

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

Búsqueda e identificación de proteínas moduladas
en respuesta al tratamiento con epigallocatequina-3
galato (EGCG) del té verde en las líneas celulares
A549 de cáncer de pulmón y MCF7 de cáncer de
mama

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS GENÓMICAS

PRESENTA

Biól. Exp. Lidia López Sánchez

MÉXICO, D.F.

ENERO 2013

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 DE TESIS

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

CO-DIRECTORA DE TESIS

Dra. Elena Aréchaga Ocampo

Subdirección de Investigación Básica

Instituto Nacional de Cancerología

ASESORES

Dra. Laurence Annie Marchat Marchau

Profesora titular del Programa Institucional de Biomedicina Molecular

Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía-IPN

Dr. Carlos Pérez Plasencia.

Instituto Nacional de Cancerología, FES-Iztacala UNAM.

Dra. Mavil López Casamichana

Profesor Investigador.

Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Agradecimientos

Este trabajo de 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. El proyecto de investigación 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 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”. Agradezco también el apoyo al proyecto aprobado dentro de la Convocatoria para proyectos de investigación científica y tecnológica vinculada a la docencia y a la sociedad en la Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM-ICYTDF). Proyecto “Búsqueda de biomarcadores de quimioprevención mediante la identificación de proteínas moduladas en respuesta al tratamiento con el compuesto natural EGCG en células tumorales de cáncer de mama y pulmón” (PI2010-39).

ABREVIATURAS

aa	aminoácidos
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ATM	Ataxia-telangiectasia
CaMa	Cáncer de mama
CaPu	Cáncer de pulmón
CPCP	Cáncer de células pequeñas
CPCNP	Cáncer de células no pequeñas
DTT	Ditiotreitol
DHFR	Dihidrofolato reductasa
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
ECL	Quimioluminiscencia enzimática
EGCG	Epigallocatequina-3-galato
g	Gramo
h	Hora
HDGF	Factor de crecimiento derivado de hepatoma
<i>htert</i>	Gen de la telomerasa
IEF	Isoelectroenfoque
LamR	Receptor de laminina
ON	Toda la noche
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Amortiguador fosfato salino
PI	Punto isoeléctrico
pH	Potencial de hidrógeno
RTKs	Receptor tirosin cinasa
SDS	Dodecil sulfado de sodio

TA	Temperatura ambiente
uM	Micromoles
VEGFR	Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tumorigénesis.	3
Figura 2. Incidencia y mortalidad del cáncer entre hombres y mujeres a nivel mundial.	6
Figura 3. Anatomía de la glándula mamaria.	9
Figura 4. Anatomía del aparato respiratorio.	12
Figura 5. Incidencia y mortalidad de diferentes tipos de cánceres en México.	20
Figura 6. Número estimado de incidencia y mortalidad por CaMa en México para el 2015.	21
Figura 7. Número estimado de incidencia y mortalidad por CaPu en México para el 2015.	22
Figura 8. Estructura química de algunos fitoquímicos con poder quimiopreventivo y su fuente dietética.	26
Figura 9. Blancos moleculares del EGCG.	36
Figura 10. Diagrama de flujo de la estrategia experimental.	37
Figura 11. Micrografías que muestran la morfología de las células MCF7 después del tratamiento con diferentes concentraciones de EGCG durante 24 h.	52
Figura 12. Micrografías que muestran la morfología de las células MCF7 después del tratamiento con diferentes concentraciones de EGCG durante 48 h.	53
Figura 13. Micrografías que muestran la morfología de las células A549 después del tratamiento con diferentes concentraciones de EGCG durante 24 h.	55
Figura 14. Micrografías que muestran la morfología de las células A549 después del tratamiento con diferentes concentraciones de EGCG durante 48 h.	56
Figura 15. Representación gráfica de la viabilidad celular de MCF7 en respuesta al tratamiento con EGCG a diferentes concentraciones durante 24 y 48 h.	59

Figura 16. Representación gráfica de la viabilidad celular de A549 en respuesta al tratamiento con EGCG a diferentes concentraciones con EGCG durante 24 y 48 h.	62
Figura 17. Representación gráfica dosis-respuesta de células MCF7 de cáncer de mama después de 24 h de tratamiento con EGCG a diferentes concentraciones.	64
Figura 18. Representación gráfica dosis-respuesta de células A549 de cáncer de pulmón después de 48 h de tratamiento con EGCG a diferentes concentraciones.	66
Figura 19. Gel SDS-PAGE. Extractos de proteínas totales de MCF7 sin tratamiento y tratadas con 150 μ M de EGCG durante 24 h.	69
Figura 20. Gel SDS-PAGE. Extractos de proteínas totales de A549 sin tratamiento y tratadas con 300 μ M de EGCG durante 48 h.	70
Figura 21. Tasa de empalme entre los perfiles proteómicos de células MCF7 sin tratamiento en minigeles bidimensionales.	75
Figura 22. Tasa de empalme de los perfiles proteómicos de células MCF7 tratadas con 150 μ M de EGCG durante 24 h en minigeles bidimensionales.	76
Figura 23. Tasa de empalme de los perfiles proteómicos de células A549 sin tratamiento en minigeles bidimensionales.	77
Figura 24. Tasa de empalme de los perfiles proteómicos de células A549 tratadas con 300 μ M de EGCG durante 48 h en minigeles bidimensionales.	78
Figura 25. Demostración cuantitativa de proteínas diferencialmente expresadas en las células MCF7 sin tratamiento y tratadas con 150 μ M de EGCG durante 24 h.	82
Figura 26. Demostración cuantitativa de proteínas diferencialmente expresadas en las células A549 sin tratamiento y tratadas con 300 μ M de EGCG durante 48 h.	83
Figura 27. Perfiles proteómicos de células MCF7 sin tratamiento y tratadas con 150 μ M durante 24 h.	86
Figura 28. Perfiles proteómicos de células A549 sin tratamiento y tratadas con 300 μ M durante 48 h.	87
Figura 29. Interactoma de la ciclofilina A.	94

Figura 30. Interactoma del HDGF.	95
Figura 31 Gel de integridad SDS-PAGE al 10%.	98
Figura 32. Western blot de HDGF	100

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Número de nuevos casos y mortalidad del cáncer entre hombres y mujeres a nivel mundial.	7
Tabla 2. Componentes bioactivos.	27
Tabla 3. Tasas de empalme entre todos los geles de expresión de las células MCF7 y A549 sin tratamiento y tratadas con EGCG durante 24 h	79
Tabla 4. Identificación de proteínas moduladas en células A549 en respuesta al tratamiento con 300 μ M de EGCG durante 48 h mediante ESI-MS/MS.	90
Tabla 5. Identificación de proteínas moduladas en células MCF7 en respuesta al tratamiento con 150 μ M de EGCG durante 24 h mediante ESI-MS/MS.	91

INDICE

I. INTRODUCCIÓN

1.1. El cáncer.	1
1.2. El cáncer de mama y pulmón.	4
1.3. Estructura de la glándula mamaria.	8
1.4. Estructura del pulmón.	10
1.5. Factores de riesgo.	13
1.6. Métodos de diagnóstico.	15
1.7. Tratamiento.	17

II. ESTADO DEL ARTE

2.1. Cáncer de mama y de pulmón en México.	19
2.2. Diagnóstico molecular del cáncer de mama y cáncer de pulmón.	23
2.3. Dieta y cáncer en mujeres mexicanas.	24

III. ANTECEDENTES PARTICULARES DEL PROYECTO

3.1. Fitoquímicos y fuentes naturales.	25
3.2. El té verde.	28
3.3. Composición química.	28
3.4. Biodisponibilidad y biotransformación.	30
3.5. Blancos moleculares del EGCG.	31
3.6. Mecanismos moleculares asociados a la actividad antitumoral del EGCG.	33

IV. IMPORTANCIA DE CONTINUAR EL ESTUDIO

V. OBJETIVOS

VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

VII. METODOLOGÍA	40
7.1. Cultivos celulares de MCF7 y A549.	40
7.2. Tratamiento de las células MCF7 y A549 con el EGCG.	41
7.3. Ensayo de viabilidad celular.	42
7.4. Determinación de DL50 mediante el software Bio Stat ²⁰⁰⁹ en las líneas celulares MCF7 y A549 tratadas bajo diferentes concentraciones con EGCG durante 24 y 48 h.	43
7.5. Extracción de proteínas totales de células MCF7 y A549.	43
7.6. Purificación de proteínas.	44
7.7. Electroforesis bidimensional de proteínas.	45
7.8. Tinción de geles bidimensionales.	46
7.9. Análisis PD-Quest y corte manual de puntos.	46
7.10. Identificación de proteínas por espectrometría de masas mediante ESI-MS/MS.	47
7.11. Western blot de HDGF	47
7.12. Predicciones de interacción molecular.	48
VIII. RESULTADOS	
8.1. Detección de los cambios morfológicos en células MCF7 de cáncer de Mama y A549 de cáncer de pulmón después del tratamiento con diferentes concentraciones de EGCG durante 24 h y 48 h.	50
8.2. Ensayos de viabilidad celular.	57
8.3. Obtención de la DL50 del EGCG.	63
8.4. Extracción de proteínas totales a partir de células MCF7 y A549 sin tratamiento y tratadas con el EGCG.	67

8.5. Purificación y cuantificación de extractos proteicos totales de células MCF7 y A549 sin tratamiento y tratadas con el EGCG.	71
8.6. Análisis comparativo entre los perfiles proteómicos en SDS-PAGE 2D de células MCF7 y A549 sin tratamiento y tratadas con EGCG.	72
8.7. Detección de proteínas expresadas diferencialmente.	80
8.8. Elección de proteínas para ser identificadas por ESI-MS/MS.	84
8.9. Identificación de proteínas mediante ESI-MS/MS.	88
8.10. Predicción de las rutas celulares. .	92
8.11. Western blot de HDGF.	96
VI DISCUSIÓN	100
VII. CONCLUSIONES	104
IX. BIBLIOGRAFÍA	105

I. INTRODUCCIÓN

1.1. El cáncer.

El cáncer en general se caracteriza por la división celular descontrolada de células malignas de un tejido, las cuales adquieren la capacidad de inhibir la apoptosis e invadir y metastatizar hacia otros tejidos mediante el sistema linfático y circulatorio (Andrew y cols. 2004). Los agentes responsables de producir esta transformación se denominan agentes promotores o carcinógenos y pueden ser exógenos o endógenos. A este proceso se le conoce como carcinogénesis el cual puede durar años y está constituida por tres fases:

1. Fase de inicio; las células normales sufren una alteración en su material genético (ADN) provocando división celular descontrolada, y la inactivación de genes supresores de tumor que contribuyen al fenotipo maligno, tales como; FHIT, WWOX, APC, etc. (Sharma y Settleman, 2007), o a la activación de oncogenes que proceden de la mutación de protooncogénos cuyos productos promueven el crecimiento celular, tales como MYC y RAS (Hydbring y Gunnar, 2010), mutaciones en alelos de genes que regulan la apoptosis, como ETS1 (Pei y cols. 2005) y en los genes de reparación del ADN, tales como MLH1, MSH2 y otros (Yamada y cols. 2003; Meeran y cols. 2011). Las células son capaces de dividirse y transmitir a sus descendientes la mutación, las células involucradas en esta fase se denominan células iniciadoras.

2. Fase de promoción: en esta etapa los agentes promotores actúan de forma repetida sobre las células iniciadora por lo que adquieren el nombre de células promocionadas, por lo tanto, estas células responden con un crecimiento distinto a las células normales generando la expansión selectiva de las mismas.

Los agentes promotores alteran la transducción de señales celulares, lo que resulta en la alteración de la expresión génica mediada a través de receptores.

3. Fase de progresión: durante esta etapa las células iniciadas y promocionadas sufren nuevas mutaciones irreversibles en genes involucrados en la integridad del genoma, como el gen de la telomerasa (hTERT) (Meeran y cols., 2011) mutaciones en genes que regulan la angiogenesis y metástasis, como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Balantic y cols., 2012) y ERBB2 (Her2/neu) respectivamente, siendo este ultimo gen codificante para ErbB2 (HER2), el cual es un miembro de la familia de receptores del factor de crecimiento epidermal (EGFR/ErbB) (Press y cols.,1990).

Todas estas mutaciones son irreversibles, provocan inestabilidad genética e inmortalización celular, y dan origen a una masa de tejido denominada tumor (Figura 1). Existen diferentes tipos de tumores:

- **Tumores benignos (no cancerosos);** constituido por células que carecen del fenotipo maligno, por lo que no se diseminan a otras partes del cuerpo, de tal manera que no implican una amenaza grave a la salud, pueden extirparse y en la mayoría de los casos no vuelven a aparecer.
- **Tumores malignos (cancerosos);** formado por células cancerosas que pueden invadir tejidos cercanos, las células cancerosas pueden separarse del tumor maligno y entrar al sistema linfático y circulatorio a fin de metastatizar a otras partes del cuerpo (Instituto Nacional de Cáncer).

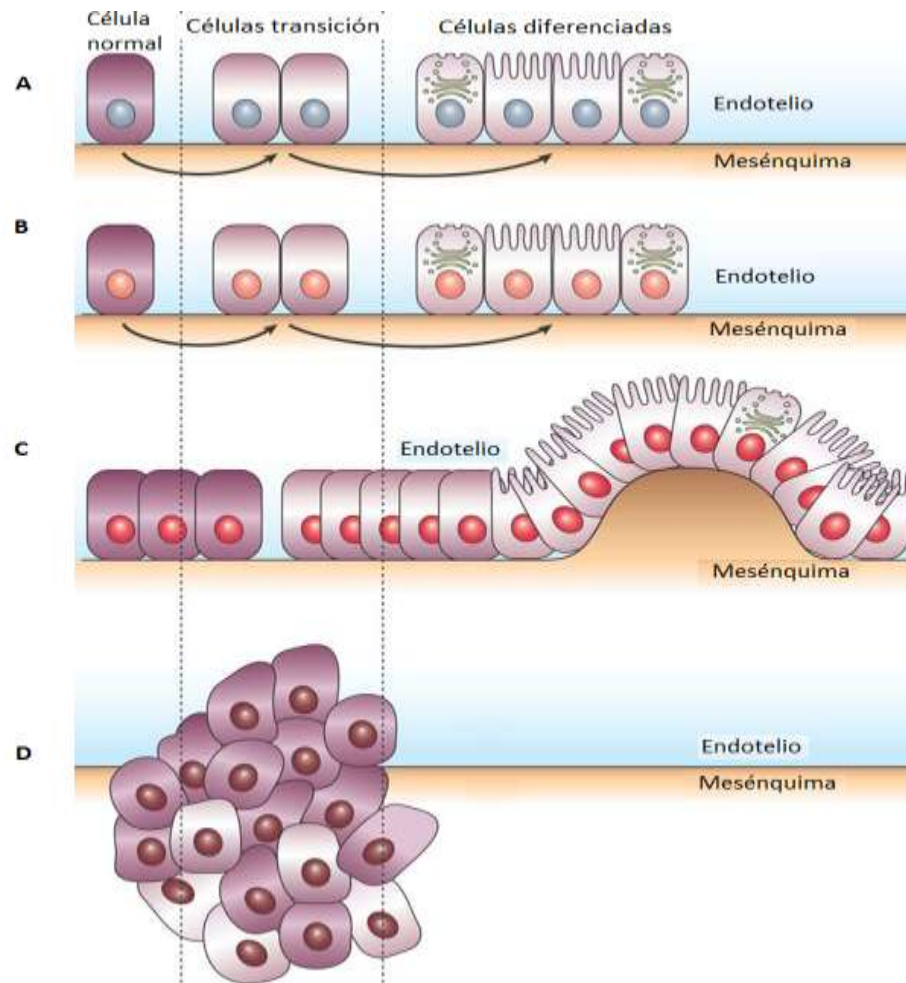


Figura 1. Tumorigénesis. (A) Crecimiento celular normal. (B) Las células endoteliales normales adquieren mutaciones en protooncogenes, y en genes que regulan las características morfológicas, por lo que se convierten en células iniciadas. (C) Ocurren mutaciones en genes de reparación al ADN, se desregula el crecimiento y la proliferación celular, dando lugar a la expansión de células promocionadas o aberrantes (lesión premaligna), en este estadio las células permanecen en un compartimento endotelial. (D) Aumenta el número de divisiones celulares de células promocionadas permitiendo a las células invadir el mesénquima y metastatizar (Taipale y Philip, 2001).

1.2. El cáncer de mama y pulmón.

El cáncer de mama (CaMa) y el cáncer de pulmón (CaPu) de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud son los tipos de cáncer más frecuente, de mayor incidencia y de mayor mortalidad entre la población en los últimos años a nivel mundial, por lo que constituyen un grave problema de salud pública en países desarrollados y subdesarrollados (Organización Mundial de la Salud) (Figura 2). La incidencia a nivel mundial del CaPu y de CaMa es del 6% y 12% respectivamente, por otro lado el 18% de las muertes mundiales son por cáncer de pulmón y el 10% por cáncer de mama (Cuadro 1) (Globocan). El número elevado de muertes por estas neoplasias es debido a que no existe cultura de la prevención ni tratamientos efectivos, por lo cual es necesario ampliar el conocimiento de los procesos moleculares que modulan el desarrollo y progresión de los tumores a fin de disminuir el riesgo a adquirir la enfermedad. En etapas iniciales el CaMa se manifiesta como un abultamiento, nódulo palpable diferente al resto del tejido mamario, generalmente tiende a crecer rápidamente, también se localizan zonas dolorosas o inflamadas, hay presencia de secreción por el pezón, asimetría de las mamas y cambios de coloración (Torres y Vladislavovna, 2007). El CaMa progresa de una invasión tumoral local hacia los ganglios linfáticos y luego a órganos distantes como los pulmones, el cerebro, los huesos y el hígado, por lo que se le considera una enfermedad sistémica. La mortalidad en pacientes por CaMa se debe a una enfermedad metastásica, la vida media de sobrevida es de 12-24 meses. Cuando el paciente presenta metástasis limitada es posible realizar cirugía a fin de extirpar la lesión, controlar la enfermedad y prolongar la sobrevida (Rashid y

Takabe, 2012), el reto, es determinar que pacientes se beneficiaran con la cirugía.

El CaPu es una neoplasia maligna con origen en las células que componen las vías aéreas y el parénquima pulmonar, de este modo se excluyen las metástasis pulmonares de otros tumores. Esta enfermedad en un inicio no causa síntomas, pero a medida que se desarrolla la enfermedad, estos pueden ser; dolor en tórax de manera constante, tos o esputos con sangre, cambio de voz, falta de aire, rápida pérdida de peso y fatiga, a menudo los síntomas no se manifiestan, si no hasta que la enfermedad está avanzada (Instituto Nacional de Cáncer). En general, salvo en los estadios muy iniciales, con y sin tratamiento, el CaPu tiene un mal pronóstico con tasas de supervivencia del 10% a los cinco años, esta neoplasia produce metástasis fundamentalmente en el hígado, las glándulas suprarrenales, el hueso, la medula ósea, y el sistema nervioso central, los síntomas cambian de acuerdo a la localización de las metástasis.

