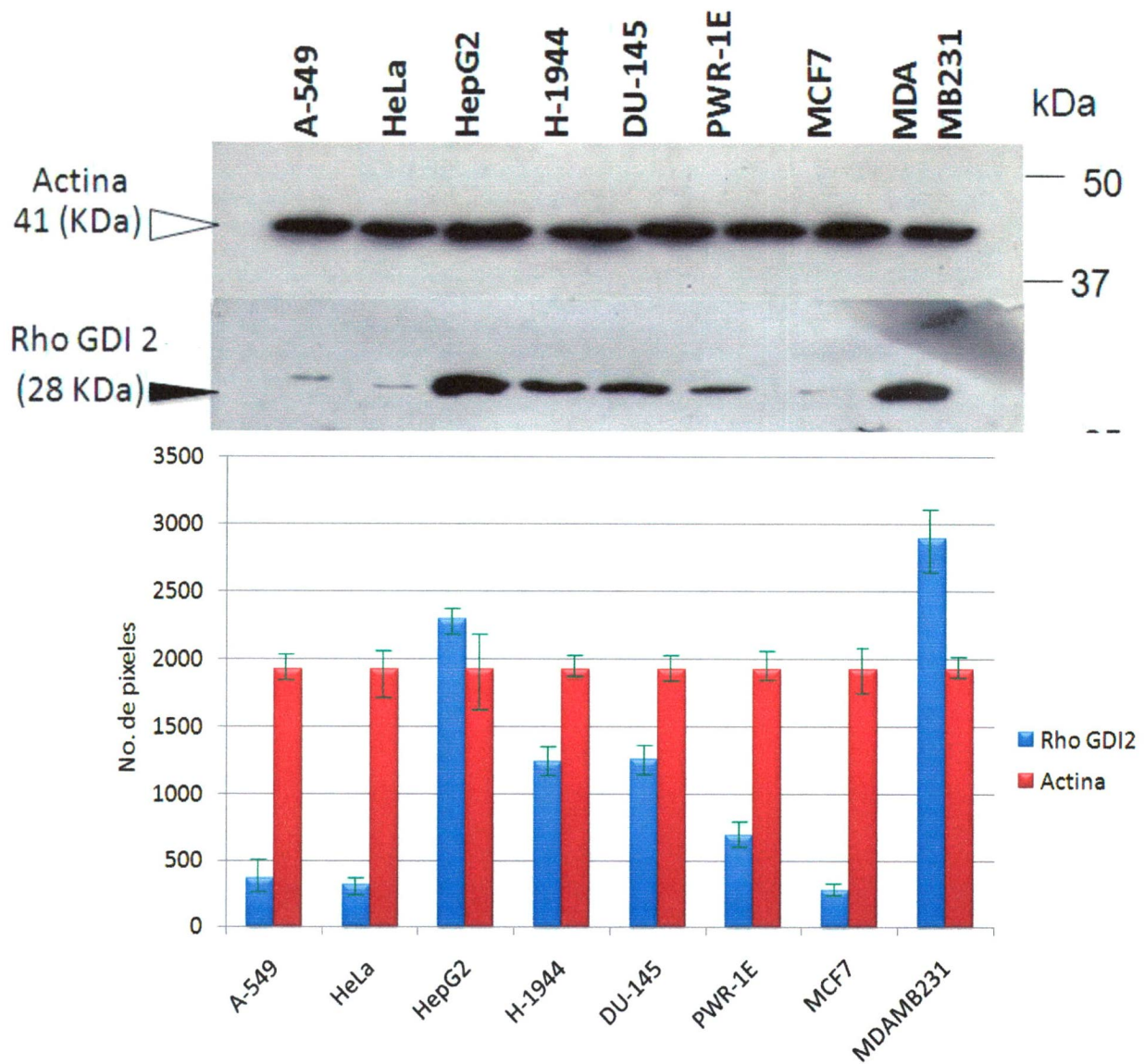


Figura 22. Evaluación de la expresión de la proteína Rho GDI2 por Western blot en diversas líneas celulares. Las líneas celulares pulmonares A-549 y H-1944, las prostáticas DU-145 y PWR-1E, así como la línea celular de cérvix HeLa y la línea de mama MCF-7 tuvieron una baja expresión de Rho GDI2. Tanto la línea celular de mama MDA-MB231 y la línea celular hepática HepG2 tuvieron una expresión alta de Rho GDI2.

