

UACM

UNIVERSIDAD AUTONOMA
DE LA CIUDAD DE MEXICO

Nada humano me es ajeno

POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

**IDENTIFICACIÓN DE PROTEINAS EXPRESADAS
Y FOSFORILADAS DE MANERA DIFERENCIAL
EN TUMORES DE CANCER DE MAMA
INVASOR DE PACIENTES MEXICANAS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS GENÓMICAS

P r e s e n t a:

Biol. Miguel Angel Fonseca Sánchez

Director de tesis: Dr. Mario César López Camarillo

Co-directora de tesis: Dra. María Elizbeth Álvarez Sánchez

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTOR

Dr. Mario César López Camarillo
Profesor Titular. Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

CO-DIRECTORA

Dra. María Elizbeth Álvarez Sánchez
Profesora Titular. Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

ASESORES

Dr. José Efraín Garrido Guerrero
Profesor Titular. Posgrado en Genética y Biología Molecular
Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN

Dra. Laurence A. Marchat Marchau
Profesora Titular. Posgrado Institucional en Biomedicina Molecular
Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía de IPN

Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga
Profesora Titular. Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dr. Patricio Gariglio Vidal
Profesor Titular. Posgrado en Genética y Biología Molecular
Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN

Dr. José de la Luz Díaz Chávez
Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

LECTOR DE TESIS

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

El presente proyecto de investigación contó con el apoyo académico y económico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México a la cual agradezco.

Esta tesis forma parte del proyecto ICyT “Búsqueda de marcadores moleculares de valor pronóstico en cáncer de mama”, el cual fue financiado por el Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal. También agradezco al ICyT-DF por la beca otorgada para realizar este proyecto durante el periodo de agosto 2008 a julio del 2009.

La mayor parte del trabajo experimental se llevó a cabo en el laboratorio 1 del Posgrado en Ciencias Genómicas bajo la tutoría del Dr. César López Camarillo y de la Dra. María Elizbeth Álvarez Sánchez.

Agradezco ampliamente la colaboración del Instituto de Enfermedades de la mama y la Fundación Mexicana de Fomento para la Prevención Oportuna del Cáncer de Mama, A.C, FUCAM, por la donación de las biopsias de tejido normal y tumoral de las pacientes utilizadas en este estudio.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. César López Camarillo por el apoyo y el tiempo brindado, así como por haberme invitado a formar parte de su grupo de investigación y el interés que tiene en mi formación profesional.

A la Dra. María Elizbeth Álvarez Sánchez por su asesoría, su paciencia y el espacio en su sitio de trabajo.

A la Dra. Elisa Azuara Liceaga por su participación en este trabajo y brindarme su punto de vista sobre el mismo

A la Dra. Mavil López Casamichana por dedicarle tiempo no previsto a la revisión de este escrito

Al Dr. Patricio Gariglio por sus comentarios e interés hacia este trabajo y mi formación académica

A los profesores del posgrado por su apoyo y críticas constructivas hacia el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. José de la Luz Díaz Chávez por el tiempo, interés y consejos brindados al desarrollo de este trabajo y su amistad sincera.

Al Dr. José Efraín Garrido Guerrero quien ha participado en mi formación desde la licenciatura, y me ha brindado apoyo tanto académico como personal, así como su amistad brindada de tantos años.

A mis compañeras de Posgrado Isabel Gámez, Laura Vásquez, Itzel López y Olga Hernández por su amistad y apoyarme cada vez que acudía a ellas

Dedicatorias:

*A mis padres Alfonso Fonseca y Rosario Sánchez
Por darme la vida y su amor.
Son muy importantes para mi*

*A mis hermanos Luis y Efrén
Por todo lo que hemos vivido juntos
Y el cariño que nos tenemos*

*A mi hija Mayda Aurora
Por ser un regalo divino
Y llenarme de alegría*

*A mis amigos
Jorge Angel y David Cruz
Linda y Marco
Rene Escalona y Genaro Vazquez
Oscar Cano
Por ser mi otra familia y
contar en cualquier momento con ustedes*

*A Yuridmia
Por aparecer en mi vida con tu luz
Y brindarme tu cariño*

INDICE

	<i>pág.</i>
ABREVIATURAS	i
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABLAS	v
RESUMEN	vi
I. INTRODUCCIÓN.	
1. Antecedentes generales del tema.	1
1.1. Generalidades del cáncer de mama.	1
1.2. Estructura de la glándula mamaria.	2
1.3. Clasificación del cáncer de mama por estadio TNM.	3
1.4. Clasificación del cáncer de mama en base a histopatología.	6
1.5. Clasificación del cáncer de mama en base a marcadores hormonales .	6
1.6. Clasificación molecular del cáncer de mama.	9
1.7. Estadísticas mundiales de morbilidad y mortalidad del cáncer de mama.	9
1.8. Estadísticas del cáncer de mama en México.	15
1.9. Factores de riesgo en cáncer de mama.	20
1.10. Tratamientos contra el cáncer de mama.	21
2. Estado del arte.	
2.1. El cáncer de mama en México.	24
2.2. Diagnóstico molecular del cáncer de mama.	27
2.3. Marcadores moleculares de pronóstico en cáncer de mama.	30
2.4. Perfiles de expresión en cáncer de mama.	36
3. Antecedentes particulares del proyecto.	
3.1. Perfiles de expresión proteómica en cáncer de mama.	37
3.2. Fosforilación en cáncer.	39
3.3. El fosfoproteoma del cáncer de mama.	42
4. Importancia de continuar el estudio del tema.	45
5. Hipótesis.	46

II. OBJETIVOS.

- | | |
|----------------------------|----|
| 1. Objetivo general. | 47 |
| 2. Objetivos particulares. | 47 |

III. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.