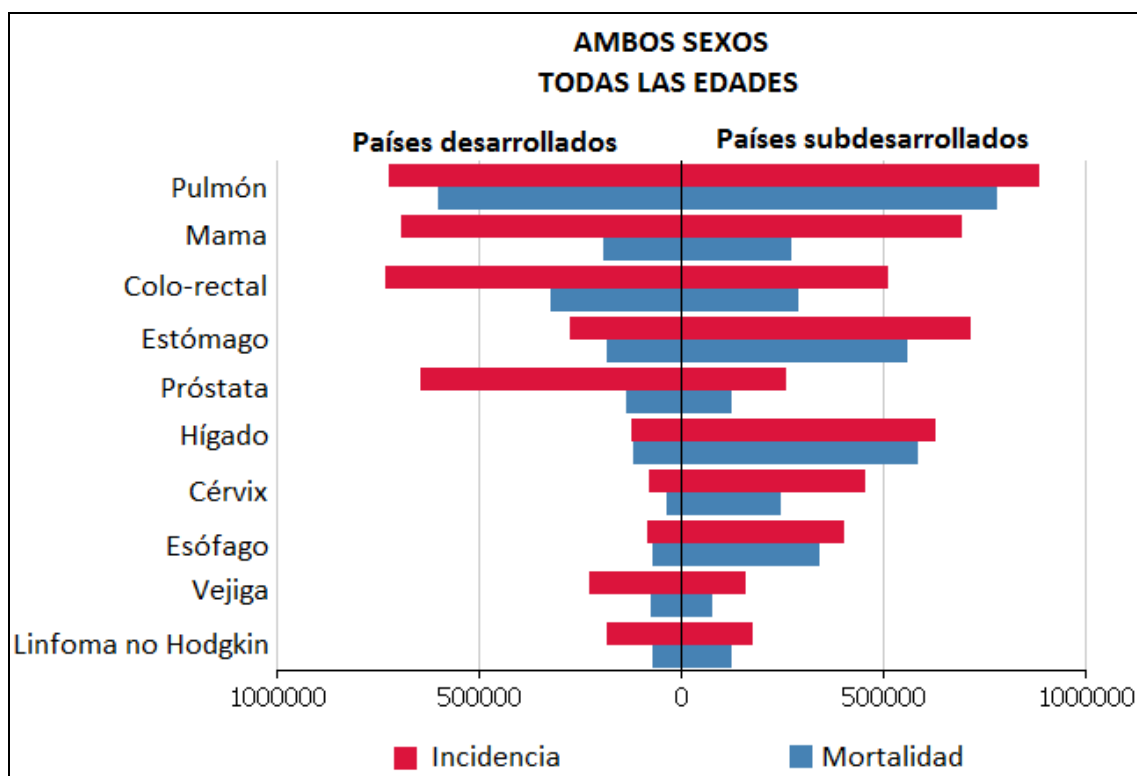


Figura 2. Incidencia y mortalidad del cáncer entre hombres y mujeres a nivel mundial. Se observa que el cáncer de mama y pulmón son los de mayor incidencia y mortalidad a nivel mundial en todas las edades (Globocan).

Mortalidad del cáncer de mama y pulmón a nivel mundial, ambos sexos y todas las edades	
Cáncer	Número de casos
Todos los cánceres	7564802
Pulmón	1376579
Mama	458503

Incidencia del cáncer de mama y pulmón a nivel mundial, ambos sexos y todas las edades	
Cáncer	Número de casos
Todos los cánceres	12662554
Pulmón	1608055
Mama	1384155

Tabla 1. Número de nuevos casos y mortalidad del cáncer entre hombres y mujeres a nivel mundial en todas las edades (Globocan).

1.3. Estructura de la glándula mamaria.

Las mamas son dos órganos situados simétricamente en relación con la línea mediana, en la cara superior y anterior del tórax. Se considera en ella una cara posterior, una cara anterior y una circunferencia (Thomas, 2011), se divide en dos regiones; la región glandular y la región grasa. La región glandular que abarca del 65-11%, está compuesta por células mioepiteliales contráctiles, forman ascinos glandulares, los cuales se agrupan formando de 15 a 20 estructuras llamadas lóbulos glandulares, de forma cónica; cuya característica es que contienen unidades funcionales llamadas lobulillos donde se encuentran de 10-100 estructuras tubulares huecas denominadas alvéolos, cuyas paredes están conformadas por células epiteliales lumbinales encargadas de la producción de leche. Los lóbulos se conectan con el pezón a través de los conductos galactóforos, revestidos de epitelio escamoso estratificado y extendido en un patrón radial (Cardiff y Wellings, 1999; Ramsay y cols. 2005; Latarjet y Ruiz, 2005). Por otro lado, la región grasa está constituida por tejido adiposo, el cual rodea a la glándula mamaria y le confiere sostén, además contiene una red de venas y arterias que se adosan sobre la cara superficial de la glándula mamaria, de ella parten arteriolas hacia la piel, lóbulos y lobulillos. Los nervios de la glándula mamaria se distribuyen por los músculos alveolares así como alrededor de los vasos sanguíneos que la irrigan (Thomas, 2011; Latarjet y Ruiz, 2005; Gusterson y cols. 2005). (Figura 3)

El CaMa es muy heterogéneo y los patólogos hacen referencia a dos tipos de cáncer; carcinoma lobular si las células malignas surgen de los lóbulos y carcinoma ductal si se deriva de los conductos (Sociedad Española de Oncología Médica)

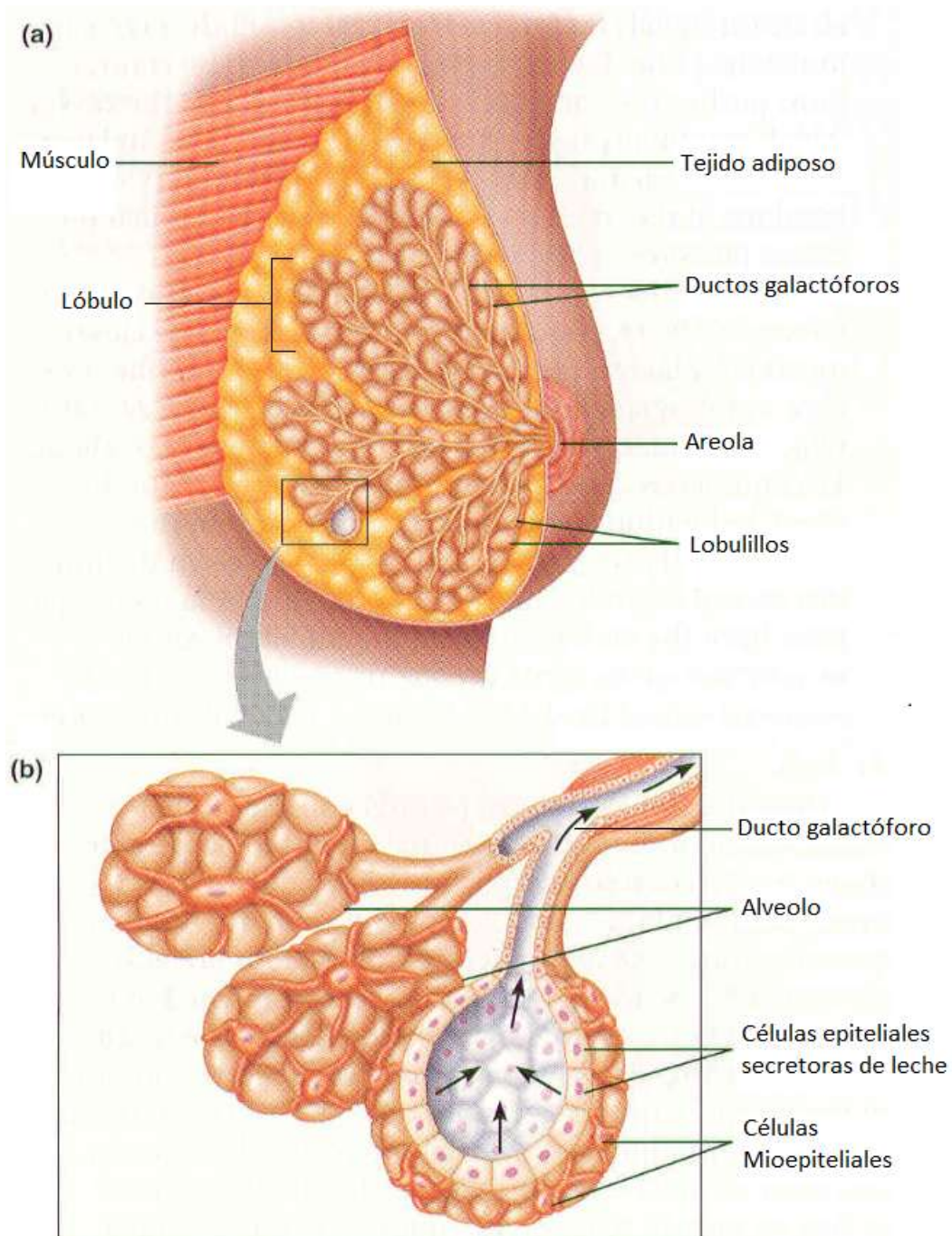


Figura 3. Anatomía de la glándula mamaria. (a) se observan ductos galactóforos, lóbulos, lobulillos, tejido graso, músculo y el pezón. (b) ampliación de la zona de lobulillos, donde se observa; ducto galactóforo, alveolos, células epiteliales secretoras de leche y células mioepiteliales (Sociedad Española de Oncología Médica).

1.4. Estructura del pulmón.

Los pulmones son un par de órganos respiratorios de forma cónica, situados en el tórax, cada pulmón tiene secciones llamadas lóbulos, el pulmón izquierdo tiene dos lóbulos y su peso es de 500g mientras que el pulmón derecho tiene tres lóbulos y pesa 600g, de tal manera que este último supera en tamaño y peso al pulmón izquierdo. El pulmón normal es de color rosado claro, su consistencia es flácida, son elásticos y se encuentran cubiertos por una membrana llamada pleura pulmonar. Los pulmones están conectados por estructuras tubulares de cartílago hialino denominados bronquios, existen dos; el izquierdo y derecho, cada uno de ellos se ramifica en el pulmón correspondiente, estos comunican la tráquea con los pulmones (Latarjet y Ruiz, 2005). Los bronquios, a su vez se ramifican en múltiples conductos pequeños llamados bronquiolos, estos se dividen en varias vías llamadas conductos alveolares, que poseen en sus terminaciones sacos alveolares. Cada saco alveolar está formado por varios alvéolos y cada alvéolo es una bolsa redonda con un diámetro de 300 micras, cuya pared está formada por epitelio plano simple, se estima que existen cerca de 300 millones de alveolos que constituyen a los dos pulmones. Las paredes alveolares están en contacto con vasos sanguíneos, que también se ramifican en unidades pequeñas llamadas capilares, formando una red de capilares interconectados entre sí. El intercambio gaseoso se lleva a cabo entre la membrana de los alvéolos y los capilares, por lo que este sistema vascular se encarga de transportar la sangre desde los pulmones al organismo y viceversa (Instituto Nacional de Cáncer; Harumi y cols. 2004) (Figura 4).

Existen dos tipos de CaPu; cáncer de células pequeñas o microcítico (CPCP) el cual comprende cerca del 20% de los casos. El otro tipo de cáncer es el de células no pequeñas (CPCNP), también llamadas broncogénico y/o no microcítico con el 90% de los casos. Las células cancerosas de cada tipo crecen y se diseminan de diferentes maneras, por lo que se diagnostican con base en su morfología bajo un microscopio. La enfermedad se produce habitualmente en las paredes internas de los bronquios (Instituto Nacional de Cáncer).

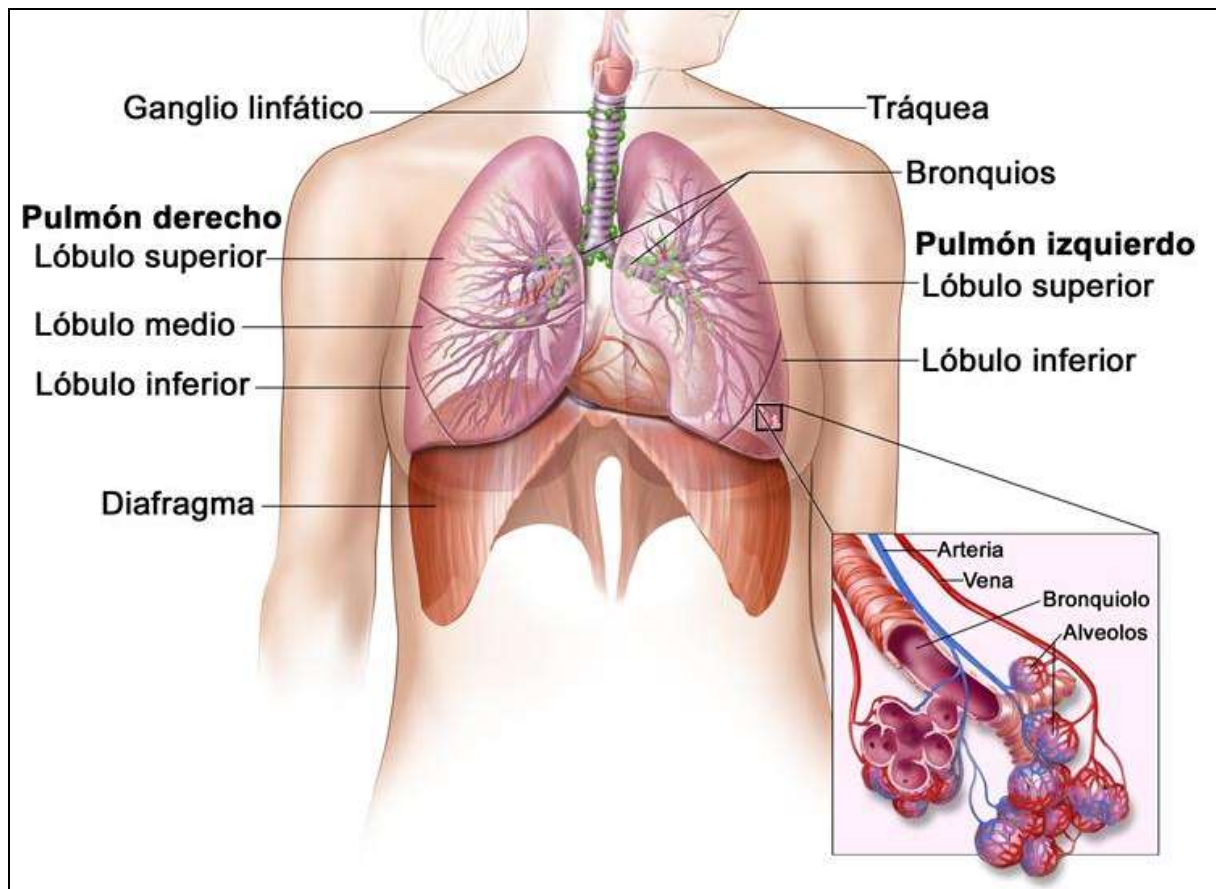


Figura 4. Anatomía del aparato respiratorio. Los pulmones se observan con sus respectivos lóbulos, bronquios, bronquiolos, alveolos, vasos sanguíneos, venas y arterias (Instituto Nacional de Cáncer).

1.5. Factores de Riesgo.

1.5.1. Cáncer de mama.

La incidencia del CaMa se incrementa con la edad, duplicándose aproximadamente cada 10 años hasta la menopausia, también se relaciona con el estado hormonal, ya que estas sustancias químicas son factores de riesgo conocidos para el cáncer de mama (Narod, 2011) dado que el gran porcentaje de células cancerosas de mama tienen receptores de estrógeno y progesterona, por lo que el uso de anticonceptivos, una menarca temprana y una menopausia tardía se asocian a periodos prolongados de exposición a estrógenos. Otros factores de riesgo son la nuliparidad y los embarazos en edad avanzada (Instituto Nacional de Cáncer; Opdahl y cols. 2011). Los antecedentes familiares del CaMa en familiares de primer grado se ha reportado que presentan un riesgo relativo de 2-3 veces que en la población general. Se estima que del 5-10% de los casos de CaMa son atribuidos por un patrón de herencia autosómica dominante (sólo se necesita recibir el gen anormal de uno de los padres para heredar la enfermedad). Mutaciones asociadas a la síntesis y metabolismo de estrógenos así como en los genes BRCA1 y BRCA2 son motivo de aproximadamente el 20% de CaMa y se ha reportado que aumentan el riesgo a padecer cáncer de ovario (Lacey y cols. 2009). Los factores dietéticos también han sido implicados, pues una ingesta alta en grasas y azúcares contribuyen a desarrollar la enfermedad (Awatef y cols. 2011; Romieu y Lajous; 2009). Otros factores ambientales incluyen la exposición a la radiación, tal como sucede después del tratamiento para un cáncer previo. Se han asociado mutaciones menos comunes al desarrollo de

cáncer de mama, tales como alteraciones en la reparación del ADN que resulta en ataxia-telangiectasia (ATM) (Instituto Nacional de Cáncer; Thomas 2011).

1.5.2. Cáncer de pulmón.

El tabaquismo es la principal causa del CaPu, debido a que el humo inhalado contiene numerosas sustancias cancerígenas. Ha sido reportado que el 85% de los pacientes que padecen esta enfermedad son fumadores y el riesgo aumenta en pacientes mayores de 50 años. También influyen otros agentes carcinógenos como la exposición al asbesto, gases radiactivos y la contaminación ambiental. Todos estos factores derivan en cambios genéticos y epigenéticos caracterizados por la progresión de células cancerosas en asociación con acumulación de alteraciones genéticas, provocando que algunas personas sean más susceptibles a desarrollar cáncer. Ha sido reportado una importante predisposición en personas que tengan o hayan padecido tuberculosis y/o neumonía (Instituto Nacional de Cáncer; Organización Mundial de la Salud).

Otro factor de riesgo son mutaciones en el gen TP53 que codifica la proteína p53, la cual participa en múltiples vías como en las cascadas de señalización antiproliferativas, o en respuesta a estrés por genotóxicos. Se ha detectado inactivación del gen TP53 por mutaciones en un 50% en los cánceres de CPCNP y en más del 70% en los cánceres de tipo CPCP (Puray y Palomino, 1999). Otra alteración es la inactivación por fosforilación de la proteína Rb, los mecanismos para la inactivación de esta vía son: baja expresión del gen RB1, hipermetilación del promotor INK4 y sobreexpresión del gen CCND1. Los mecanismos por los cuales esta vía es alterada difiere entre los tumores

CPCNP y el CPCP, por ejemplo; la inactivación de la proteína Rb es menos común en CPCNP en un 15% de los casos, mientras que la inactivación de INK4 está presente en hasta el 70% de los casos.

La pérdida de heterocigosidad en el brazo pequeño del cromosoma 3 (LOH 3p) se ha detectado en hasta el 80% de NSCLC así como SCLC, debido a que esta región abarca varios genes supresores de tumores incluyendo FHIT. Se encuentra en un sitio cromosómico donde se lleva a cabo una delección como resultado al daño al ADN por agentes carcinógenos. RASSF1 codifica una proteína implicada en el control de la actividad de miembros de la familia de oncogenes RAS y SEMA3B la cual codifica la semaforina 3B, miembro de una familia de genes que codifican proteínas secretadas con roles críticos en el desarrollo de tejidos epiteliales y neuronales (Toledo, 2000).

1.6. Métodos de diagnóstico.

1.6.1. Cáncer de mama.

Estudios epidemiológicos han reportado que el diagnóstico temprano incrementa la supervivencia y disminuye la mortalidad por el CaMa, por lo que es importante que el sector salud realice actividades de prevención, y detección de factores de riesgo (Brandan y Villaseñor, 2006).

La autoexploración mamaria es una técnica basada en la observación y palpación de la mujer en sus senos. Tiene una sensibilidad aproximadamente del 35% comparándolo con el examen clínico y la mastografía. Ha sido reportado que la mayoría de veces este tipo de cáncer es encontrado por el propio paciente, por lo que es necesario enseñar al sujeto como identificar

nódulos en el(los) seno(s) que indican alteración mamaria (Balantic y cols. 2012).

Examen clínico; estudio que incluye exploración física; palpando senos, axilas y pezones (Sharma y Settleman, 2007). Presenta una sensibilidad del 40% - 60% y una especificidad aproximadamente 90%, se pueden identificar abultamientos desde 3 mm se recomienda realizar el examen en forma anual a las mujeres mayores de 25 años (Balantic y cols. 2012).

Mastografía; también llamada mamografía, es una técnica mediante la cual se detectan abultamientos de 2 mm. con la ayuda de la obtención de una imagen plana con rayos X de la mama, los nódulos detectados no son identificables al tacto, para conocer la malignidad del tumor se determina a través de un análisis patológico. Se recomienda realizar a mujeres mayores de 40 años con factores de riesgo así como a las mujeres con antecedentes familiares (Leong y Zhuang, 2011).

Los marcadores pronóstico establecidos para cáncer de mama comprenden el tamaño del tumor, estado ganglionar, metástasis, tipo de tumor histológico, grado y edad, así como invasión linfovascular peritumoral (Stickeler, 2011).

1.6.2. Cáncer de pulmón.

Sólo un 15% de este tipo de cáncer se diagnostica en estadios iniciales de manera accidental, lo que significa que se detectan a causa de la realización de pruebas medicas que se llevan a cabo debido a otro problema de salud no relacionado, esto es debido a que los síntomas no aparecen hasta que la enfermedad está avanzada. El diagnostico es de suma importancia, pues del

resultado de este dependerán las opciones del tratamiento. Los procedimientos que se usan para determinar si hay presencia de CaPu son:

Radiografía de tórax; con la que se puede ver alguna masa o mancha en los pulmones y establecer razonablemente la probabilidad de que sea un cáncer.