VI. DISCUSIÓN.

Los marcadores moleculares son de gran importancia tanto para evaluar el pronóstico del curso del cáncer de mama, como para poder planear una terapia acorde y personalizada al progreso de esta enfermedad. A pesar de que el cáncer de mama es una de las enfermedades más estudiadas, y con base a las altas tasas de incidencia es indispensable la investigación en dicho tema, máxime que en los tumores de mama triple negativo, donde no se conoce una firma molecular o marcadores lo suficientemente validados para su aplicación clínica.

Actualmente se reconoce a los tumores de mama triple negativos como una entidad altamente heterogénea y no se conocen marcadores de pronóstico que puedan ser de utilidad, además sus características de presentación y las consecuencias en el estado general de las pacientes que lo padecen hacen patente la necesidad de estudios enfocados a la caracterización molecular de dichos tumores. Sin embargo existe controversia respecto a la clasificación de estos tumores. Basados en la caracterización histopatológica y perfiles de expresión de 97 tumores de mama triple negativo incluidos en parafina, Bas Kreike y col. (42) en 2007 concluyeron que los tumores de mama triple negativo son la misma entidad que los tumores de mama clasificados como "Basal-like" por Perou y cols. en el año 2000 (16). Sin embargo, el consenso actual es que los tumores de mama triples negativos y los tumores de mama basal-like son entidades distintas (8, 13, 21, 22, 24, 25, 33, 53), para entender la definición de basal-like en el contexto del cáncer de mama es requerida la comprensión de la arquitectura de la

mama ya que el término “basal” se refiere a la expresión de citoqueratinas de alto peso molecular que están presentes en la lámina basal del epitelio luminal de los lobulillos y ductos de la mama (13), mientras que el término “triple negativo” es utilizado como un diagnóstico de exclusión basado en la falta de expresión del receptor de estrógenos, del receptor de progesterona y del receptor del factor de crecimiento epidermal humano 2 (53).

En la identificación de proteínas que se expresan diferencialmente en tejidos, es de gran importancia el material de estudio disponible y el número de réplicas utilizadas para definir un proteoma. En este estudio fueron obtenidos mediante electroforesis 2D, analizados y comparados 7 perfiles proteómicos tumorales y 6 perfiles proteómicos normales de mama. De cada una de las muestras procesadas sólo se logró obtener un perfil, ya que la cantidad de proteínas extraídas de cada muestra así lo permitió al tener como límite de carga 200 µg de proteínas para los geles en doble dimensión de 11 cm y 40 µg por gel para analizar su integridad. No obstante obtuvimos perfiles proteómicos con un patrón muy similar y hallamos proteínas moduladas en los tumores con un 100% de representatividad en todos los geles provenientes de pacientes distintas (Figuras 12, 14 y 15), lo cual nos da la certeza de la reproducibilidad de los procedimientos experimentales implementados.

En cuanto al número de muestras utilizadas para obtener los perfiles proteómicos, en 2008 fue publicado un primer estudio en el que se identificaron mediante electroforesis en doble dimensión 36 proteínas que presentaron expresión

diferencial en tumores de mama triple negativo usando modelos animales de ratón TA2 que desarrollan espontáneamente cáncer de mama con dicho fenotipo. En tal estudio se compararon 2 perfiles proteómicos con sus triplicados de las condiciones tumor metastásico contra tumor no metastásico como control y de las cuales se observó por inmunohistoquímica, analizando 100 tumores de mama (61 triple negativos y 39 luminales), que la proteína HSP70 y la proteína 14-3-3 son sobreexpresadas con mayor frecuencia en tumores de mama triple negativos metastásicos en este modelo de estudio (43). Por otro lado, recientemente se publicó un estudio en el cuál se encontró y validó la sobreexpresión de Rho GDI 2 en tumores de mama utilizando los perfiles proteómicos tumorales y normales de 6 pacientes (50). En el estudio plasmado en esta tesis, se analizaron 7 perfiles tumorales y se compararon contra 6 perfiles normales, se obtuvieron patrones muy similares y representativos en los puntos elegidos para identificar, por lo cual consideramos suficiente el número de muestras utilizadas.

Si bien, la falta del perfil proteómico normal 181 no permitió el análisis pareado de esta muestra es de mencionarse la adecuada resolución y reproducibilidad intermuestral de todos los perfiles obtenidos, por lo cual consideramos que el perfil 181 tumoral puede ser incluido en el análisis comparativo y comparado con el perfil normal promedio de las muestras de los otros pacientes.