- | | |
|-------------------------------------|----|
| 1. Estrategia experimental general. | 49 |
|-------------------------------------|----|

IV. METODOLOGÍA

- | | |
|--|----|
| 1. Cultivos celulares. | 50 |
| 2. Extracción de proteínas de la línea celular MCF-7. | 51 |
| 3. Biopsias mamarias. | 51 |
| 4. Criterios de selección de las muestras analizadas. | 52 |
| 5. Extracción de proteínas de biopsias mamarias. | 54 |
| 6. Purificación de proteínas. | 54 |
| 7. Electroforesis de proteínas en doble dimensión (2-D) | 55 |
| 8. Tinción de geles. | 56 |
| 9. Análisis PD-Quest. Escisión manual de puntos. | 58 |
| 10. Inducción de fosforilación en células MCF-7. | 59 |
| 11. Inmunoprecipitación de fosfoproteínas de biopsias de tejido mamario. | 59 |
| 12. Western blot. | 60 |

V. RESULTADOS

- | | |
|---|----|
| 1. Elección del método de lisis celular. | 62 |
| 2. Determinación de la concentración de proteínas. | 64 |
| 3. Tinción de proteínas. | 66 |
| 4. Reproducibilidad de los perfiles proteómicos. | 67 |
| 5. Perfiles proteómicos tumorales en minigeles mediante SDS-PAGE 2-D. | 70 |
| 6. Uso de marcadores moleculares para electroforesis en 2-D. | 72 |
| 7. Evaluación de la calidad de la muestra de proteínas. | 72 |
| 8. Perfil proteómico de tejido mamario normal. | 75 |
| 9. Perfil proteómico de biopsias tumorales. | 77 |
| 10. Análisis comparativo entre el perfil de expresión mamario normal y tumoral mediante PD-Quest. | 80 |
| 11. Detección de proteínas diferenciales. | 82 |

12. Elección de proteínas a escindir.	84
13. Identidad de la proteína 4203 y 4303.	88
14. Nucleoporinas en cáncer.	92
15. Perfil fosfoproteómico.	94
16. Perfil de fosfoproteínas en células MCF-7.	95
17. Perfil de fosfoproteínas en biopsias tumorales.	96
18. Especificidad del fluoróforo Pro-Q Diamond.	96
19. Detección de fosfoproteínas mediante el uso de anticuerpos.	101
20. Detección de fosfoproteínas en biopsias de tejido mamario.	102
VI. DISCUSION.	105
VII. CONCLUSIONES.	110
VIII. APENDICE	111
IX. BIBLIOGRAFIA	113

ABREVIATURAS

ASR	Age Standardized Ratio
BRCA1	Breast Cancer 1
BSA	Bovine Serum Albumine
cDNA	DNA complementario
CK	Citoqueratina
Cm	Centímetros
ddH ₂ O	Agua desionizada
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
ECL	Enzymatic chemiluminiscense
EDTA	Ácido etilén diamino tretracético
g	Gramo
h	hora
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidermal humano
FUCAM	Fundación Mexicana de Fomento para la Prevención Oportuna del Cáncer de Mama A.C
Her2	Receptor 2 del factor de crecimiento epidermal humano
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
INEGI	Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática
INSP	Instituto Nacional de Salud Pública
IP	Inmunoprecipitación
kDa	Kilodalton
ml	Mililitro
mg	Miligramo
min	Minutos
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensajero
O/N	Toda la noche

PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Amortiguador de fosfatos salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
PI	Punto isoeléctrico
pm	picomolar
PM	Peso molecular
PSA	Persulfato de amonio
RE	Receptor de estrógenos
RP	Receptor de progesterona
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensajero
Seg	Segundos
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SIPAM	Salud Integral Para la Mujer A.C
SNPs	Single Nucleotide Polimorfism
SSDF	Secretaria de Salud del Distrito Federal
TCA	Acido Tricloroacético
TEMED	N,N,N',N', tetrametilen-diamina
UACM	Universidad Autónoma de la Ciudad de México
V	Volts
Vh	Voltaje hora
μg	Microgramo
μl	Microlitro
μM	Micromolar