Exploración por TAC; es una prueba más sensible que la radiografía y con ella se detecta mejor el cáncer en etapas iniciales. También sirve para comprobar si existen metástasis en otros órganos.

Tomografía por emisión de positrones (PET); consiste en inyectar un radiofármaco combinado con glucosa y éste será captado por las células cancerosas, de existir un cáncer, que consumen más glucosa

Citología de esputo; se observa una muestra de esputo bajo un microscopio para verificar la presencia de células cancerosas.

Biopsia del tejido; esta prueba consiste en tomar una muestra del tejido sospechoso y analizarlo al microscopio.

Inmunohistoquímico; se utiliza un anticuerpo a una muestra de tejido canceroso para verificar si tiene ciertos antígenos. Este tipo de estudio se usa para determinar la diferencia entre distintos tipos de cáncer (Instituto Nacional de Cáncer; OMS).

1.7 Tratamiento.

1.7.1. Cáncer de mama.

El tipo de tratamiento a seguir, dependerá de en qué momento se detecte la enfermedad. El desarrollo de tratamientos sistémicos para el cáncer de mama ha llevado a una disminución en la mortalidad de esta enfermedad (Stickeler, 2011). Cuando se detecta en estadios avanzados, la mastectomía radical

modificada es la más utilizada, se encarga de retirar toda la glándula mamaria. La quimioterapia, consiste en administrar medicamentos como el tamoxifeno o el trastuzumab, que inhiben el crecimiento de células con cáncer, también existe la terapia hormonal, la cual es utilizada para inhibir la formación de estrógenos en el cuerpo humano. La radiación tiene como objetivo destruir a las células cancerosas y/o evitar su proliferación (Eisner y Luoh, 2011;; Stickeler, 2011).

1.7.2. Cáncer de pulmón.

El tratamiento para estos pacientes consiste en una combinación de varias técnicas que son la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia, en esta última suelen emplearse una combinación de medicamentos quimioterápicos como la mitomicina, vinblastina, vindesina y cisplatino, que generalmente se administran como tratamiento antes de la cirugía, con la intención de reducir el volumen del tumor. El tratamiento, dependerá de cuatro circunstancias: del tipo y el grado de diseminación del tumor, del estado de salud del paciente y del estado funcional de los diversos sistemas del organismo. Los cánceres de tipo CPCP casi siempre se diagnostican en fase extensa, mientras que aproximadamente la mitad de cánceres de tipo CPCNP se pueden extirpar dada su extensión (Instituto Nacional de Cáncer).

II. ESTADO DEL ARTE

2.1. Cáncer de mama y de pulmón en México.

En nuestro país la tasa de mortalidad e incidencia de estos tipos de cánceres son alarmantes. De acuerdo a la organización mundial de la salud el CaMa tiene el segundo lugar en número de nuevos casos por año, mientras que el CaPu ocupa el primer lugar en mortalidad en la población mexicana (Figura 5). Se estima que para el 2015 la mortalidad e incidencia del CaMa aumentaran de 6,555 y 17,329 casos respectivamente (Figura 6), mientras que el número de muertes y la incidencia para el CaPu aumentaran de 11,349 y 11,809 casos respectivamente (Figura 7) (Globocan).

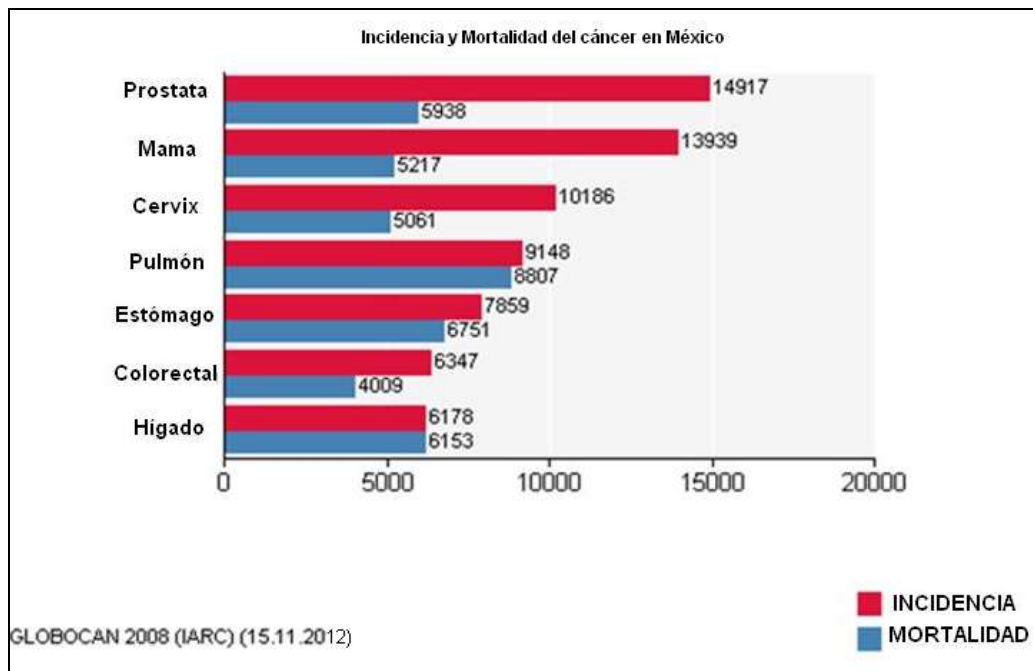


Figura 5. Incidencia y mortalidad de diferentes tipos de cánceres en México. El cáncer de pulmón es el tipo de cáncer de mayor mortalidad entre la población mexicana, mientras que el cáncer de mama es el segundo de mayor incidencia en todas las edades (Globocan).

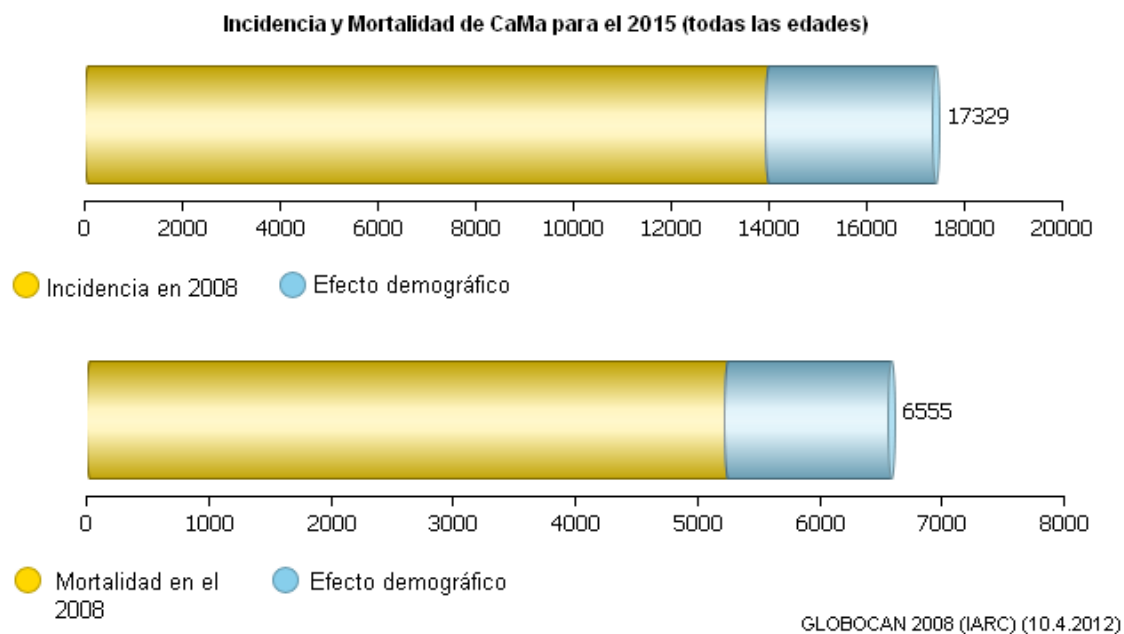


Figura 6. Número estimado de incidencia y mortalidad por CaMa en México para el 2015. De no crearse medidas preventivas para la detección del cáncer de mama, se estima que para el año 2015, la mortalidad aumentará a 6,555 defunciones, mientras que la incidencia incrementará a 17,329 nuevos casos en todas las edades (Globocan).

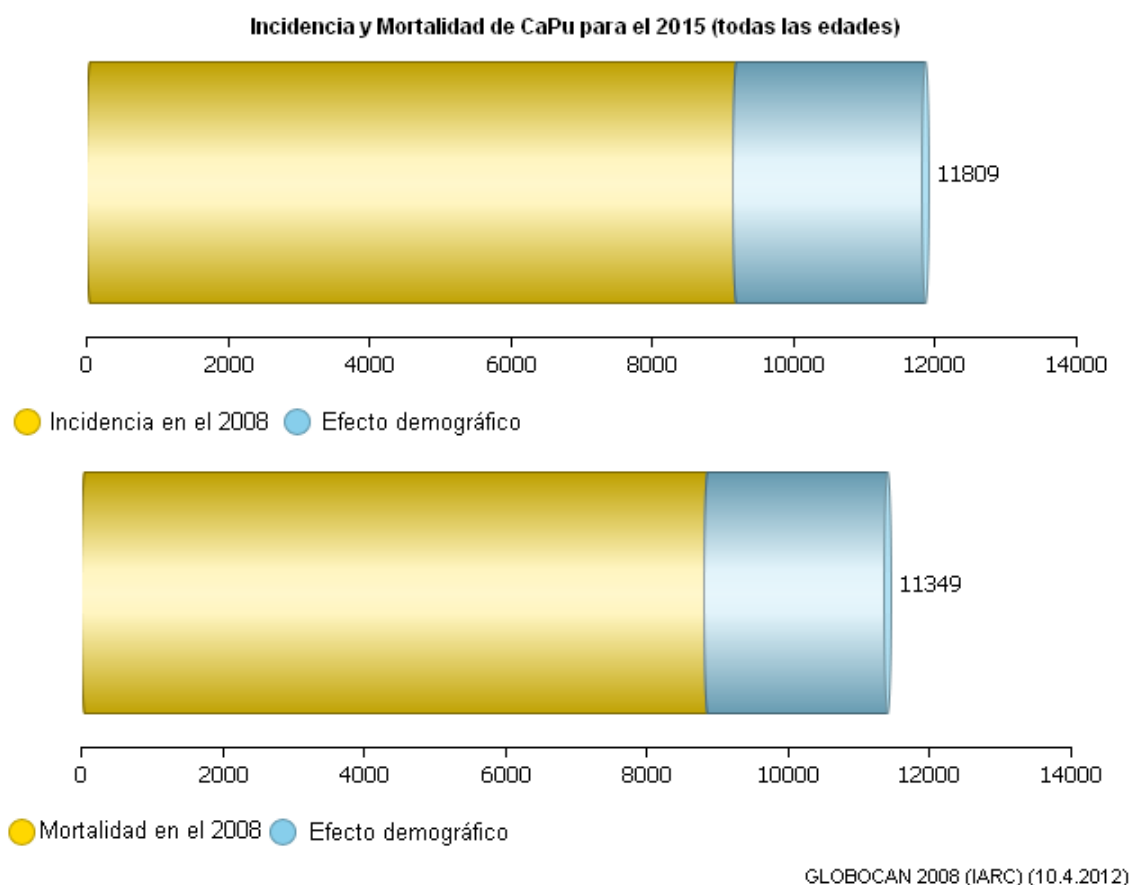


Figura 7. Número estimado de incidencia y mortalidad por CaPu en México para el 2015. De no crearse medidas preventivas para la detección del cáncer de pulmón, se estima que para el año 2015, la mortalidad aumentará a 11,349 defunciones, mientras que la incidencia incrementará a 11,809 nuevos casos en todas las edades (Globocan).

2.2. Diagnostico molecular del cáncer de mama y cáncer de pulmón.

El diagnóstico molecular pueden ser utilizado para determinar e identificar cambios en la secuencia o en la expresión de genes críticos en cáncer, mediante técnicas de biología molecular, las cuales poseen una alta sensibilidad, permitiendo realizar un diagnostico preciso incluso antes de que el cáncer se manifieste clínicamente.

Con la ayuda de las herramientas de la genómica y proteómica se han podido identificar genes y proteínas que se alteran durante el CaMa y CaPu, por lo que es importante complementar las técnicas tradicionales de diagnóstico histopatológico con las nuevas herramientas para el diagnóstico molecular, a fin de proporcionar un tratamiento personalizado adaptado a las características específicas del tumor (Stickeler, 2011).

Para desarrollar un método de detección temprana y eficiente se necesita una mejor comprensión de la biología de las células cancerosas, abarcando el análisis de la expresión génica a nivel de RNAm y proteínas, lo cual permitirá la búsqueda y detección de nuevos posibles blancos moleculares terapéuticos, los cuales se expresaran de manera diferencial en células con cáncer y en células normales. Los blancos moleculares tienen un valor clínico en cuanto a predicción y pronóstico, permitiendo crear nuevas alternativas de tratamiento molecular y/o farmacológico.

2.3. Dieta y cáncer en mujeres mexicanas.

La ingesta de ciertos alimentos ricos en grasa y la escasa actividad física se ha relacionado con la alta incidencia de CaMa en mujeres mexicanas tanto en poblaciones urbanas como rurales. Esto se puede prevenir a través de la dieta; pues habrá que mantener un peso saludable, realizar ejercicio, disminuir el consumo de carbohidratos, evitar la ingesta de alcohol, aumentar la ingesta de frutas y verduras de los cuales se adquiere el folato, consumir alimentos de origen animal a fin de adquirir vitamina D y consumir especies como el té verde (Romieu y Lajous, 2009).

III. ANTECEDENTES PARTICULARES DEL PROYECTO

3.1. Fitoquímicos y fuentes naturales.

La quimioprevención tiene como objetivo prevenir, inhibir o revertir el cáncer, por lo que está ganando importancia en la medicina alternativa. Las frutas, verduras, plantas aromáticas, hierbas medicinales, té y vino tinto contienen moléculas no tóxicas (flavonoides y polifenoles) con capacidad de inhibir el proceso de la carcinogénesis, actuando como moduladores de las vías de transducción de señales de los procesos biológicos (proliferación y migración celular, apoptosis y diferenciación celular). En la actualidad existe interés en identificar los blancos moleculares y celulares que participan en la prevención del cáncer. (Kanwar, 2012).

Muchos estudios epidemiológicos y experimentales han demostrado el efecto protector contra el cáncer en factores de la dieta, como los macronutrientes (por ejemplo; carbohidratos, proteínas, grasa y fibra), micronutrientes (por ejemplo; vitaminas y minerales) y fitoquímicos no nutritivos, de los cuales se han reportado existen 1,000 tipos diferentes con poder quimiopreventivo (Surh, 2003) (Figura 8 y cuadro 2).

Los fitoquímicos pueden bloquear varios estadios de la carcinogénesis incluyendo la iniciación, promoción y progresión. Sin embargo es preciso determinar los mecanismos por los cuales estos componentes previenen el cáncer. La epigallocatequina-3-galato (EGCG) es uno de los flavonoides más estudiados y es el componente principal del té verde. El EGCG inhibe la proliferación celular e induce la apoptosis en varias líneas celulares tumorales humanas como; piel, esófago, estomago, hígado, mama y pulmón entre otros (Bode, 2009)

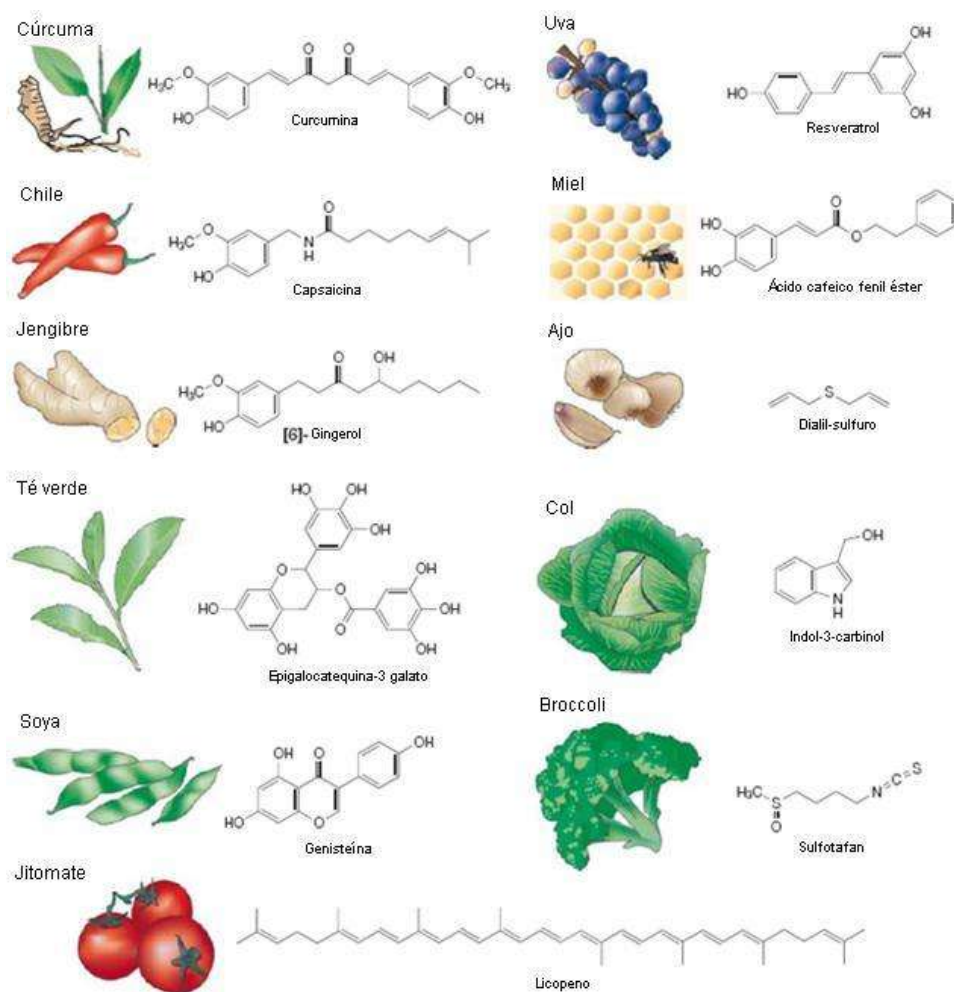


Figura 8. Fitoquímicos con carácter quimiopreventivo. La imagen muestra la estructura química de algunos fitoquímicos con poder quimiopreventivo y su fuente dietética (Surh, 2003).

Componentes bioactivos importantes en la reducción del riesgo de adquirir cáncer y/o disminuir el tamaño del tumor.		
CLASE	COMPONENTE BIOACTIVO	FUENTE DIETÉTICA
Vitaminas	Vitamina D	Productos lácteos
	Ácido Fólico	Vegetales
	Vitamina A	Vegetales
	Vitamina E (tocoperol)	Aceite vegetal
	Ácido ascórbico	Vegetales, frutas
Minerales	Calcio	Productos lácteos, vegetales
	Selenio	Granos de cereal, carne, pescado
	Zinc	Carne, vegetales
Carotenoides	Licopeno	Tomates
	Luteína	Vegetales color verdes oscuros
	Beta-carotenos	Vegetales color amarillo-naranja
Flavonoides	Genisteína	Productos de soya
	Resveratrol	Carne, vino tinto
	Quercetina	Vegetales, frutas
	Tangeretina	Frutas cítricas
	Epigallocatequina-3-galato	Te verde

Tabla 2. Componentes bioactivos. En la tabla se muestran algunos agentes con propiedades antitumorales así como la clase a la que corresponden y la fuente dietética (Kim, 2010).