Un total de 12 proteínas de fueron identificadas mediante espectrometría de masas ESI-MS/MS. Un análisis exhaustivo de estas proteínas hubiera incluido el análisis por inmunohistoquímica de todas ellas, sin embargo, de inicio fue planteada la elección de solo una de las proteínas que fueran identificadas por razones de tiempo.

A la mayoría de las proteínas identificadas en este estudio se les ha asociado en menor o mayor grado con el proceso oncogénico en diferentes órganos incluyendo la mama (Tabla 8). La elección de la proteína Rho GDI 2 fue hecha en base a la bibliografía consultada y a la importancia que tiene en diferentes procesos celulares que en su mayoría se han observado desregulados en procesos tumorales como la progresión del ciclo celular, la apoptosis, la organización del citoesqueleto, la motilidad celular y la expresión génica, mismas funciones que son comunes a muchas proteínas usadas actualmente como marcadores moleculares en cáncer, por ejemplo RE, RP, HER2, Ki67, Ciclina D, c-kit, p53 y BCL-2 entre otros (44).

A pesar de que Rho GDI 2 fue identificada como sobreexpresada en tumores de mama (50) y se llevó a cabo una correlación con los datos de metástasis y sobrevida, observando la tendencia de que las pacientes con los tumores que sobreexpresaron a Rho GDI 2 tenían una sobrevida libre de enfermedad y una sobrevida libre de metástasis menores a las comparadas con las pacientes con tumores que no sobreexpresaron Rho GDI 2, en dicho estudio no se evaluó el estado de los receptores hormonales. Además dichos datos de sobrevida libre de enfermedad y libre de metástasis correlacionan con los datos clínicos ya observados para los tumores de mama triple negativo (8, 13, 24, 25, 33, 53).

Como inicio de la validación de Rho GDI 2, se llevó a cabo la inmunodetección por Western blot de dicha proteína en los extractos proteicos purificados que fueron utilizados para la obtención de los perfiles proteómicos. Sin embargo este único ensayo de Western blot no contó con un control de carga de actina, ya que en dicho único

ensayo se utilizó toda la muestra sobrante, misma razón por la cual en 2 muestras se utilizaron 80 μg de extractos proteicos y para otras 2 muestras 18 μg . Sin embargo, lo observado en la inmunodetección correlaciona con lo observado en los perfiles proteómicos (Figura 15).

En los estudios de identificación de proteínas que se expresan diferencialmente suelen llevarse a cabo varios tipos de ensayos de validación, en el presente trabajo además de la inmunohistoquímicas en los microarreglos de tejidos, se investigó la inmunodetección de Rho GDI 2 en 8 líneas celulares de diferentes órganos que incluyen próstata, cervix, mama, hígado y pulmón, todas ellas son derivadas de tejidos epiteliales y son derivadas de tumores a excepción de la línea PWR-1E que es considerada normal, ya que proviene de una hiperplasia epitelial benigna prostática.

En algunos estudios han sido utilizadas hasta 10 líneas celulares para evaluar la expresión de una proteína de interés (48), mientras que en otros no se ha analizado la proteína identificada por electroforesis 2D en líneas celulares (50). Sería de gran importancia el análisis de la proteína Rho GDI 2 en líneas celulares de mama que no son consideradas tumorales por ejemplo, en la línea celular MCF-12A y en un número mayor de líneas celulares, así mismo, a fin de tener una aproximación más amplia del estado de la proteína de interés sería necesario el análisis de los niveles ARNm correspondiente a dicha proteína, además de la evaluación de las isoformas que pudiera tener la proteína en cuestión.

BIBLIOTECA UACM

La proteína Rho GDI 2 mostró una alta expresión en la línea celular de hígado HepG2 y en la línea celular de mama MDA-MB231, lo cual ya había sido reportado para esta última (51), y no así, para HepG2 caracterizada por ser carente de un fenotipo invasor y metastásico (54), contrario a la función hallada en la línea de MDA-MB231 para Rho GDI 2 (50) y dato que correlaciona con lo observado para cáncer de vejiga (47).

Actualmente, los tumores de mama clasificados como triple negativo son los únicos que no cuentan con marcadores moleculares que pudieran ser útiles en el diagnóstico, pronóstico o tratamiento de dicha entidad, por ello, el estudio de este tipo particular de cáncer es de gran importancia. En este trabajo experimental hemos descrito la sobreexpresión de la proteína Rho GDI 2 en tumores de mama triple negativo, con ello, esperamos más estudios que pudieran ayudar a dilucidar la función de esta proteína en estos tumores.