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la glándula mamaria	4
Figura 2. Incidencia y mortalidad de los cánceres más frecuentes a nivel mundial	8
Figura 3. Prevalencia del cáncer en mujeres a nivel mundial	9
Figura 4. Número de nuevos casos de cáncer en mujeres a nivel mundial	
Figura 5. Mortalidad en mujeres mexicanas por cáncer cervicouterino y cáncer de mama	17
Figura 6. Tasas estandarizadas de mortalidad por cáncer cervical y cáncer de mama por regiones	19
Figura 7. Diagrama de flujo de la estrategia general	50
Figura 8. Comparación de dos métodos de extracción de proteínas	62
Figura 9. Determinación de la cantidad de proteína adecuada para electroforésis 2-D	64
Figura 10. Comparación métodos de tinción de geles	66
Figura 11. Reproducibilidad en ensayos independientes	68
Figura 12. Perfiles proteómicos tumorales en minigeles.	71
Figura 13. Perfil de marcadores moleculares 2-D	72
Figura 14. Evaluación de la calidad de la muestra	72
Figura 15. Empalme de los perfiles proteómicos de tejido mamario normal	75
Figura 16. Perfiles proteómicos de tejido mamario tumoral	76
Figura 17. Empalme de los perfiles proteómicos de tejido mamario tumoral	77
Figura 18. Empalme de todos los perfiles proteómicos de tejido mamario	79
Figura 19. Visualización del Spot Review	82
Figura 20. Visualización de proteínas diferenciales mediante el Scatter plot	84
Figura 21. Selección de proteínas diferenciales	85
Figura 22. Espectro de MS/MS del spot 4203 y secuencia de la posible proteína identificada como sobreexpresada en las biopsias tumorales.	90
Figura 23. Organización estructural del poro nuclear.	91

Figura 24. Estructura y rearrreglos de las cuatro nucleoporinas implicadas en cáncer.	93
Figura 25. Fosforilación en células MCF-7.	97
Figura 26. Fosforilación en biopsia mamaria tumoral.	98
Figura 27. Evaluación de la especificidad del fluroforo Pro-Q Diamond.	100
Figura 28. Detección de proteínas fosforiladas mediante el uso de anticuerpos en células MCF-7.	103
Figura 29. Detección de proteínas fosforiladas en biopsias de tejido mamario normal (N) y tumoral (T) de 3 pacientes.	104

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación TNM del cáncer de mama	5
Tabla 2. Clasificación histopatológica del cáncer de mama.	7
Tabla 3. Clasificación del cáncer de mama según los marcadores hormonales	8
Tabla 4. Clasificación molecular del cáncer de mama	10
Tabla 5. Comparación del cáncer de mama en México y el mundo.	16
Tabla 6. Genes con valor pronóstico en cáncer de mama	36

RESUMEN

El cáncer con mayor incidencia y mortalidad en mujeres alrededor del mundo es el cáncer de mama. En la ciudad de México se presentan el mayor número de casos del país. La reducción de la mortalidad requiere el desarrollo de estrategias de detección temprana y de mejores métodos de tratamiento. Alteraciones en la expresión y fosforilación de proteínas podrían estar relacionadas con el desarrollo del cáncer de mama. Tomando en cuenta que la expresión génica más real y representativa no es la del transcriptoma sino la del proteoma, el objetivo de este trabajo es la búsqueda de proteínas que se encuentren fosforiladas y/o expresadas de manera diferencial en muestras de cáncer de mama esporádico en pacientes mexicanas.

En el presente proyecto analizamos los perfiles de expresión de proteínas en cáncer de mama. Para lograr esto, estandarizamos las metodologías experimentales en la línea celular MCF7 de cáncer de mama, con la finalidad de establecer la obtención de un patrón de expresión de proteínas definido, así como evaluar su reproducibilidad. Se analizaron los perfiles de expresión proteómica mediante electroforesis en 2-D, así como el patrón de proteínas fosforiladas en tejidos mamarios normales y tumorales de pacientes mexicanas.

La parte central del proyecto consistió en analizar los patrones proteicos de expresión en biopsias de carcinoma de mama en mujeres de la Ciudad de México. Las biopsias fueron donadas por la Fundación Mexicana de Fomento para la Prevención Oportuna del Cáncer de Mama, A.C. FUCAM. Se analizaron biopsias de carcinoma ductal invasivo y se compararon los patrones proteicos de expresión y fosforilación con biopsias de tejido sano provenientes de las mismas pacientes. Posteriormente se hizo la identificación de proteínas diferenciales mediante análisis en MALDI-TOF. La identificación de proteínas fue realizada en la Unidad de Proteómica del Instituto de Biotecnología de la UNAM en Cuernavaca. Los resultados muestran que la proteína identificada como sobreexpresada en los tumores mamarios corresponde a la nucleoproteína Nup p58/45 (Nup58) referida también como Nucleoporin-like 1, de 599 a.a la cual podría ser candidata para estudiarse como un posible marcador diagnóstico. En cuanto a la fosforilación diferencial de proteínas esta se evaluó mediante el uso del anticuerpo 4G10 anti-fosfotirosina (millipore), encontrando que es posible evidenciar diferencias en el estado de fosforilación de diversas proteínas entre el tejido mamario normal y el tumoral. En biopsias de cáncer de mama encontramos 4 proteínas fosforiladas de manera diferencial cuya identidad queda por definirse.