3.2. El té verde.

El té verde es una de las bebidas más antiguas del mundo y sus extractos son uno de los agentes medicinales más usados desde tiempos ancestrales. Es obtenido de la planta *Camellia sinensis*, pertenece a la familia Teáceas. Es un árbol pequeño de hojas perennes, la planta puede llegar a medir 5-10m de alto, sus hojas son de color verde oscuro, pequeñas, dentadas, se disponen alternas y miden de 5-10cm de largo por 2-4cm de ancho. Esta planta crece de manera extensa en regiones tropicales y subtropicales. El té verde ha generado atención en el campo científico en los últimos años. Debido a sus grandes beneficios a la salud ha sido muy usada por la medicina tradicional china y es una de las bebidas más ingeridas en el mundo. La importancia que se le atribuye en cuanto a sus propiedades saludables reside en su proceso de fabricación, la producción del té es de tipo no fermentado, su elaboración proviene de las hojas frescas, secas y jóvenes de la planta, las cuales no son sometidas a oxidación enzimática, proceso también llamado fermentación, al cocer las hojas al vapor, las enzimas que contribuyen a su oxidación quedan inactivas por acción del aire caliente (Yang y cols. 2009).

3.3. Composición química.

La composición química del té verde es compleja: proteínas (15-20% peso seco), aa (1-4% peso seco) como el ácido glutámico, triptófano, glicina, serina, lisina, valina, entre otros; carbohidratos (5-7% peso seco) como la celulosa, pectinas, glucosa, fructosa, sacarosa; lípidos, como ácido. Linoleico; esteroides, como el estigmasterol; vitaminas B, C y E; bases púricas (o xánticas) como cafeína y teofilina; pigmentos, como clorofila y carotenoides; compuestos

volátiles, como aldehídos, alcoholes, ésteres, entre otros; minerales (5% peso seco) como el calcio, magnesio, cromo, manganeso, hierro, cobre, zinc, sodio, potasio, entre otros. Los polifenoles de tipo catequina representan el grupo más interesante y abundante constituyen hasta 59.9% peso seco. Las cuatro principales catequinas que encontramos en el té verde son; la epigallocatequina-3-galato (EGCG, 59%), epicagallocatequina (EGC, 19%), epicatequina galato (ECG, 13.6%) y la epicatequina (EC, 6.4%) entre otras sustancias beneficiosas. A las catequinas se les han reportado efectos benéficos para la salud (Lambert y Rayan, 2010). Principalmente la EGCG posee actividad anti cancerígena pues inhibe la proliferación celular, induce apoptosis alterando el potencia redox de la célula y activando a p53, es un inhibidor de la angiogenesis pues inhibe la generación de nuevos vasos sanguíneos por lo que el tumor no podrá nutrirse ni avanzar, protege a las células del organismo del daño oxidativo inhibiendo las enzimas lipoxigenasa, ciclo-oxigenasa y xantina oxidasa, y posee actividad antimicrobial pues inhibe la síntesis de nitrosaminas a partir de nitritos contenidos en ciertos alimentos (Carlson y cols. 2007; Tanaka y cols. 2006).

Se ha reportado que el EGCG actúa a través de las vías de señalización asociadas a la membrana celular, alterando la adhesión celular, los eventos del EGFR, LR, FAS, Ca^{2+} intracelular, la secreción de OPN, caspasa 3, gelsolina, Tm 4, 1-Tm, y las proteínas de unión adherentes, E-cadherina y β -catenina (Leone y cols. 2003; Tachibana, 2011).

3.4. Biodisponibilidad y biotransformación.

Hay pocos estudios que examinan la biotransformación de polifenoles del tipo catequina, en algunos casos las vías de biotransformación resultan en metabolitos que son más activos que algunas drogas. Por ello es muy importante determinar los niveles en plasma y en otros tejidos de los metabolitos de las catequinas y su importancia biológica a fin de profundizar los efectos terapéuticos y preventivos, así como diseñar mejores estrategias para la prevención y el tratamiento del cáncer.

La biodisponibilidad del EGCG es baja, por lo que esto debe ser considerado cuando se desee extrapolar resultados obtenidos *in vitro* a un diseño *in vivo*. El EGCG es absorbido en su mayoría a nivel de intestino delgado, posteriormente la catequina pasa al intestino grueso donde es sometido a una mayor degradación por acción de la microbiota local. Para estudiar la farmacocinética de las catequinas Mao Jun Lee y col. (2002), analizaron muestras de sangre y orina a ocho sujetos sanos, tras una dosis oral de EGCG (2mg/kg) por la mañana después de un período de ayuno durante la noche. Para detectar las concentraciones plasmáticas de EGCG se utilizó cromatografía líquida (HPLC). La máxima concentración de este polifenol en plasma se alcanzó entre la 1-2 h, posteriormente los niveles disminuyen progresivamente a niveles indetectables, por lo tanto el EGCG entra poco a la sangre.

El EGCG se presentó en pequeñas cantidades casi indetectables en la orina. La biotransformación del EGCG ocurre en la fase II, resultado de ello es la formación de metabolitos gluconarados (8-19%), sulfatados (58-72%) y

metilados. El EGCG se excreta a través de la bilis al colon, la eliminación de EGCG tiene lugar a las 3 h (Warden y cols.2001)

3.5. Blancos moleculares del EGCG.

En la membrana de la célula el EGCG se une al receptor de laminina (LamR) de 67kDa, una proteína presente en las balsas lipídicas. Esta unión altera la composición de los dominios membranales, también previene la unión de EGF a su receptor EGFR, la dimerización de EGFR y la reubicación de EGFR fosforilado en las balsas lipídicas. Estudios recientes han demostrado que el EGCG también se une a las islas CpG del ADN. Estos eventos pueden alterar la expresión de los genes. El EGCG inhibe la telomerasa, topoisomerasa II y la DNA metiltransferasa I (DNMTI), por lo que se altera el mantenimiento y la remodelación de la cromatina. Otras rutas alternativas de interacción con EGCG son las MAPKs (Patra y cols. 2008).

LamR

Actúa como receptor de superficie celular para la molécula Laminina-1 y como una proteína ribosomal. Se ha reportado que LamR más eEF1A (factor con actividad anticancerígena) y el EGCG inducen la desfosforilación de la subunidad 1 de la miosina fosfatasa (MYPT1). En estudios *in vivo* al inhibir la expresión de LamR, eEF1A y/o MIPT1 por acción del EGCG, resultó en la inhibición del crecimiento tumoral y también se demostró que el EGCG sobre expresa a eEF1A a través del LamR (Fujimura y cols. 2012)

EGFR

El factor de crecimiento epidermico (EGF) actúa a través de su receptor del factor de crecimiento epidermico (EGFR o HER2). Las vías de señalización de EGFR involucra pequeñas GTPasa de la familia Rho. Miembros de la familia Rho y Rab son componentes de balsas lipídicas. La sobreexpresión de EGFR produce fenotipo neoplásico en células tumorales, se ha reportado que el EGCG inhibe la activación del receptor por lo que se inhiben las cascadas de señalización, pero los mecanismos de acción aún no están claros. Varios receptores tirosin cinasas (RTKs) están asociados a la membrana plasmática, incluyendo EGFR que se localiza dentro de balsas lipídicas. El efecto del EGCG sobre la activación del EGFR puede estar asociado a cambios en el orden de los lípidos membranales. Adachi y colaboradores determinaron que la fosforilación (activación) de EGFR se lleva a cabo en las balsas lipídicas. Un tratamiento con EGCG inhibió la unión de EGF-marcado con Alexa Fluor 488 a las células, también inhibió la dimerización del receptor, por alteración de la organización de los lípidos de la membrana. Estos efectos pueden explicar la capacidad del EGCG para inhibir la activación de receptores tirosin cinasa (RTKs) asociadas a membrana plasmática. Esta inhibición tiene un papel crucial en el efecto anticancerígeno de las catequinas (Lamy, 2002; Patra, 2008).

DHFR (Dihidrofolato reductasa)

El EGCG causa la inhibición del crecimiento celular de manera dosis dependiente. En células de linfoma, la IC₅₀= 20uM, induce arresto del ciclo celular en la fase G₀-G₁ e induce apoptosis (Patra y cols. 2008).

3.6. Mecanismos moleculares asociados a la actividad antitumoral del EGCG.

Aún no se conocen todos los mecanismos celulares y moleculares por los cuales el EGCG causa efecto anti-cancerígeno, protege contra el estrés oxidativo, controla la expresión de genes supresores de tumores, induce apoptosis a las células cancerosas e inhibe la angiogenesis.

Estudios recientes han reportado que parte del efecto anti-cancerígeno del EGCG se debe a la inhibición de algunos miembros de la subfamilia de los receptores tirosin cinasas como son:

- EGFR; representado por cuatro miembros HER1 (o EGFR), HER2(o ErbB2), HER3 (o ErbB3c) y HER4 (o ErbB4). Todos los miembros tienen un dominio extracelular, un dominio transmembranal, y un dominio intracelular con sitio tirosin cinasa. El EGFR es activado por TGF α , EGF y otros ligandos, pero no se ha identificado ligando para HER2.
- Receptor del factor de crecimiento relacionado con la insulina 1 (IGF-1R), cuyos ligandos son IGF-1 y IGF-2.
- Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR); es un mitógeno de las células endoteliales, está representado por VEGFR-1 y VEGFR-2.

Existe evidencia de que el EGCG bloquea la dimerización de los receptores mediante la alteración de la organización membranal y por consecuencia su posterior activación, afectando las vías de señalización Ras/ MAPK cinasas, la cual es necesaria para la proliferación celular mediada por EGF, la vía de señalización PI3K/AKT, cuyos blancos generan señales de supervivencia celular y previene la apoptosis, otras rutas de señalización intra-citoplasmáticas son los transductores de señales y activadores de la transcripción (STATs), la fosfolipasa C gamma 1 (PLCG1) y c-Jun , las cuales están involucradas en procesos de resistencia a apoptosis, migración celular y proliferación y transformación celular respectivamente (Shimizu y cols, 2008; Kanwar, 2012).

En cáncer existe una metilación aberrante de los genes que protegen contra el desarrollo de esta enfermedad, por lo cual las proteínas que participan en la metilación del DNA constituyen un blanco atractivo en el desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer, a esto se ha reportado que los polifenoles del EGCG inhiben la DNA metil transferasa (DNMT) activándose la expresión de genes silenciados por la metilación (Nandakumar, 2011). También existe evidencia de que se inhiben proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2. Por otro lado la actividad antitumoral del EGCG se debe a que puede suprimir la activación de AP-1 y NF-kB inhibiendo la expresión de ciclina D1 y COX-2 en células de cancerosas (Surh, 2003; Kanwar, 2012; Ruhul, 2009). Hasta la fecha se han identificado pocos blancos moleculares, pues las proteínas no se habían investigado sistemáticamente (Figura 9), la principal dificultad de caracterizar a los posibles marcadores moleculares es el seleccionar de manera eficiente las proteínas candidatas.

Las herramientas que utiliza la investigación proteómica están evolucionando e incluye electroforesis en doble dimensión con geles de poliacrilamida, microarreglos de tejido y espectrometría de masas. Los estudios iniciales han identificado varios marcadores biológicos únicos y perfiles proteómicos que fueron capaces de discriminar entre el cáncer y los pacientes de cáncer de mama.

En el futuro, la aplicación a gran escala de la tecnología proteómica puede proporcionar un medio de detección temprana, vigilancia e identificación de proteínas y vías de señalización que pueden servir como posibles dianas terapéuticas relevantes para la intervención farmacológica del CaMa y CaPu.

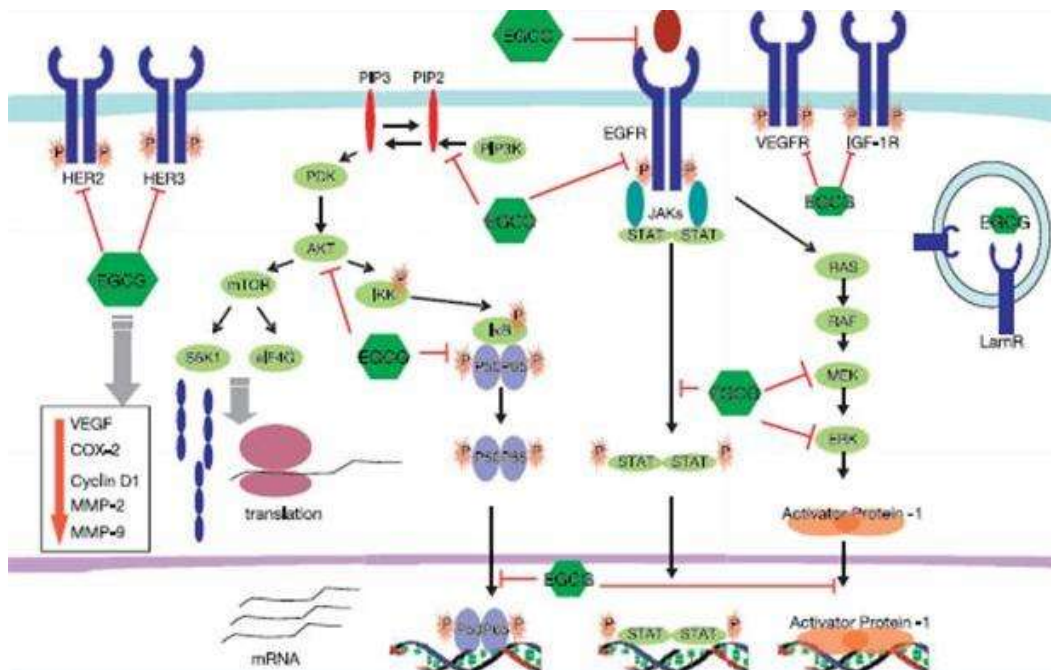


Figura 9. Blancos moleculares del EGCG. Representación esquemática de la inhibición de algunos miembros de la familia de receptores tirosinas cinasa (EGFR, HER2, HER3, IGF-1 y VEGF) por el EGCG, así como de las vías de señalización afectadas que incluyen; Ras/MAPK y PI3K/Akt, así como la activación de AP-1 y NF-κB, por lo que la modulación de la expresión de genes asociados con la inducción de la apoptosis y la detención del ciclo celular se ve afectada (Kim, 2010).

IV. IMPORTANCIA DE CONTINUAR EL ESTUDIO

El EGCG disminuye la proliferación celular e induce apoptosis lo cual sugiere el uso de este polifenol como adyuvante para tratamiento contra el cáncer de mama y cáncer de pulmón. Actualmente se desconoce cómo lleva a cabo los efectos anticancerígenos este polifenol, por lo que las rutas celulares que se modulan bajo su efecto aun no están descritas completamente, de tal manera que es importante establecer las moléculas que participan, a fin de crear nuevas herramientas para su detección o alternativas de tratamiento genético y/o farmacológico.

V. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Búsqueda e identificación de proteínas moduladas en respuesta al tratamiento con el polifenol EGCG en las líneas celulares MCF7 de cáncer de mama y A549 de cáncer de pulmón.

5.2. Objetivos Particulares

1. Evaluar el efecto del EGCG en la viabilidad celular de las líneas celulares A549 de cáncer de pulmón y MCF7 de cáncer de mama.
2. Obtener el perfil proteómico e identificar proteínas moduladas en las líneas celulares A549 de cáncer de pulmón y MCF7 de cáncer de mama en respuesta al tratamiento con EGCG.
3. Predecir las rutas celulares moduladas en respuesta al tratamiento con EGCG.

VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

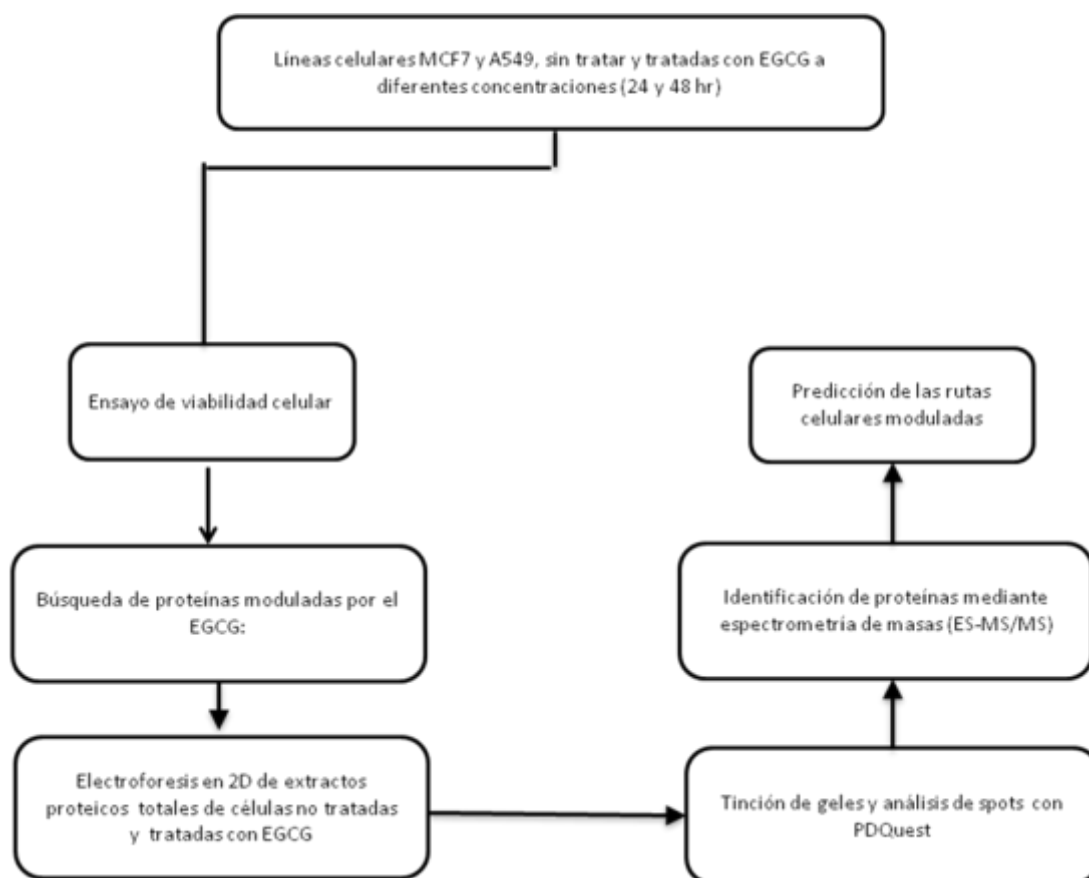


Figura 10. Diagrama de flujo de la estrategia experimental. Las líneas celulares de CaMa MCF7 y de CaPu A549 no tratadas y tratadas con EGCG a diferentes concentraciones, se someterán a un ensayo de viabilidad. Posteriormente se obtendrán extractos proteicos, que se purificarán, cuantificarán y se evaluará la calidad de las proteínas para que sean sometidas a electroforesis en geles de doble dimensión, los geles serán teñidos y analizados mediante el software PD-Quest para localizar las proteínas de expresión diferencial, las cuales serán identificadas mediante ES/MS-MS, finalmente se realizará una predicción de las rutas celulares moduladas bajo el efecto del EGCG.

VII. METODOLOGÍA

7.1. Cultivos celulares de MCF7 y A549.

Se utilizaron líneas celulares de humano de carcinoma mamario humano MCF7 y de adenocarcinoma alveolar A549. Estas células son adherentes, se caracterizan por ser de origen epitelial y presentan expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

El manejo de las líneas celulares se realizó en condiciones de esterilidad, en campana de flujo laminar, usando material y soluciones estériles. Las células se cultivaron en botellas de 75 cm² (Corning, CellBIND) se adicionaron 5 ml de medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium Glutamax (Gibco, Life Technologies) complementado con Suero Fetal Bovino al 10% (Gibco, Life Technologies) y la combinación de los antibióticos Penicilina/Streptomycin (Gibco, Life Technologies) a fin de prevenir contaminación bacteriana en los cultivos celulares. El crecimiento celular se llevó a cabo a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂ y con 95% de aire.

Cuando la línea celular alcanzó una confluencia del 80%, se realizaron pases a fin de mantener la línea celular, para esto, se desechó el medio de cultivo contenido en la(s) caja(s), se realizaron dos lavados con 5 mL de PBS 1X pH 7.0, las células se despegaron con 3 mL de PBS 1X pH 7.0-EDTA 0.2% estéril más 128 µL de Trypsina al 0.25%, posteriormente se incubaron a temperatura ambiente (TA) durante 5 min separando las células con pipeteo suave. Finalmente se colectó la fracción líquida en un tubo Falcón de 15 mL y se

cuantificó el número de células mediante el contador celular automatizado TC10 (Bio-Rad), se centrifugaron a 1,5000 rpm durante 5 min a 4°C, se desechó el sobrenadante y la pastilla celular se resuspendió en 4 ml de medio de cultivo previamente puesto a TA / 15 min inoculando en botellas de cultivo desechables de 75 cm².