VII. CONCLUSIONES.

1. Se obtuvieron los perfiles proteómicos de 7 biopsias de tumores de mama triple negativo y los perfiles de 6 biopsias de tejido normal con una adecuada resolución, patrones similares, reproducibles y aptos para hacer comparaciones pareadas e intermuestrales.
2. Mediante análisis proteómico de tumores de mama triple negativo y tejido mamario normal, identificamos un total de 12 proteínas que presentarán expresión diferencial.
3. Rho GDI2 se encontró sobreexpresada en los tumores de mama triple negativo con respecto al tejido normal de la misma paciente, al igual que los tumores clasificados como luminales y Her2+, sin embargo, los tumores Her2+ mostraron una expresión relativa de Rho GDI 2 mayor que la de los tumores triple negativo
4. Rho GDI 2 presentó una expresión variable en las líneas celulares que fueron evaluadas, sin embargo la tendencia es que presente una baja expresión, a excepción de las líneas HepG2 y MDA-MB231 en las cuales fue observada una expresión alta respecto al control de actina y a los niveles de Rho GDI 2 en las demás líneas celulares.

BIBLIOGRAFÍA

1. Vinagre Martínez LM. Anatomía quirúrgica de la mama. *Cirugía de mama-Asociación Española de Cirujanos*. 2009; 1: 28-37.
2. Cancer Mundial, International Agency for Research on Cancer, IARC, (<http://www-dep.iarc.fr>)
3. Boyle P y Levin B, 2008. "World Cancer Report 2008", World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, Lyon.
4. Knaul FM, Nigenda G, Lozano R, Arreola-Orleans H, Langer A, Frenk J. Breast Cancer in Mexico: a pressing priority. *Rep Health Matt* 2008 16(32):113-123.
5. Secretaría de Salud. Defunciones 1979-2007. Sistema Nacional de Información en Salud. Dirección General de Información en Salud. Secretaría de Salud. México, D.F.
6. Rodríguez Cuevas S. Capurso García M. Epidemiología del Cáncer de Mama. *Ginecología Obstetricia México* 2006; 74:585-593.
7. Levi F, Bosseti C, Luccini F, Negri E and La Vecchina C, Monitoring the decrease in Breast cancer mortality in Europe. *Eur. J. Cancer Prevention* (2005), 14(6): 497-502.
8. Ana Bosch, Pilar Eroles, Rosa Zaragoza, Juan R. Viña, Ana Lluch. Triple negative Breast cancer: Molecular features, pathogenesis, treatment and current lines of research. *Cancer Treatment Reviews* 36 (2010) 206-215.

9. Rodriguez-Cuevas S, Macias CG, Franceschi D, and Labastida S. Breast carcinoma presents a decade earlier in Mexican Women than in women in the United States or European countries. *Cancer*. 2001; 91(4): 863-868
10. Calderon-Garcidueñas AL. et al. Risk factors of Breast cancer in Mexican women. *Salud Publica Mex*. 2000; 42:26-33
11. Felicia Marie Knaul, Héctor Arreola-Ornelas, Enrique Velázquez, Javier Dorantes, Oscar Méndez, Leticia Ávila Burgos. El costo de la atención medica del cancer mamario: el caso del Instituto Mexicano del Seguro Social. *Salud Pública Mex*. 2009, vol. 51, supl 2. S286-S295.
12. Boyle P y Levin B, eds., 2008. World Cancer Report 2008, World Health Organization, International. *Agency for Research on Cancer, Lyon*.
13. S.J. Dawson, E. Provenzano, C. Caldas. Triple Negative Breast Cancers: Clinical and Prognostics Implications 27-35.
14. Valle-Solís E. Aura A., Myryam S.U. Recomendaciones en cancer metastasico. *Gaceta Mexicana de Oncología*. Vol. 8 Suplemento 2, 2009.
15. Fattaneh A. Tavassoli, Peter Devilee. Tumours of the Breast and Female Genital Organs. *World Health Organization Classification of Tumours*. 2003.
16. Perou et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000. 406: 747-752.
17. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumour subclasses with clinical implications. *PNAS*. 2001; 98; 10869-10874.

18. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J. et al. Repeated observation of breast tumour subtypes in independent gene expression data sets. *PNAS*. 2003; 100; 8418-8423.
19. Reis-Filho JS, Westbury C, Pierga JY. The impact of expression profiling of prognostic and predictive testing in breast cancer. *J. Clin. Pathol.* 2006; 59; 225-231.
20. Brenton JD, Carey LA, Ahmed AA, Caldas C. Molecular Classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? *J. Clin. Oncol.* 2005; 23; 7350-7360.
21. Carey LA, Dees EC, Sawyer L et al. Triple Negative paradox: primary tumour chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin. Cancer Res.* 2007; 13; 2329-2334.
22. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI et al. Triple negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin. Cancer Res.* 2007; 13, 4429-4434.
23. Haffty BG, Yang Q, Reiss M et al. Locoregional relapse and distant metastasis in conservatively managed triple negative early-stage breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 2006; 24; 5652-5657.
24. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR et al. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer* 2007; 109; 25-32
25. Tischkowitz M, Brunet JS, Begin LR et al. Use of Immunohistochemical markers can refine prognosis in triple negative breast cancer. *BMC Cancer* 2007; 7; 134.
26. Bauer KR, Brown M, Crees RD, Parise CA, Caggiano V. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer registry. *Cancer* 2007; 109; 1721-1728.

27. Harris LN, Broadwater G, Lin NU et al. Molecular subtypes of breast cancer in relation to paclitaxel response and outcomes in women with metastatic disease: results from CALGB 9342. *Breast Cancer Research*. 2006; 8; R66
28. Abd El-Rehim DM, Ball G, Pinder SE et al. High-throughput protein expression analysis using tissue microarray technology of a large well-characterised series identifies biologically distinct classes of breast cancer confirming recent cDNA expression analyses. *Int. J. Cancer* 2005; 116; 340-350.
29. Calza S, Hall P, Auer G et al. Intrinsic molecular signature of breast cancer in a population-based cohort of 412 patients. *Breast Cancer Res*. 2006; 8; R34.
30. Turner N, Tutt A, Ashworth A. Targeting the DNA repair defect of BRCA tumours. *Curr. Opinion Pharmacol*. 2005; 5; 388-393.
31. Bartz SR, Zhang Z, Burchard J et al. Small interfering RNA screens reveal enhanced cisplatin cytotoxicity in tumour cell having both BRCA network and TP53 disruptions. *Mol. Cell. Biol*. 2006; 26; 9377-9386.
32. Rouzier R, Perou CM, Symmans WF et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin. Cancer Res*. 2005; 11; 5678-5685.
33. J.S. Reis-Filho, AN J Tutt. Triple Negative Tumours: A critical Review. *Histopathology* 2008, 52, 108-118.
34. Zepeda-Castilla JE, Recinos-Money E., Cuellar-Hubbe M., Robles-Vidal CD., Maafs-Molina E. Clasificación molecular del cáncer de mama. *Cir Ciruj* 2008; 76: 87-93.

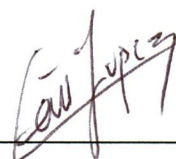
35. Palacio-Mejia L S, Lazcano-Ponce D, Allen-Leigh Betania. Diferencias regionales en la mortalidad por cáncer de mama y cérvix en México entre 1979 y 2006. *Salud pública de México*. vol. 51, suplemento 2 de 2009.
36. Bashar A Z, Townsend Paul A. SELDI-TOF proteomic profiling of breast carcinomas identifies clinicopathologically relevant groups of patients similar to previously defined clusters from cDNA expression. *Breast Cancer Research* 2008, 10:107.
37. Schulz DM, Bollner C, Thomas G, Atkinson M, Esposito I, Hofler H, Aubele M. Identification of differentially expressed proteins in triple-negative breast carcinomas using DIGE and mass spectrometry. *J. Proteome Res.* 2009 Jul;8(7):3430-8.
38. Turner N, Lambros MB, Horlings HM, Pearson A, Sharpe R, Natrajan R, Geyer FC, Kouwenhove MV, Kreike V, Mackay A, Ashworth A, Reis-Filho JS. Integrative molecular profiling of triple negative breast cancers identifies amplicon drivers and potential therapeutic targets. *Oncogene* 2010, 29, 2013-2023.
39. Hu Xiaolan, Howard M, O'Brien C, Haydu L, Honchell CD, Peter M, Brock A, Thomas D, Wu Lukas C. Amler, John Chant. Genetic Alterations and Oncogenic Pathways Associated with Breast Cancer Subtypes. *Mol Cancer Res* 2009;7(4). April 2009.
40. Gomez H. Vazquez J.L. Fernandez S. 2003. Detección de cáncer de mama en mujeres derechohabientes del IMSS. Resultados de la encuesta nacional de salud 2000. Instituto Mexicano del Seguro Social. División técnica de información estadística en salud.