7.2. Tratamiento de las células MCF7 y A549 con el EGCG.

El compuesto epigallocatequina-3-galato (EGCG) se obtuvo de SIGMA-ALDRICH (E4143). 1X10⁶ células de cáncer de pulmón A549 se cultivaron por triplicado en una placa de 24 pozos, se incubaron por 24 h en un ambiente con 5% de CO₂ /95% de aire / 37°C. Posteriormente el polifenol EGCG se disolvió en agua inyectable y se adicionó a diferentes concentraciones: 50, 100,150, 200 y 250 µM en cada pozo de la placa, seguido de una incubación durante 24 y 48 h bajo las condiciones antes mencionadas.

Por otro lado, se cultivaron 3X10⁵ células de cáncer de mama MCF7 por triplicado en una placa de 96 pozos, seguido de una incubación de 24 h en un ambiente con 5% de CO₂ / 37°C, posteriormente el polifenol EGCG se disolvió en agua inyectable y se adicionó a diferentes concentraciones: 200, 400, 600 y 800 µM en cada pozo de la placa, posteriormente se incubaron las células bajo las condiciones antes mencionadas durante 24 y 48 h.

Después de la incubación se determinó la viabilidad celular con la técnica de exclusión con azul de tripano.

7.3. Ensayo de viabilidad celular.

Para evaluar la viabilidad de las células tumorales MCF7 y A549 tratadas con diferentes concentraciones de EGCG durante 24 h y 48 h, a efecto de determinar la DL_{50} . El ensayo de exclusión de la viabilidad celular se realizó mediante el método de exclusión con azul de tripano. Primero se despegaron las células de la superficie de cada pozo de la placa con 64 μ l de Tripsina al 0.25% más 1.5 ml de PBS 1X pH 7-EDTA, se incubaron a TA / 5 min. Después la fracción líquida de cada pozo se colectó en un tubo Eppendorf de 1.5 ml debidamente rotulado. Se centrifugaron las muestras a 15,000 rpm / 5 min / 4°C, se desechó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 1 ml de PBS 1X pH 7.0. Posteriormente para determinar la viabilidad celular se adicionaron 20 μ l de la suspensión celular y 20 μ l de azul de tripano (0.4%) en un tubo de 1.5 ml, se mezcló perfectamente la mezcla mediante 10 ligeros pipeteos y se incubó a temperatura ambiente por 10 min considerando que tiempos muy largos de exposición al cromóforo pueden hacer que las células viables terminen por capturarlo. Por último, mediante un contador automatizado TC10 (Bio-Rad), se obtuvo el número de células viables, se tomaron 10 μ l de la mezcla depositándolos en una laminilla de conteo TC10. Finalmente se obtuvo el número total de células/ml, cantidad de células vivas/ml, y porcentaje de células vivas para cada condición. El conteo se realizó por duplicado.

7.4. Determinación de DL50 mediante el software BioStat²⁰⁰⁹ en las líneas celulares MCF7 y A549 tratadas bajo diferentes concentraciones con EGCG durante 24 y 48 h.

El cálculo de la DL50 se llevo a cabo para obtener la dosis media capaz de matar al 50% de la densidad celular inoculada por el EGCG. Para la determinación estadística de la DL50 se utilizó prueba de Probit's la cual no requiere de un espaciamento constante entre los niveles de dosis. Esta prueba se analizó mediante el software estadístico BioSat²⁰⁰⁹ a fin de realizar los cálculos de manera automatizada.

7.5. Extracción de proteínas totales de células MCF7 y A549.

Para la obtención de proteínas totales de células tratadas con el polifenol así como de las células sin tratar (control) los cultivos se tripsinizaron y el botón celular se suspendió en 250 µl de amortiguador TNTE (Tris-HCl; 50mM pH 7.4, NaCl; 150mM, Tritón X-1000; al 0.5%, EDTA; 5mM) previamente enfriado con el objetivo de lisar las células, además se adicionaron 40 µL/ml de inhibidores de proteasas "Complete" (Roche Applied Science's) a fin de proteger los extractos proteicos. Estas tabletas contienen inhibidores de proteasas generales de alta calidad como las de tipo serin proteasa, como la aprotinina y leupeptina, metaloproteasas como la bestatina, proteasas aspárticas como la pepstatina, así como inhibidores específicos de proteasas como la quimiostatina, calpaina I y II y tripsina. Una vez resuspendido el botón celular, se colocó el tubo en agitación vigorosa y constante a 4°C / 15 min. Finalmente, los lisados celulares se centrifugaron a 14,000 rpm / 5 min / 4°C, se recuperó el

sobrenadante y se almacenaron los extractos proteicos a -80°C hasta realizar la purificación.

7.6. Purificación de proteínas.

Este procedimiento se realizó de acuerdo al protocolo de purificación para proteínas "ReadyPrep 2-D Cleanup kit" (Bio-Rad). El fundamento de este kit es el de eliminar componentes que interfieren con el Isoelectroenfoque (IEF) como son las sales, detergentes iónicos, compuestos fenólicos, lípidos, polisacáridos y ácidos nucleicos. Facilitando la conductividad de las muestras hacia su punto isoeléctrico (PI). El procedimiento consistió, en transferir 500 μg de proteína en un volumen no mayor a 100 μl en un tubo de 1.5 ml. Después se adicionó 300 μl del reactivo precipitante uno, se mezclaron perfectamente los reactivos con la ayuda de un vortex durante 20 seg. y se incubó en hielo durante 15 min. Posteriormente se agregaron 300 μl del reactivo precipitante dos, se agitó la mezcla con un vortex durante 1 min y se centrifugó a 14,000 rpm / 5 min / 4°C . Se desechó el sobrenadante y la pastilla se lavó con 40 μl de amortiguador de lavado uno, se mezcló nuevamente y se centrifugó a 14,000 rpm / 5 min / 4°C . Se eliminó el sobrenadante y se realizó otro lavado usando 25 μl de agua ultra pura, la muestra se mezcló durante 20 seg., posteriormente se adicionó a la mezcla 1 ml de amortiguador de lavado dos (previamente enfriado) complementado con 5 μl del aditivo de lavado, se incubó la mezcla durante 30 min a -20°C , durante este tiempo de incubación se agitó la mezcla en vortex por 1 min cada 10 min. Por último se centrifugó la muestra a 14,000 rpm/5 min/ 4°C . Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el botón de proteínas a TA/5 min, transcurrido este tiempo la pastilla se resuspendió en 100 μL de

amortiguador de hidratación 2D (7M de Urea, 2% de CHAPS y 40mM de DTT al 0.5%) a fin de solubilizar las proteínas. Finalmente las proteínas se cuantificarón mediante el método de Bradford y la integridad de las proteínas se determinó por SDS-PAGE al 10%.

7.7. Electroforesis bidimensional de proteínas.

150ug de proteínas purificadas se diluyeron en un volumen final de 120ul en solución de hidratación (7M de Urea, 2% de CHAPS y 40mM de DTT al 0.5%, anfolinas pH 3-10 0.02%, azul de bromofenol 0.002%). Con este volumen se hidrataron tiras IPG de 7cm, pH 4-7 y pH 3-10 (Bio-Rad), asegurándose de sellar todos los bordes de la tira con aceite mineral, posteriormente se realizó el Isoelectroenfoque (IEF) en un sistema IPGphor (Bio-Rad) a 15°C y una corriente máxima de 50uA/tira. Los parámetros del IEF fueron; paso uno gradiente -1 a 250V por 40 min, paso dos gradiente de 250 a 4000 V por 3 h, paso tres constante de 4,000 V hasta dar un total de 10,000 V. Terminado el IEF las tiras que contienen los extractos proteicos se redujeron con DTT y se alquilaron con Iodoacetamida en amortiguador de equilibrio (6M de Urea, SDS al 2%, Tris-HCl pH 8.8, glicerol al 20%) con 2% de DTT para el amortiguador del primer lavado y 2.5% de Iodoacetamida para el amortiguador del segundo lavado. Posteriormente las tiras fueron transferidas a la electroforesis en gel de doble dimensión con SDS-PAGE (acrilamida al 12%), los extractos proteicos se corrieron en el gel empleando una solución amortiguadora de Tris-SDS (0.25 M, glicina 1.92, 0.1% de SDS pH 8.3) a un voltaje constante de 80 V.

7.8. Tinción de geles bidimensionales.

Los geles bidimensionales se tiñeron con SYPRO Ruby (Invitrogen), este método de tinción confiere ventajas sobre otros métodos como la tinción de plata o la tinción con azul de Coomassie, dado que el SYPRO Ruby puede detectar cantidades muy pequeñas de proteína, hasta 0.25 ng. Antes de llevar a cabo la tinción se fijaron los geles con solución fijadora (Metanol 50% y Ácido acético 7%) se realizaron dos lavados de 30 min. cada uno, posteriormente se adicionó SYPRO Ruby asegurándose de cubrir perfectamente los geles y taparlos de la luz, se incubaron los geles durante toda la noche (ON) a TA en agitación suave y constante. Al día siguiente se retiró el SYPRO Ruby y se lavaron los geles durante 30 min con la solución de lavado (Metanol 10% y Ácido acético 7%). Por último se realizó un lavado de 5 min con agua ultra pura, a fin de eliminar el exceso de sales en los geles y visualizarlos con mejor resolución en el fotodocumentador FLA-5100 de Fuji Film a 510nm.

7.9. Análisis PD-Quest y corte manual de puntos.

Una vez teñidos los geles se realizaron distintos análisis mediante el programa PD-Quest (Bio-Rad), este programa detecta puntos que representan a las proteínas en base a los criterios establecidos, donde de manera manual se determinó el punto más pequeño, el punto más tenue y el punto más grande.

Las imágenes se evaluaron dos veces a fin de verificar la detección correcta de las mismas. Posteriormente, se realizó el empalme de las imágenes, lo cual permitió encontrar puntos diferenciales entre los triplicados de geles para cada

condición y/o establecer la similitud entre ellos. Los puntos diferenciales se cortaron de manera manual y se depositaron en tubos eppendorf de 1.5 ml.

7.10. Identificación de proteínas por espectrometría de masas mediante electrospray (ESI).

Los fragmentos de los geles de poliacrilamida depositados en tubos de 1.5 ml, se sometieron a digestión con Tripsina a fin de disgregar la muestra en moléculas, las cuales pasaron a través de un campo electrostático donde se ionizaron con la ayuda de un eluyente nebulizado volátil formando gotas con carga. El gas de secado evaporó el disolvente en las gotas provocando una disminución en tamaño de las mismas y un aumento la concentración de carga. Eventualmente estos iones fueron conducidos a través de un capilar donde finalmente fueron colectados en una trampa de iones. Todo este equipo automatizado se controló por un ordenador. Los resultados se analizaron utilizando la base de datos MASCOT y se representaron de manera gráfica según su intensidad relativa (eje Y) y la m/z (eje X) de cada péptido producido.

7.11. Western blot de HDGF.

Geles SDS-PAGE se prepararon al 12%, a fin de llevar a cabo el corrimiento electroforético de 50 μg de proteínas totales de células MCF7 y A549 sin tratamiento y tratadas con la DL50 de EGCG determinada para cada línea durante 24 h y 48 h respectivamente. Las muestras se colectaron previamente a 90°C/5 min y se cargaron en los geles con la ayuda de micropuntas. La electroforesis en una dimensión se realizó a un voltaje constante de 80V, hasta que saliera del gel el frente de corrida. Tras ocurrir este hecho, el gel fue

equilibrado en 100 ml de amortiguador de transferencia frío durante 20 min. Posteriormente las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, para ello se utilizó una cámara húmeda con un voltaje de 400mA durante 45 min. Posteriormente la membrana se lavó 3X/5 min. con PBS 1X pH7-Tween 0.1% . Después se bloqueó la membrana con 30ml de PBS 1X pH7-Tween 0.1% y leche semidescremada al 5%/2h/TA. Finalmente se lavó la membrana en tres ocasiones con 10mL de PBS 1X pH 7 durante 5 min. Se incubó la membrana ON/4°C con el anticuerpo primario HDGF (1:2500) PBS 1X pH7-Tween20 0.1%. Al día siguiente se retiró el anticuerpo y se lavó la membrana 3X/5 min con 30 ml de PBS 1X pH7-Tween20 0.1%. Por último se incubó la membrana con el anticuerpo secundario cabra-anti ratón conjugado a HRP (1:1000) PBS 1X pH7-Tween20 0.1% por una hora, transcurrido este tiempo se retiró el anticuerpo y se lavó la membrana en cinco ocasiones durante 5 min con 30 ml de PBS 1X pH7-Tween20 0.1%.

La unión del anticuerpo primario a la proteína HDGF se evidenció mediante quimioluminiscencia y autoradiografía utilizando el reactivo ECL Plus (GE Healthcare Life Sciences).

7.12. Predicciones de interacción molecular.

Las interacciones entre proteínas desempeñan un papel fundamental en varios aspectos de la organización estructural y funcional de la célula. Para documentar y describir las interacciones entre proteínas a efecto de tener un mejor entendimiento de las funciones de las mismas así como para visualizar las diferentes rutas celulares moduladas bajo el efecto del EGCG a una

determinada concentración en células MCF7 de cáncer de mama y A549 de cáncer de pulmón durante 24 h y 48 h, se utilizó la base de datos STRING versión 9.0.

Esta base de datos proporcionó un mapa de interacciones entre proteínas (interactoma) así como una predicción de la función de las mismas en el contexto de la red de interacción. Debido a que desarrolla asociaciones directas (físicas) e indirectas (funcionales), las cuales derivan a partir del análisis de secuencias proteicas mediante experimentos de alto rendimiento o de coexpresión, así como de datos cristalográficos y de anotaciones científicas previas. La base de datos actualmente contiene 5, 214, 234 proteínas a partir de 1,133 organismos.

VIII. RESULTADOS

8.1. Detección de los cambios morfológicos en células MCF7 de cáncer de mama y A549 de cáncer de pulmón en respuesta al tratamiento con diferentes concentraciones de EGCG durante 24 h y 48 h.

Cuando la célula inicia un evento de muerte celular se activan cascadas de señalización que culminan en lisis celular. Una de las primeras evidencias de este proceso son los cambios morfológicos celulares y que pueden ser evidenciados mediante microscopia. Tras haber finalizado el tratamiento con diferentes concentraciones del EGCG: 50, 100, 150, 200 y 250 μM , así como 200, 400, 600 y 800 μM en las células MCF7 de cáncer de mama y A549 de cáncer de pulmón respectivamente, durante 24 h y 48 h incluyendo los respectivos controles positivos; tratamiento con doxorubicina 1 μM y los controles negativos; células con agua inyectable. Se tomaron fotografías de las células usando una cámara digital y con la ayuda de un microscopio óptico a fin de observar cambios en la morfología celular.

Las células MCF7 sufrieron cambios morfológicos graduales en función al aumento de la concentración del EGCG durante las primeras 24 h, estas alteraciones se observaron bajo microscopio óptico a 20X (Figura 11). Las células tratadas con 50 y 100 μM (panel D y E) presentaron forma arrugada mientras que las células tratadas con 150 μM (panel F) se observaron arrugadas y comenzaron a formar prolongaciones. Por otro lado las células tratadas con 200 y 250 μM (panel G y H) presentaron condensación de la cromatina, aparición de cuerpos apoptóticos y la monocapa comenzó a

despegarse, lo cual indica la pérdida de unión celular. Finalmente las células tratadas con 1 μM de doxorubicina (panel A) no presentaron la forma típica de la célula, sino que se observó reducción en el tamaño celular, por lo que algunas células adquirieron forma esférica. Todos los cambios antes mencionados se compararon con las células sin tratamiento y tratadas con agua inyectable (panel B y C) las cuales presentaron forma regular, se observaron monocapas.

Por otro lado cuando las células MCF7 fueron expuestas a diferentes concentraciones con EGCG durante 48 h, se observaron los siguientes cambios morfológicos bajo microscopio óptico a 20X (Figura 12). Las células tratadas con 50 μM y 100 μM (panel D y E) adquirieron apariencia rugosa, se observó condensación de cromatina y la formación de algunos cuerpos apoptóticos. Cuando las células fueron tratadas con 150 y 200 μM (panel F y G) la membrana plasmática comenzó a deformarse, se observó una disminución en el espacio citoplasmático y aumentó la aparición de cuerpos apoptóticos. Finalmente en las células tratadas con 250 μM de EGCG y con 1 μM de doxorubicina (panel H y A) se observó en su mayoría reducción del tamaño celular debido a la formación de cuerpos apoptóticos. Todos los cambios antes mencionados se compararon con las células sin tratamiento y con el control negativo, que fueron células tratadas con agua inyectable (panel C y B). las cuales presentaron una confluencia celular regular por lo que formaron monocapa.

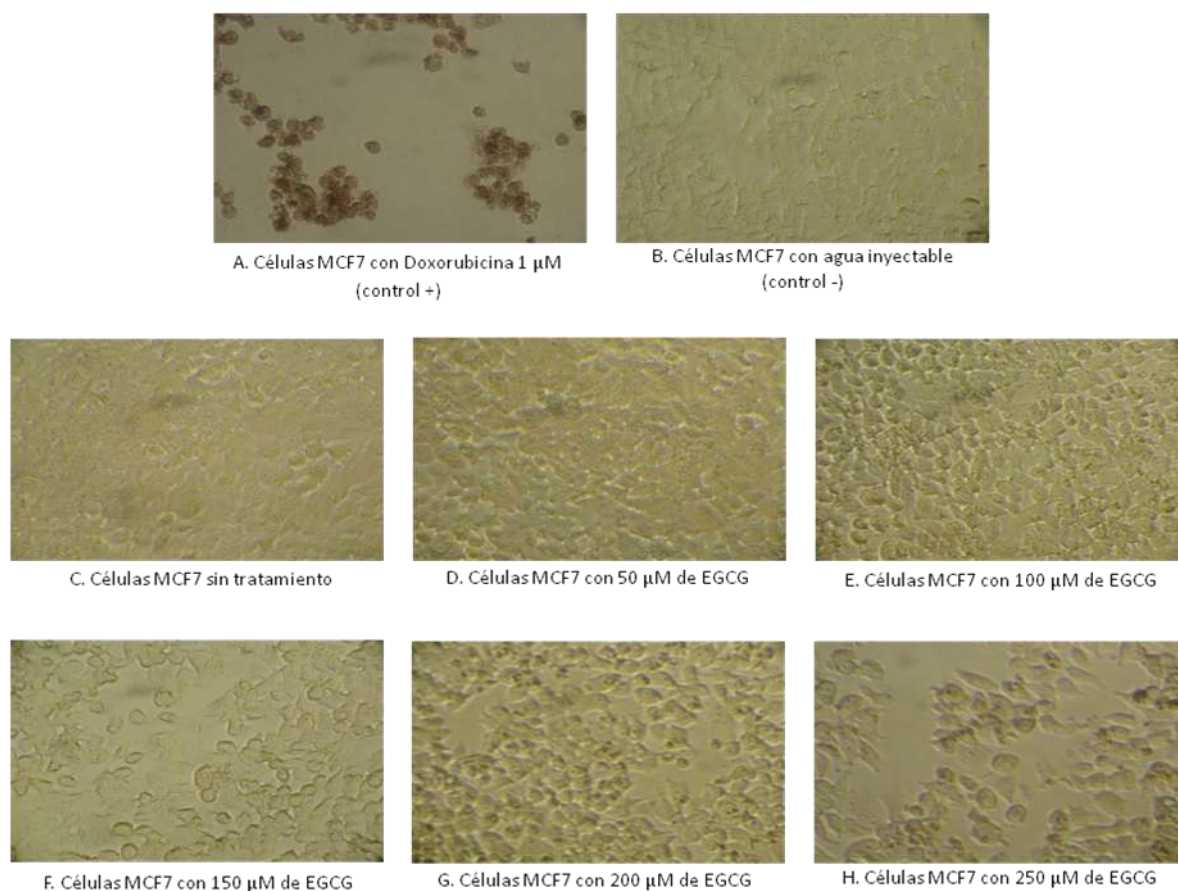


Figura 11. Micrografías que muestran la morfología de las células MCF7 después del tratamiento con diferentes concentraciones de EGCG durante 24 h. (A) Células tratadas con 1 μM de doxorubicina (control positivo), (B) Células tratadas con agua inyectable (control negativo), (C) Células sin tratamiento. Células tratadas con diferentes concentraciones de EGCG; (D) 50 μM , (E) 100 μM , (F) 150 μM , (G) 200 μM y (H) 250 μM . Fotografías tomadas bajo microscopio óptico a 20X.

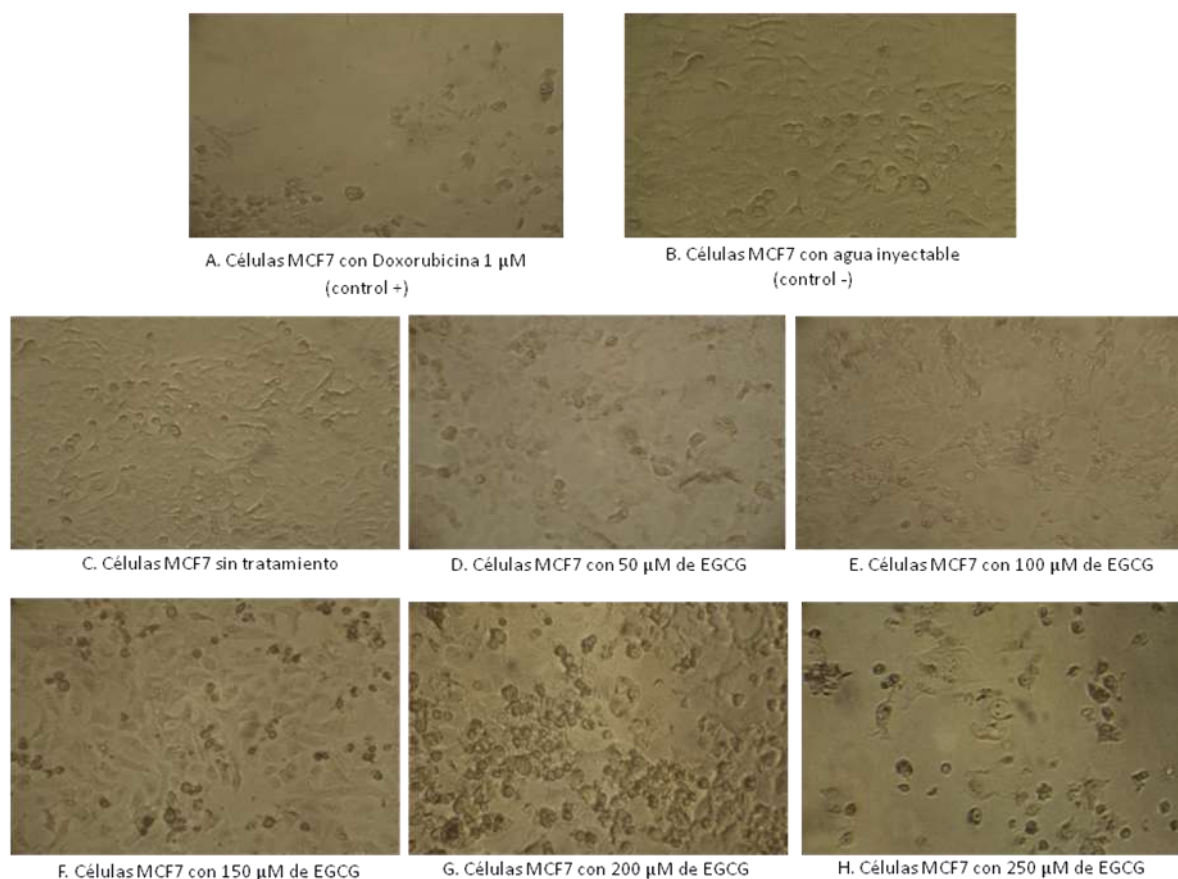


Figura 12. Micrografías que muestran la morfología de las células MCF7 después del tratamiento con diferentes concentraciones de EGCG durante 48 h. (A) Células tratadas con 1 μ M de doxorubicina (control positivo), (B) Células tratadas con agua inyectable (control negativo), (C) Células sin tratamiento. Células tratadas con diferentes concentraciones de EGCG; (D) 50 μ M, (E) 100 μ M, (F) 150 μ M, (G) 200 μ M y (H) 250 μ M. Fotografías tomadas bajo microscopio óptico a 20X.

En las células A549 tratadas con diferentes concentraciones de EGCG durante 24 h se observaron cambios morfológicos bajo microscopía óptica a 20X (Figura 13). Cuando las células fueron tratadas con 200 y 400 μ M (panel D y E) la monocapa celular comenzó a desprenderse, se observó condensación de la cromatina y las células formaron ramificaciones. Por último, las células tratadas con 600 y 800 μ M de EGCG así como las tratadas con 1 μ M de doxorubicina (panel F,G y A). Se observó en su mayoría cuerpos apoptóticos y desapareció la monocapa celular, estos cambios se compararon con las células sin tratamiento y con células tratadas con agua inyectable (panel C y B).

Finalmente los cambios morfológicos que sufrieron las células A549 tratadas bajo diferentes concentraciones de EGCG durante 48 h observadas bajo microscopio óptico a 20X (Figura 14), fueron las siguientes; las células tratadas con 200 μ M presentaron condensación de la cromatina y el citoplasma formó prolongaciones (panel D), mientras que las células tratadas con 400 y 600 μ M mantuvieron la apariencia antes descrita y se observó la aparición de cuerpos apoptóticos (panel E y F). Por otro lado, las células tratadas con 800 μ M de EGCG y con 1 μ M de doxorubicina, mostraron morfología ovalada, condensación de la cromatina, células con fragmentación nuclear y cuerpos apoptóticos (panel G y A). Todos los cambios antes mencionados se compararon con las células sin tratamiento y con células tratadas con agua inyectable (panel C y B).

Por lo tanto conforme aumenta el tiempo de tratamiento y la concentración del EGCG, la confluencia celular disminuye. Todos estos cambios observados son característicos del proceso de muerte celular por apoptosis, el cual está siendo inducido por el EGCG.

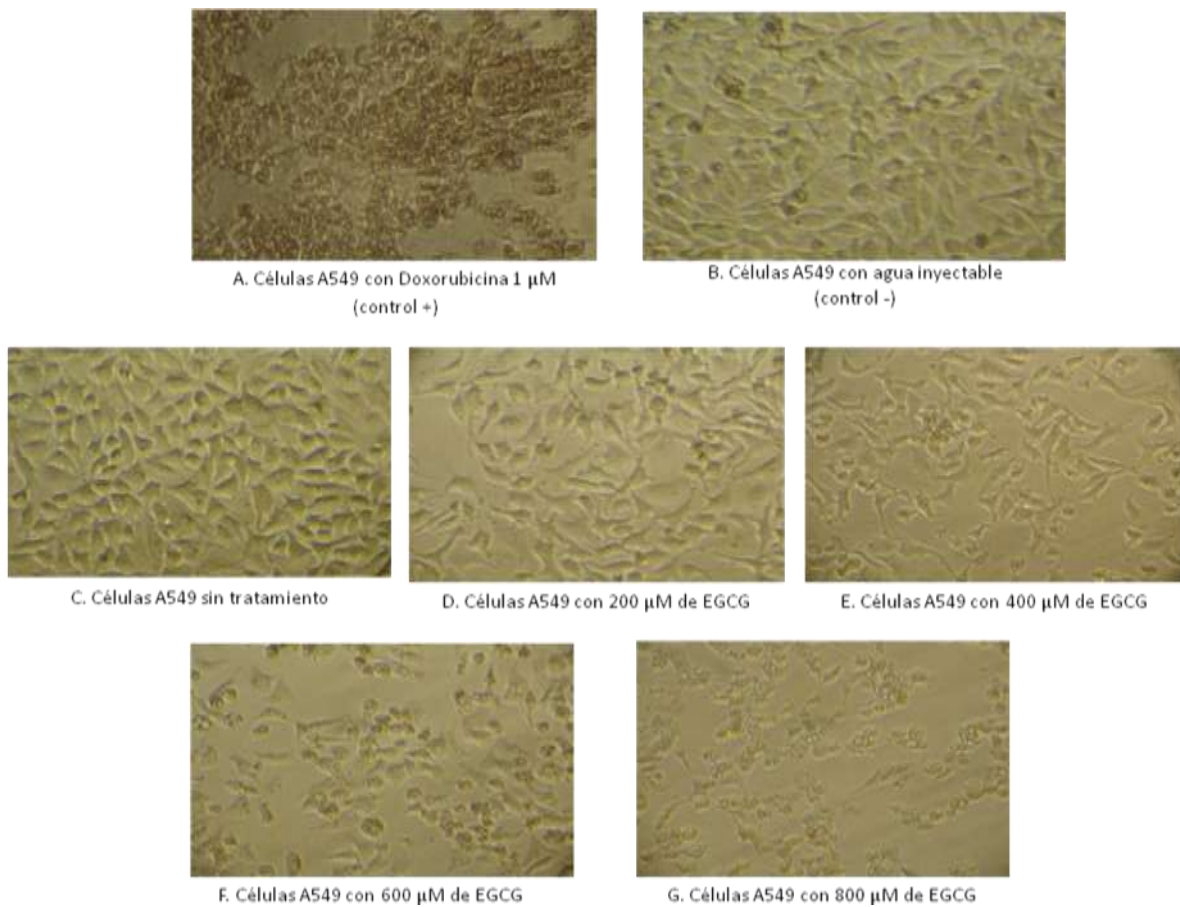


Figura 13. Micrografías que muestran la morfología de las células A549 después del tratamiento con diferentes concentraciones de EGCG durante 24 h. (A) Células tratadas con 1 μM de doxorubicina (control positivo), (B) Células tratadas con agua inyectable (control negativo), (C) Células sin tratamiento. Células tratadas con diferentes concentraciones de EGCG; (D) 200 μM , (E) 400 μM , (F) 600 μM y (G) 800 μM . Fotografías tomadas bajo microscopio óptico a 20X.

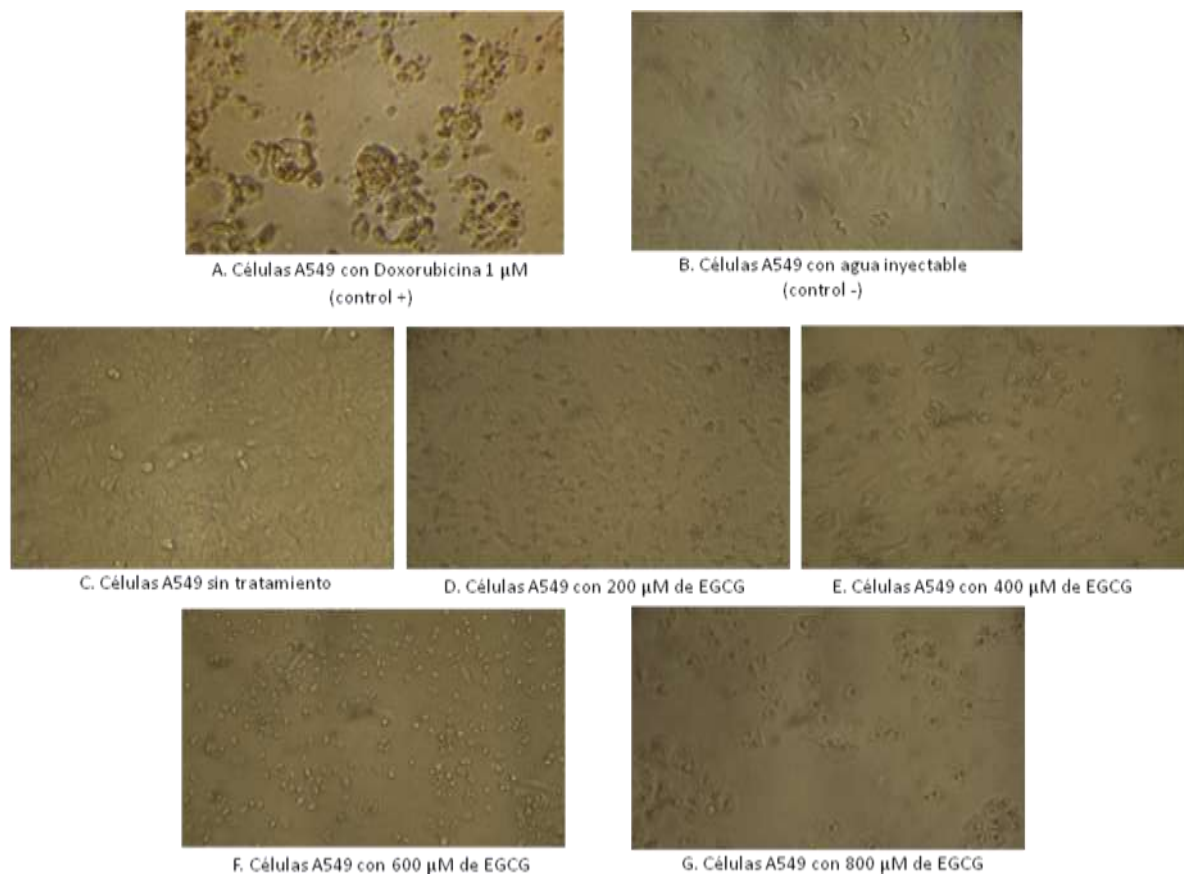


Figura 14. Micrografías que muestran la morfología de las células A549 después del tratamiento con diferentes concentraciones de EGCG durante 48 h. (A) Células tratadas con 1 μM de doxorubicina (control positivo), (B) Células tratadas con agua inyectable (control negativo), (C) Células sin tratamiento. Células tratadas con diferentes concentraciones de EGCG; (D) 200 μM , (E) 400 μM , (F) 600 μM y (G) 800 μM . Fotografías tomadas bajo microscopio óptico a 20X.

8.2. Ensayos de viabilidad celular.

8.2.1. El EGCG disminuye la viabilidad celular en células MCF7 de cáncer de mama.

Para elucidar el efecto del polifenol EGCG en la proliferación de células de cáncer de mama MCF7 y en células de cáncer de pulmón A549 bajo diferentes concentraciones de EGCG durante 24 y 48 h, se desarrollo el ensayo de exclusión de viabilidad con azul de tripano. Este método está basado en que las células vivas (viables) no captan el colorante mientras que las células muertas (no viables) si lo hacen.

Los resultados de los ensayos de viabilidad celular con azul de tripano (Figura 15) mostraron que el porcentaje de viabilidad de las células sin tratamiento así como las del control negativo (células tratadas con agua inyectable) fue del 100%. En el caso del control positivo (células tratadas con doxorubicina 1 μ M) la viabilidad celular disminuyó un 80% aproximadamente. En el caso de las células sin tratamiento y las tratadas con 50 μ M de EGCG se observó que la viabilidad permaneció constante, semejante al control negativo. En el caso de las células tratadas con 100 μ M la viabilidad celular disminuyó un 23%, cuando se trataron con 150 μ M la viabilidad disminuyó un 51%, con un tratamiento con 200 μ M y 250 μ M se observo una disminución de la viabilidad del 95%.

Por otro lado se detectó un 98% de células MCF7 no viables tras el tratamiento con EGCG durante 48 h, cuando se trataron las células con 250 y 200 μ M. Cuando se trataron con 150 μ M la viabilidad celular disminuyó un 58%, con 100 μ M disminuyó un 50%. En el caso de las células tratadas con 50 μ M y el control

negativo (células tratadas con agua inyectable) la viabilidad celular permaneció constante. Los valores antes mencionados se compararon con los datos obtenidos en las células sin tratamiento dado que el porcentaje de viabilidad bajo esta condición fue del 100%. El control positivo utilizado fue doxorubicina (1 μ M) el cual presentó una disminución en la viabilidad celular en un 80%.

Los resultados mostraron una disminución en la viabilidad celular directamente proporcional con el incremento en la concentración del EGCG, es decir, a dosis bajas, la viabilidad es igual a la de los controles negativos durante los dos tiempos del tratamiento. Debido a que los resultados entre ambos tiempos de incubación presentaron la misma tendencia. Ante estos resultados se determinó trabajar con las células tratadas durante 24 h a fin de no someter a las células a mayor estrés.

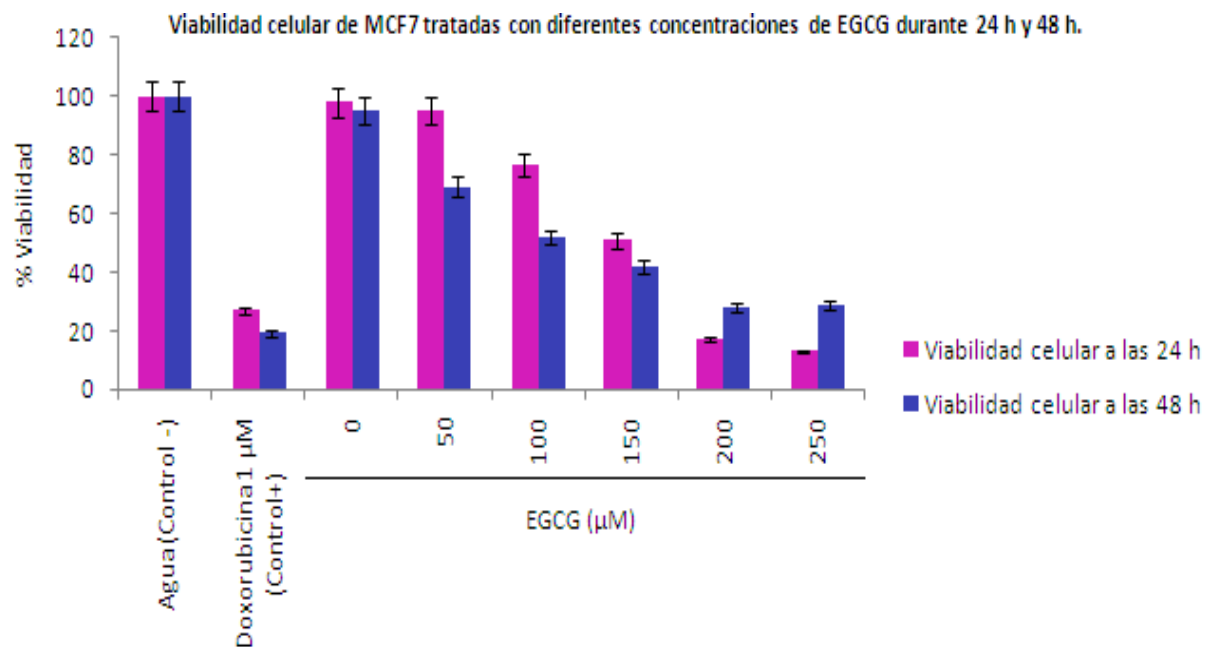


Figura 15. Representación gráfica de la viabilidad celular de MCF7 en respuesta al tratamiento con EGCG a diferentes concentraciones durante 24 y 48h.. Las células cancerosas se trataron con diferentes concentraciones de EGCG (50, 100, 150, 200 y 250 µM), doxorubicina 1 µM (control positivo) y con agua inyectable (control negativo). El ensayo se realizó por triplicado.

8.2.2. El EGCG disminuye la viabilidad celular en células A549 de cáncer de pulmón.

Después de realizar el ensayo de exclusión de viabilidad con azul de tripano en células tratadas con diferentes concentraciones de EGCG durante 24 h. Los resultados obtenidos mostraron que el porcentaje de viabilidad de las células tratadas con agua inyectable (control negativo) fue del 100%. Esto es importante debido a que se utilizó agua como disolvente del EGCG. En el caso del control positivo (células tratadas con doxorubicina 1 μM) la viabilidad celular disminuyó en un 97% aproximadamente. En el caso de las células tratadas con 200 μM de EGCG y en las células sin tratamiento se observó que la viabilidad permaneció constante. En el caso de las células tratadas con 400 μM la viabilidad disminuyó en un 51% y con 600 y 800 μM se observó una disminución de la viabilidad del 63% y 73% respectivamente (Figura 16).

Por último, la mayor disminución de la viabilidad de células A549 tratadas con diferentes concentraciones de EGCG durante 48 h se obtuvo con 800 y 600 μM en un 90% y 80% respectivamente. Por otro lado, la disminución de viabilidad en las células tratadas con 400 μM fue de un 68%, mientras que con 200 μM la disminución fue del 25%. Los valores antes mencionados se compararon con los datos obtenidos en las células del control negativo. El control positivo utilizado fue doxorubicina (1 μM), el cual presentó una disminución de viabilidad celular en un 95% aproximadamente, en ambos tratamientos (Figura 16).