41. Valladares A, Salamanca F, Madrigal-Bujaidar E, Arenas D. Identification of chromosomal changes with comparative genomic hybridization in sporadic Breast cancer in Mexican women. *Cancer Genet Citogenet.* 2004. 152:163-166.
42. Bas Kreike, Marieke Kouwenhove, Hugo Horlings. Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas. *Breast Cancer Res* 2007, 9:R65,
43. Baocun Sun, Shiwu Zhang, Danfang Zhang, Yan Li, Xiulan Zhao, Ye Lou, Yuhong Gou. Identification of Metastasis-Related Proteins and Their Clinical Relevance To Triple-Negative Human Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14(21).
44. Francisco J E, Gabriel N H. Prognostic molecular markers in early breast cancer. *Breast Cancer Res* 2004, 6:109-118.
45. Buchholz TA, Davis DW, McConkey DJ, Symmans WF, Valero V, Jhingran A, Tucker SL, Pusztai L, Cristofanilli M, Esteva FJ, Hortobagyi GN, Sahin AA: Chemotherapy-induced apoptosis and Bcl-2 levels correlate with breast cancer response to chemotherapy. *Cancer J* 2003, 9:33-41.
46. Y Scherle P, Behrens T, Staudt LM. Ly-GDI, a GDPdissociation inhibitor of the RhoA GTP-binding protein, is expressed preferentially in lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:7568-72.
47. Theodorescu D, Sapinoso LM, Conaway MR, et al. Reduced expression of metastasis suppressor RhoGDI2 is associated with decreased survival for patients with bladder cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10:3800-6.
48. Yaqin Zhang and Baolin Zhang. D4-GDI, a Rho GTPase Regulator, Promotes Breast Cancer Cell Invasiveness. *Cancer Res* 2006; 66:11.

49. Keely PJ, Westwick JK, Whitehead IP, et al. Cdc42 and Rac1 induce integrin-mediated cell motility and invasiveness through PI(3)K. *Nature* 1997;390:632–6.
50. Hyeong-Gon Moon, Sang-Ho Jeong, Young-Tae Ju, Chi-Young Jeong, Jong Sil Lee. Up-regulation of RhoGDI2 in Human Breast Cancer and Its Prognostic Implications. *Cancer Res Treat.* 2010;42(3):151-156.
51. Yaqin Zhang, Sun Young Moon, Baolin Zhang. Silencing of D4-GDI Inhibits Growth and Invasive Behavior in MDA-MB-231 Cells by Activation of Rac-dependent p38 and JNK Signaling. *Journal Of Biological Chemistry.* 2009;284:12956-12965.
52. Ellenbroek S, Collard J. RhoGTPases: functions and association with cancer. *Clin Exp Metastasis* 2007, 24 (8): 657–72.
53. Lisa Carey, Eric Winer, Giuseppe Viale, David Cameron & Luca Gianni. Triple-negative breast cancer: disease entity or title of convenience?. *Nature Reviews Clinical Oncology* 7, 683-692.
54. Darlington GJ, et al. Growth and hepatospecific gene expression of human hepatoma cells in a defined medium. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 23: 349-354, 198.
55. Knaul FM, López-Carillo L. México Reporte Rosa 2009-2010: Cáncer de mama a conciencia. Informe final. *Fundación Mexicana para la Salud*, 2009.
56. Mark D Sternlicht. Key stages in mammary gland development. The cues that regulate ductal branching morphogenesis. *Breast Cancer Research* 2006, 8:201.

El jurado designado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México aprobó esta tesis el día 26 de julio de 2011, en la Ciudad de México, para optar al Grado de Maestro en Ciencias Genómicas al Licenciado en Odontología Marcos Agustín Muñiz Lino.

Dr. Mario César López Camarillo



Dra. Elena Aréchaga Ocampo



Dra. Mavil López Casamichana



Dra. Maria Elizbeth Alvarez Sánchez



Coordinación de Certificación y Registro

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada Humano me es ajeno

Pedro Abumada



REP. DE CUBA No. 99 DESP. 23-A
CENTRO HISTÓRICO MÉXICO, D.F.

TESIS URGENTES

PRESUPUESTOS DE 9:30 A.M. A 7:00 P.M.

SABADOS DE 9:30 A.M. A 3:00 P.M.

TEL. 5512-8469

PART. 2619-0742