Los resultados mostraron que el EGCG tuvo mayor efecto sobre la viabilidad de las células tumorales A549 a concentraciones altas y a mayor tiempo de exposición. Lo cual nos indicó que el efecto es dosis y tiempo dependientes. Debido a que la diferencia entre los porcentajes de viabilidad obtenidos durante en el tiempo de incubación por 24 h fue poco significativa, se decidió trabajar con las células tratadas durante 48 h. Esto implica que las células de cáncer de mama MCF7 son más sensibles al tratamiento con EGCG en comparación con las células de cáncer de pulmón A549.

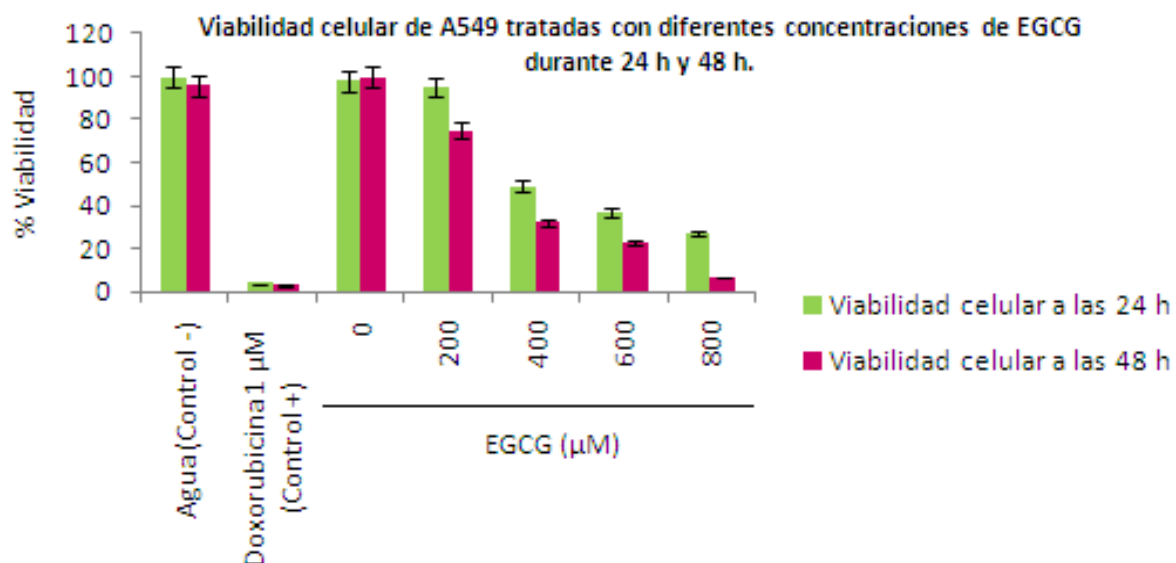


Figura 16. Representación gráfica de la viabilidad celular de A549 es respuesta al tratamiento con EGCG a diferentes concentraciones con EGCG durante 24 y 48 h. Las células cancerosas se trataron con diferentes concentraciones de EGCG (200, 400, 600 y 800 µM), doxorubicina 1 µM (control positivo) y con agua inyectable (control negativo). El ensayo se realizó por triplicado.

8.3. Obtención de la DL50 del EGCG.

8.3.1. DL50 de EGCG en células MCF7 de cáncer de mama.

Los análisis de viabilidad celular a diferentes concentraciones de EGCG se hicieron para determinar la DL50 que representa la dosis a la cual muere el 50% de las células. Para la realización del cálculo de la DL50 se utilizaron valores obtenidos en el ensayo de viabilidad; la dosis empleada, el número de células muertas para cada tratamiento y el número de células sin tratamiento (población inicial). La determinación de la DL50 se realizó con la ayuda del software BioStat, mediante el método gráfico Probit utilizando el procedimiento de mínimos cuadrados.

El cálculo de la DL50 de células MCF7 tratadas durante 24 h con diferentes concentraciones de EGCG, se realizó mediante el método de mínimos cuadrados integrado al software BioStat. En la figura 17, se representa la relación dosis-respuesta, generándose una curva de regresión sigmoideal (color azul) con los puntos experimentales (color negro). La DL50 obtenida es de 153 μ M, otros valores obtenidos fueron la LD10, LD16, LD84, LD90 y LD100, estos indican la dosis capaz de causar la muerte celular al 10%, 16%, 84%, 90% y 100% en una población.

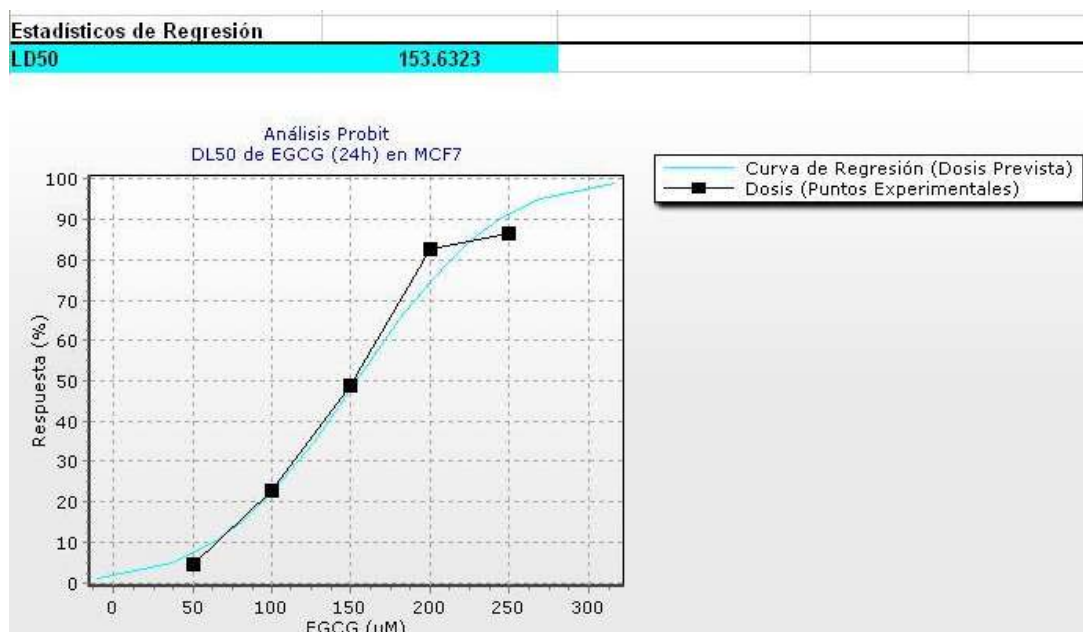


Figura 17. Representación gráfica dosis-respuesta de células MCF7 de cáncer de mama después de 24 h de tratamiento con EGCG a diferentes concentraciones. DL50 de EGCG en células de cáncer de mama MCF7 después de 24 h de tratamiento con el polifenol EGCG utilizando el método de mínimos cuadrados.

8.3.2. DL50 de EGCG en células MCF7 de cáncer de mama.

El cálculo de la DL50 en células A549 tratadas durante 48 h con diferentes concentraciones de EGCG, se realizó mediante el método de mínimos cuadrados integrado al software BioStat, utilizando valores obtenidos en el ensayo de viabilidad; dosis empleadas, número de células muertas para cada tratamiento y el número de células sin tratamiento.

En la figura 18 se representa la relación dosis-respuesta, generándose una curva de regresión sigmoideal (color rojo) con los puntos experimentales (color negro). La DL50 obtenida es de 348 μ M, otros valores obtenidos son la LD10, LD16, LD84, LD90 y LD100, los cuales indican la dosis capaz de causar la muerte celular al 10%, 16%, 84%, 90% y 100% de una población.

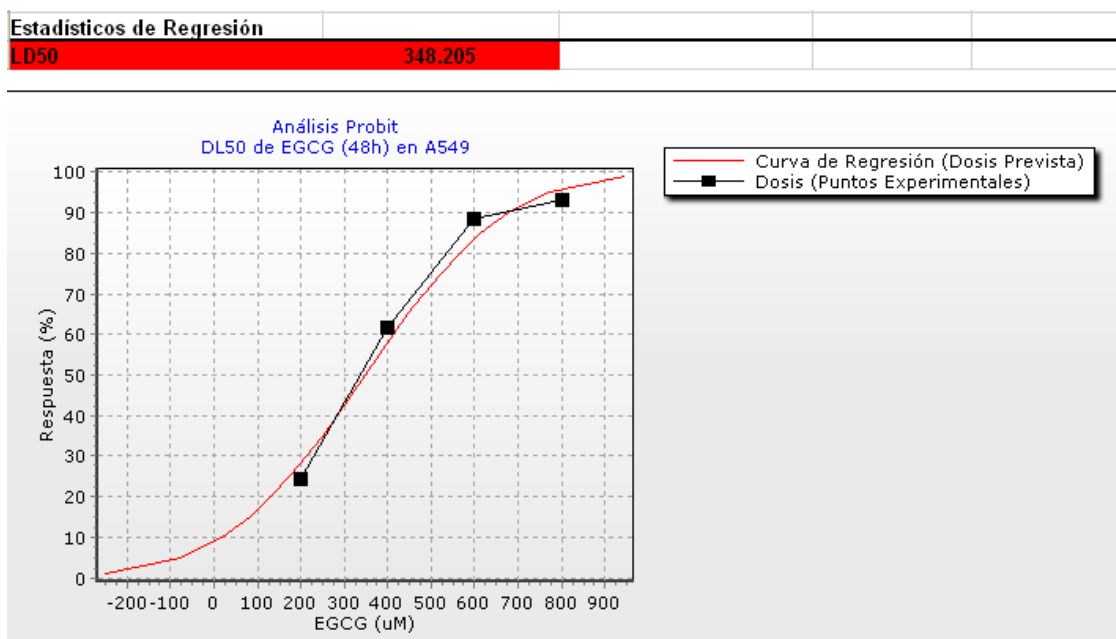


Figura 18. Representación gráfica dosis-respuesta de células A549 de cáncer de pulmón después de 48 h de tratamiento con EGCG a diferentes concentraciones. DL50 de EGCG en células de cáncer de pulmón A549 después de 48 h de tratamiento con el polifenol EGCG, utilizando el método de mínimos cuadrados.

8.4. Extracción de proteínas totales a partir de células MCF7 y A549 sin tratamiento y tratadas con el EGCG.

La lisis celular se llevo a cabo usando el amortiguador TNTE, el cual contiene Triton X-100 (detergente no iónico soluble en agua) este agente permeabiliza las membranas celulares alterando las asociaciones hidrofóbicas y destruyendo la bicapa lipídica, dejando sin extraer una fracción de proteínas, ácido nucleicos y algunos lípidos que son insolubles a los detergentes. Para la obtención de proteínas de células MCF7 de cáncer de mama y A549 de cáncer de pulmón sin tratamiento y tratadas con EGCG.

Primero las células A549 de cáncer de pulmón y MCF7 de cáncer de mama se sembraron en cajas de 75cm² hasta alcanzar una confluencia del 80%. Posteriormente las células sin tratamiento fueron despegadas mediante tripsinización y sometidas a lisis celular a efecto de obtener extractos proteicos totales. Mientras que para la obtención de extractos proteicos de las células tratadas, primero se realizo el tratamiento con el EGCG Los materiales y métodos utilizados se describen en el apartado metodología.

Antes de iniciar los ensayos de electroforesis bidimensional los extractos proteicos totales se sometieron a electroforesis en una dimensión a efecto de separar las proteínas en función de su peso molecular así como para observar la integridad de los mismos. En la figura 19 y 20 se muestra un gel SDS-PAGE al 12%, donde se obtuvo la integridad de extractos proteicos totales de las células sin tratamiento y tratadas con EGCG durante 24 h o 48 h. Se utilizó el marcador de peso molecular Dual Color Standard (Bio-Rad), el cual contiene

una mezcla de diez proteínas recombinantes (10-250 kDa), a fin de monitorear la separación electroforética, observándose las bandas de referencia correspondientes a los pesos moleculares de 250,150, 100, 75, 50, 37 y 25 kDa.

.

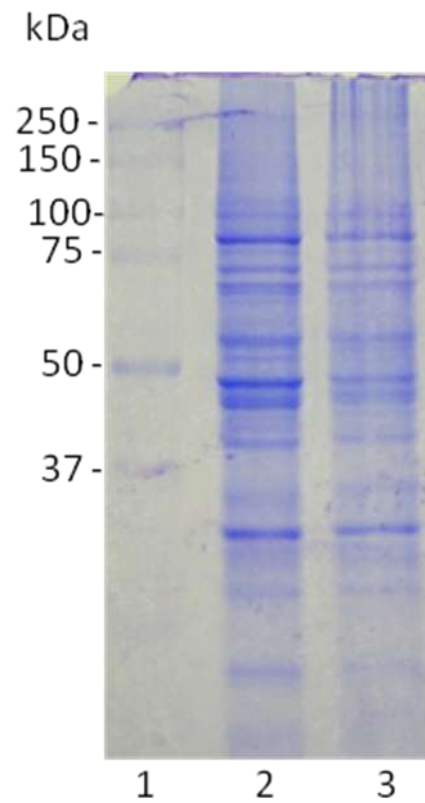


Figura 19. Gel SDS-PAGE al 12%. Carril 1; marcador de peso molecular Dual Color Standard (Bio-Rad), Carril 2; extractos de proteínas totales de la línea celular MCF7 sin tratamiento. Carril 3; extractos de proteínas totales de línea celular MCF7 tratadas con 150 μ M de EGCG durante 24 h.

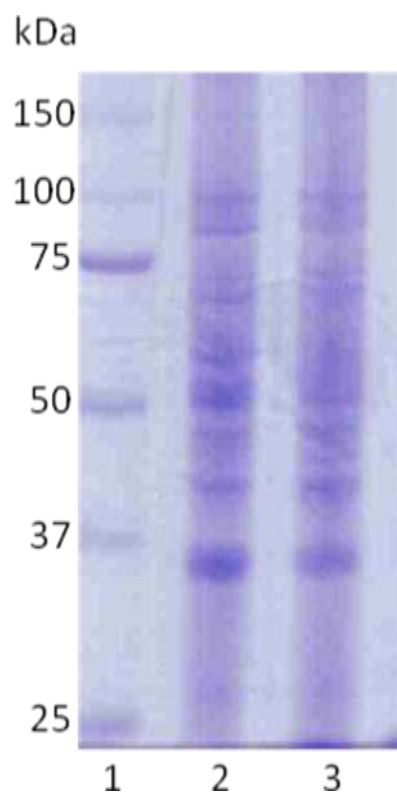


Figura 20. Gel SDS-PAGE al 12%. Carril 1; marcador de peso molecular (Bio-Rad), Carril 2; extractos de proteínas totales de la línea celular A549 sin tratamiento. Carril 3; extractos de proteínas totales de línea celular A549 tratadas con 300 μ M de EGCG durante 48 h.

8.5. Purificación y cuantificación de extractos proteicos totales de células MCF7 y A549 sin tratamiento y tratadas con el EGCG.

La purificación de los extractos proteicos se realizó a fin de concentrar las muestras de proteínas, facilitar su conductividad durante el isoelectroenfoque (IEF) y eliminar sustancias que pueden impactar de manera negativa la doble dimensión como sales, detergentes, compuestos fenólicos, lípidos, etc.

Posteriormente, se cuantificó la concentración de proteínas mediante el método de Bradford, se encontró una concentración de proteínas totales en las células MCF7 sin tratamiento de 3919 $\mu\text{g/ml}$, mientras que la cantidad de proteínas totales encontradas en las células MCF7 tratadas con 150 μM de EGCG durante 24 h fue de 3364 $\mu\text{g/ml}$. Por otro lado, la concentración de proteínas totales en las células A549 sin tratamiento fue de 3451 $\mu\text{g/ml}$, mientras que la cantidad de proteínas totales encontradas en las células A549 tratadas con 300 μM de EGCG durante 48 h fue de 2843 $\mu\text{g/ml}$

8.6. Análisis comparativo entre los perfiles proteómicos en SDS-PAGE 2D de células MCF7 y A549 sin tratamiento y tratadas con EGCG.

Se realizaron geles de poliacrilamida al 12 %, a fin de transferir las tiras a cada uno de ellos y separar las proteínas en función de su peso molecular. Cabe mencionar que los geles bidimensionales se realizaron por triplicado a efecto de que los resultados obtenidos fueran significativos. Los geles se tiñeron con SYPRO Ruby y se visualizaron mediante el escáner Fujifilm FLA-5100 a 560 nm. Posteriormente los geles obtenidos para cada condición fueron analizados mediante el programa PDQuest (Bio-Rad).

Para los perfiles proteómicos de las células MCF7 y A549 sin tratamiento se realizó un gel maestro virtual de todas las manchas contenidas en estos geles, así como para los geles MCF7 y A549 tratadas con EGCG 150 y 300 μ M durante 24 h y 48 h respectivamente. Para cada condición se eligieron como plantillas iniciales los perfiles proteómicos del gel MCF7 ST_A, MCF7 24h_C, A549 ST_C y A549 48h. Con la finalidad de obtener el gel maestro se eligieron los geles con un mayor número de puntos y bien definidos. Después se establecieron las condiciones de detección a fin de realizar el empalme de las manchas. Cada una de las manchas se analizó mediante la herramienta Show Match. Por lo tanto a través de este análisis comparativo se eligieron las manchas que se encontraban en al menos otro gel. De esta manera se evidenciaron proteínas con expresión diferencial y se obtuvieron los resultados del cálculo de la tasa de empalme.

En la figura 21 se muestran tres perfiles proteómicos correspondientes a la línea celular MCF7 sin tratamiento MCF7 ST_A, B y C. así como una tabla donde se puede observar el número de manchas detectadas por el programa PDQuest; 221, 208 y 213 para cada gel. El número de manchas que empalman entre ellos es de 221, 203 y 213 para cada gel. Finalmente la tasa de empalme es de 100, 91 y 96 %, respectivamente. Por otro lado los perfiles proteómicos correspondientes a la línea celular MCF7 después del tratamiento con EGCG, fueron MCF7 24 h_ A, B C y D con 150 μ M de EGCG durante 24 h. los podemos apreciar en la figura 22. Además de observar una tabla en la que se muestra el número de manchas para cada gel; 253, 274 y 298, así como el número de manchas que empalman entre ellos, la cual oscilo entre 253-251 manchas. Finalmente la tasa de empalme es de 100, 91 y 84% respectivamente.

En la figura 23 se muestran tres perfiles proteómicos correspondientes a la línea celular A549 sin tratamiento A549 ST_A, B y C, así como una tabla donde se puede observar el número de manchas detectadas detectadas por el programa PDQuest; 221, 208 y 213 para cada gel. El número de manchas que empalman entre ellos es de 221, 203 y 213 para cada gel. Finalmente la tasa de empalme es de 100, 91 y 96 %, respectivamente. Los perfiles proteómicos correspondientes a la línea celular MCF7 tratada con 150 μ M de EGCG durante 24 h los podemos apreciar en la figura 24. Además de observar una tabla en la que se muestra el número de manchas para cada gel; 253, 274 y 298, así como el número de manchas que empalman entre ellos, la cual oscilo

entre 253-251 manchas. Finalmente la tasa de empalme es de 100, 91 y 84% respectivamente.

Por otro lado se realizó otro análisis donde se utilizaron todos los perfiles de expresión correspondientes a una línea celular, se empalmaron las manchas de los geles a fin de obtener el número de manchas que coincidieron.

En la tabla número 3 podemos observar que el número de manchas que empalman entre cada grupo de geles de expresión de las células MCF7 y A549 así como el número de manchas que coinciden en cada gel. Para los geles de expresión de células MCF7 sin tratamiento se detectaron 198 manchas que empalman en los tres geles de un grupo. En lo que respecta a los perfiles proteómicos de las células MCF7 tratadas con 150 μ M de EGCG durante 24 h se detectaron 249 manchas que empalman en los tres geles del grupo (A). Finalmente se detectaron 194 manchas que coinciden en cada gel de expresión de las células MCF7 (B). Por último para los geles de expresión de células A549 sin tratamiento se detectaron 213 manchas que empalman en los tres geles de un grupo. En lo que respecta a los perfiles proteómicos de las células A549 tratadas con 300 μ M de EGCG durante 48 h se detectaron 194 manchas que empalman en los tres geles del grupo (C). Finalmente se detectaron 178 manchas que coinciden en cada gel de expresión de las células A549 (D).

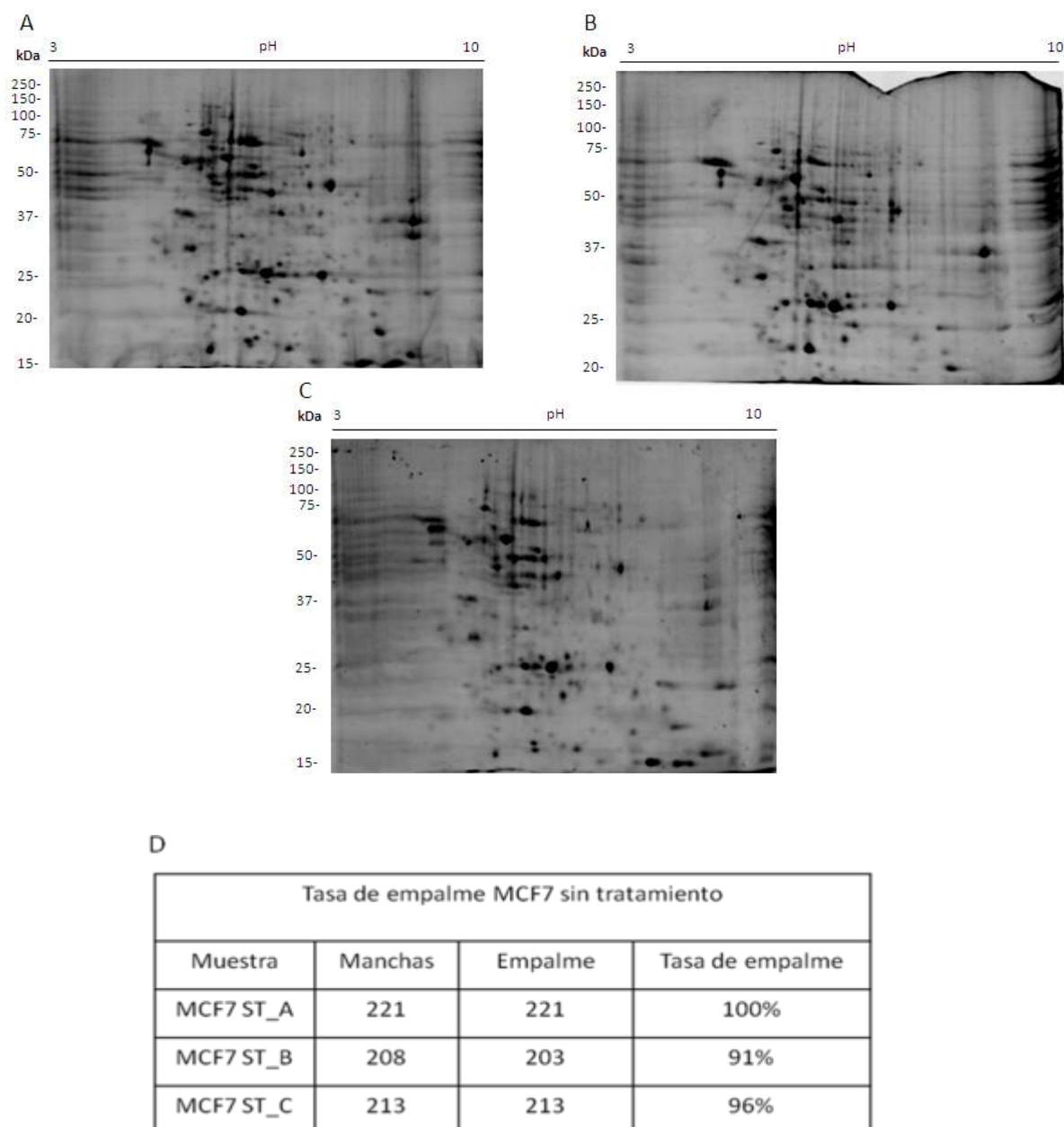


Figura 21. Tasa de empalme de los perfiles proteómicos de células MCF7 sin tratamiento en minigeles bidimensionales. Perfiles proteómicos correspondientes a la línea celular MCF7 sin tratamiento empleando geles de poliacrilamida al 12% y tiras con pH 4-7 de 7 cm (A-C). Los geles fueron teñidos con SYPRO Ruby y analizados mediante el programa PDQuest a fin de obtener la tasa de empalme entre los geles de este grupo (D).

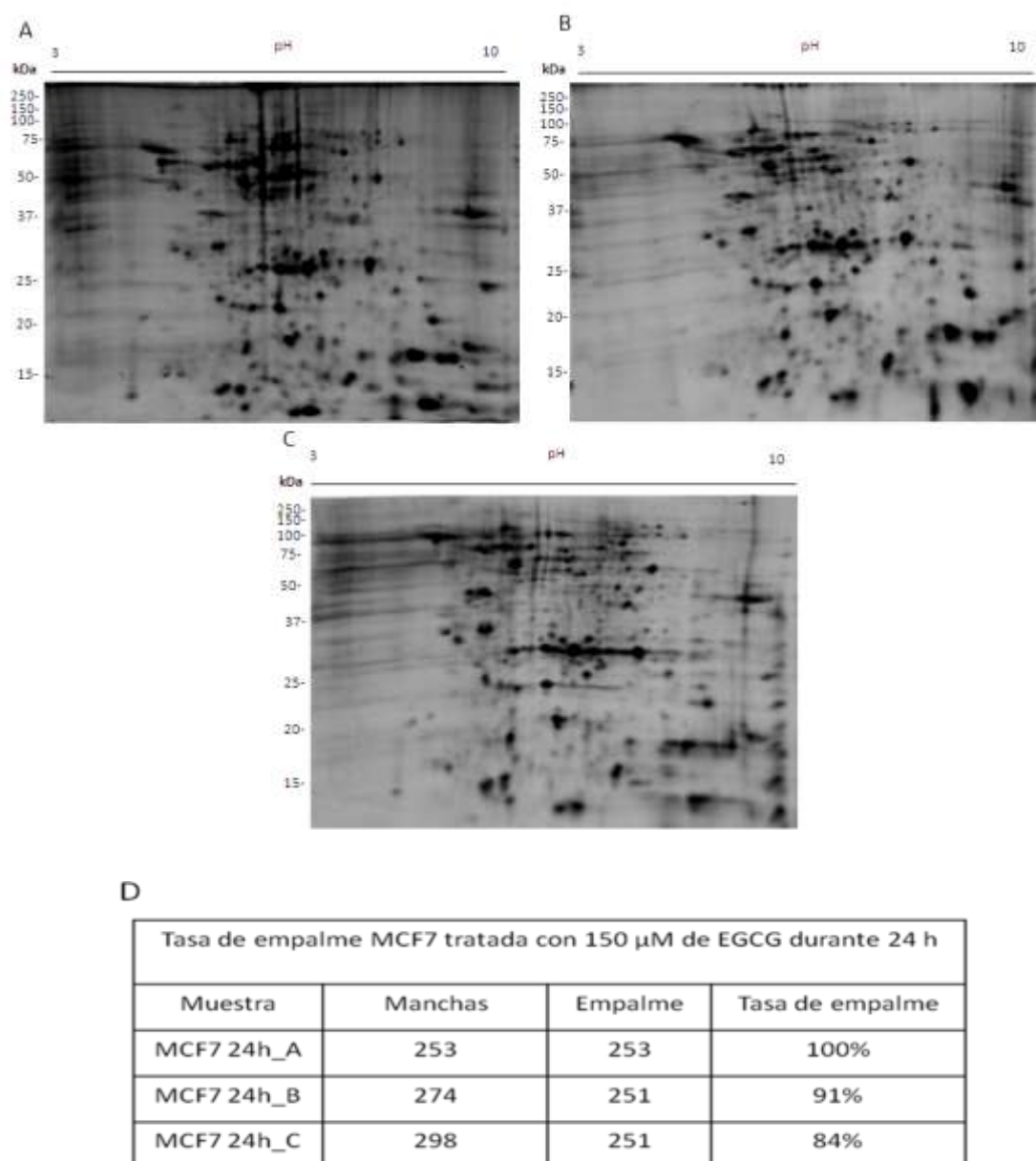
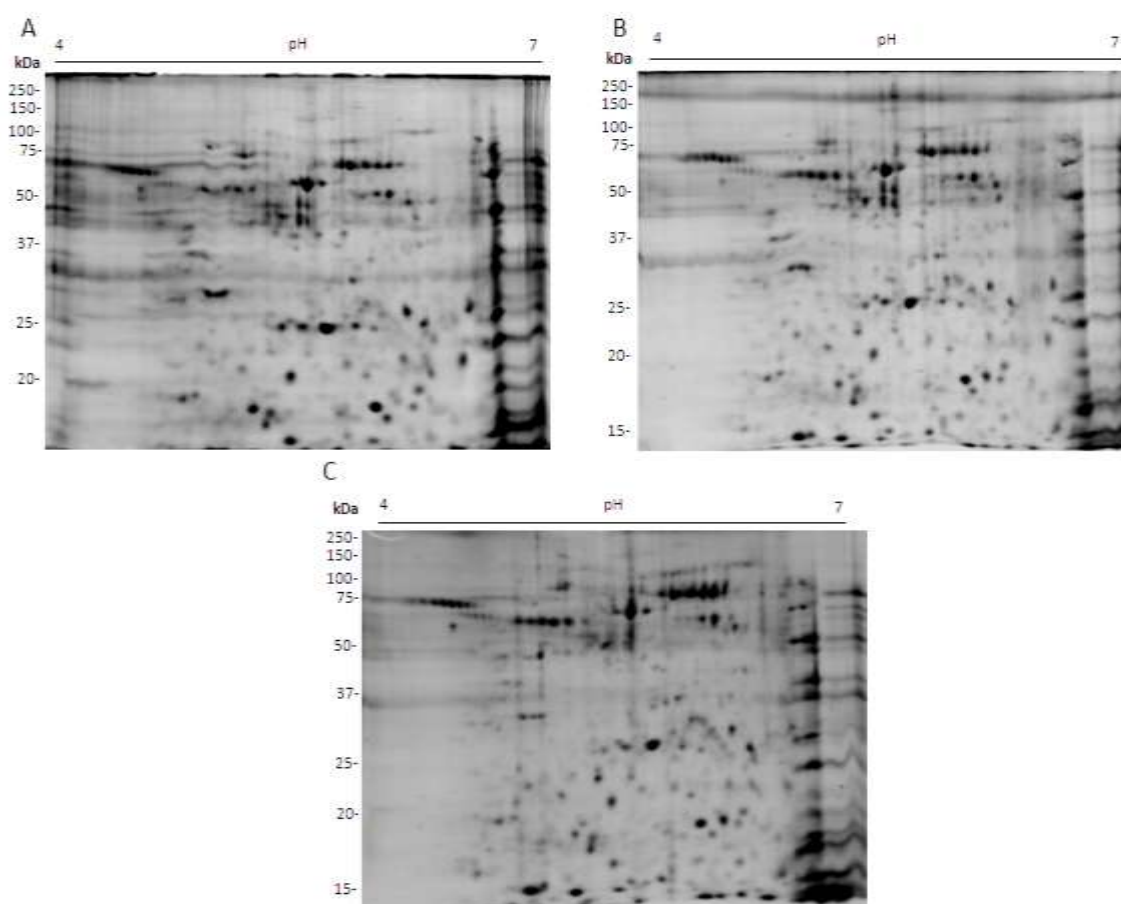


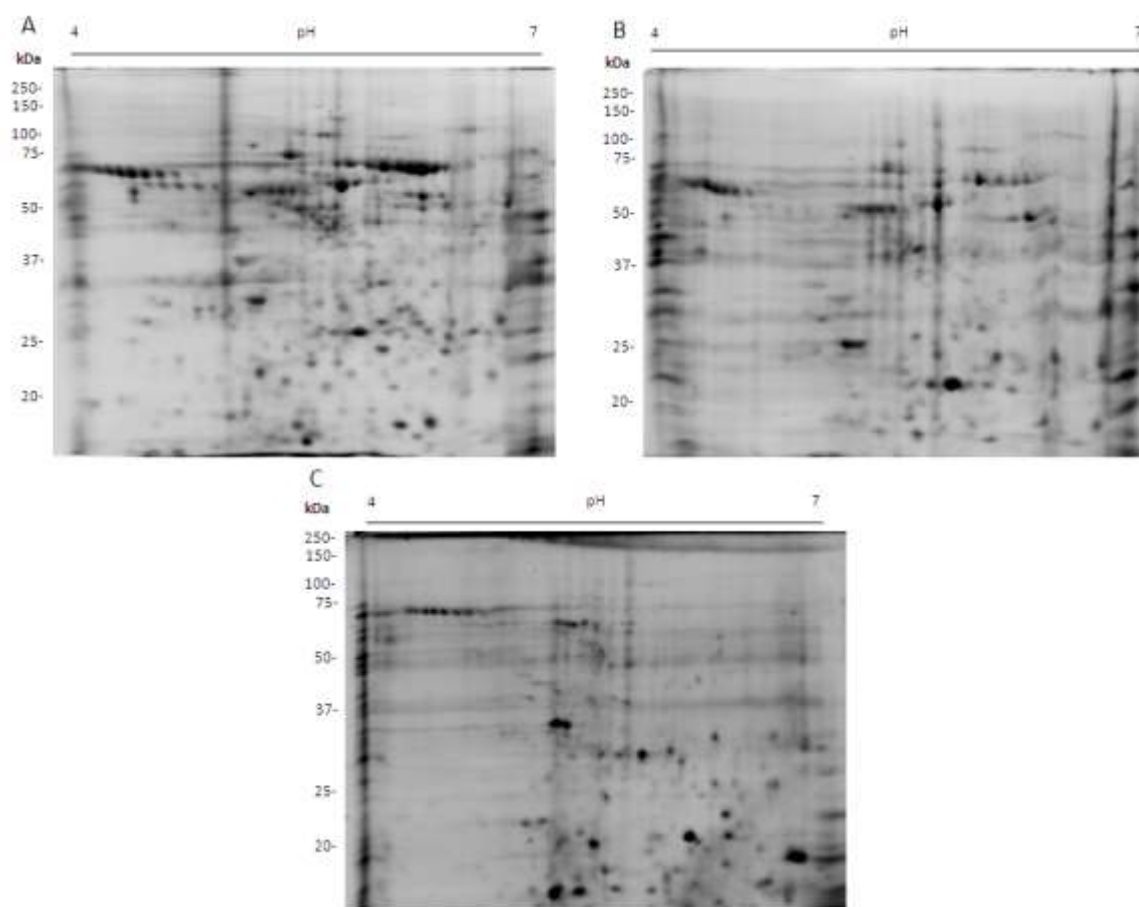
Figura 22. Tasa de empalme de los perfiles proteómicos de células MCF7 tratadas con 150 μ M de EGCG durante 24 h en minigeles bidimensionales. Perfiles proteómicos correspondientes a la línea celular MCF7 sin tratamiento empleando geles de poliacrilamida al 12% y tiras con pH 4-7 de 7 cm (A-C). Los geles fueron teñidos con SYPRO Ruby y analizados mediante el programa PDQuest a fin de obtener la tasa de empalme entre los geles de este grupo (D).



D

Tasa de empalme A549 sin tratamiento			
Muestra	Manchas	Empalme	Tasa de empalme
A549 ST_A	317	214	67%
A549 ST_B	243	213	87%
A549 ST_C	214	214	100%

Figura 23. Tasa de empalme de los perfiles proteómicos de células A549 sin tratamiento en minigeles bidimensionales. Perfiles proteómicos correspondientes a la línea celular A549 sin tratamiento (A549 ST) empleando geles de poliacrilamida al 12% y tiras con pH 4-7 de 7 cm (A-C). Los geles fueron teñidos con SYPRO Ruby y analizados mediante el programa PDQuest a fin de obtener la tasa de empalme entre los geles de este grupo (D).



D

Tasa de empalme A549 tratada con 300 μ M de EGCG durante 48 h			
Muestra	Manchas	Empalme	Tasa de empalme
A549 48h_A	220	203	92%
A549 48h_B	217	206	94%
A549 48h_C	241	201	83%

Figura 24. Tasa de empalme de los perfiles proteómicos de células A549 tratadas con 300 μ M de EGCG durante 48 h en minigeles bidimensionales.

Perfiles proteómicos correspondientes a la línea celular MCF7 sin tratamiento empleando geles de poliacrilamida al 12% y tiras con pH 4-7 de 7 cm (A-C). Los geles fueron teñidos con SYPRO Ruby y analizados mediante el programa PDQuest a fin de obtener la tasa de empalme entre los geles de este grupo (D).

A

Información intra ensayo		
Grupo MCF7	No. Miembros	No. manchas que empalman en todos los geles de un grupo
Sin tratamiento	3	198
48 horas	3	249

B

Información inter ensayo
No. manchas que coinciden en cada gel: 194

C

Información intra ensayo		
Grupo A549	No. Miembros	No. manchas que empalman en todos los geles de un grupo
Sin tratamiento	3	213
48 horas	3	194

D

Información inter ensayo
No. manchas que coinciden en cada gel: 178

Tabla 3. Tasas de empalme entre todos los geles de expresión de las células MCF7 y A549 sin tratamiento y tratadas con EGCG durante 24 h.

En el panel A muestra el análisis de expresión de geles MCF7 para cada condición. (A) se observan el número de manchas que empalman en los geles ordenados por grupo; MCF7 sin tratamiento y tratadas con 150 μ M de EGCG durante 24 h. (B) muestra el número de manchas que coinciden en cada gel de expresión de MCF7. (C) muestra el numero de manchas que empalman en los geles para cada condición; A549 sin tratamiento y tratadas con 300 μ M de EGCG durante 48 h. (D) muestra el número de manchas que coinciden en cada gel de expresión de A549.

8.7. Detección de proteínas expresadas diferencialmente.

El software PDQuest, contiene la herramienta Scatter plot, la cual nos permiten detectar proteínas con expresión diferencial, dado que muestra los valores de dos variables para un conjunto de datos, permitiéndonos observar que tan semejante es un grupo de perfiles proteómicos de una condición particular respecto a otra. El gráfico nos permite identificar las manchas en función de su intensidad, separándolas en tres grupos.

- 1) Proteínas que no presentan cambios en su expresión en un rango de al menos 3 veces
- 2) Proteínas que se sobreexpresan al menos 3 veces
- 3) Proteínas que disminuyen su expresión al menos 3 veces.

En los experimentos realizados, la intensidad de cada mancha en el grupo de geles que corresponde a la línea celular tratada con la DL50 determinada para el EGCG en el tiempo establecido (eje X) se graficó en una escala logarítmica contra la intensidad de ese mismo punto en el segundo grupo de geles correspondiente a la línea celular A549 sin tratamiento (eje Y). Si la intensidad de una mancha es la misma o similar, el punto se grafica entre las dos líneas paralelas. Por otro lado, si la intensidad de la mancha es diferente de aquellas manchas que se encuentran entre las dos líneas paralelas, el punto se represento fuera de ellas. La línea superior representa un cambio de expresión 3 veces mayor, mientras que la línea inferior muestra un cambio de expresión 3 veces menor. Las manchas que cayeron fuera de estos rangos se consideraron con expresión diferencial, ya sea por sobreexpresión o por una regulación negativa.

Los resultados del análisis comparativo, entre los perfiles proteicos de la línea celular A549 sin tratamiento y tratada con 300 μ M de EGCG durante 48h, así como los perfiles proteómicos de la línea celular MCF7 sin tratamiento y tratada con 150 μ M de EGCG durante 24h, se visualizaron através de la herramienta Scatter plot del programa PDQuest.

En la figura 25 se observa la gráfica obtenida mediante la herramienta Scatter plot., la cual nos indica que se detectaron 7 proteínas que incrementaron en su expresión y 7 proteínas que la disminuyeron al menos tres veces en las células con respecto a las células MCF7 tratadas con 150 μ M de EGCG durante 24 h

Por otro lado en la figura 26 se observa el gráfico obtenido mediante la herramienta Scatter plot, donde se encontraron 13 proteínas que aumentaron su expresión en las células A549 sin tratamiento y 5 proteínas disminuyeron su expresión al menos tres veces en las células A549 tratadas con 300 μ M de EGCG durante 48 h.

Cabe mencionar que la visualización de un punto en el gráfico no indica si la mancha se encuentra en uno o varios geles, por lo tanto una proteína presente en un solo gel podría ser graficada como diferencial.

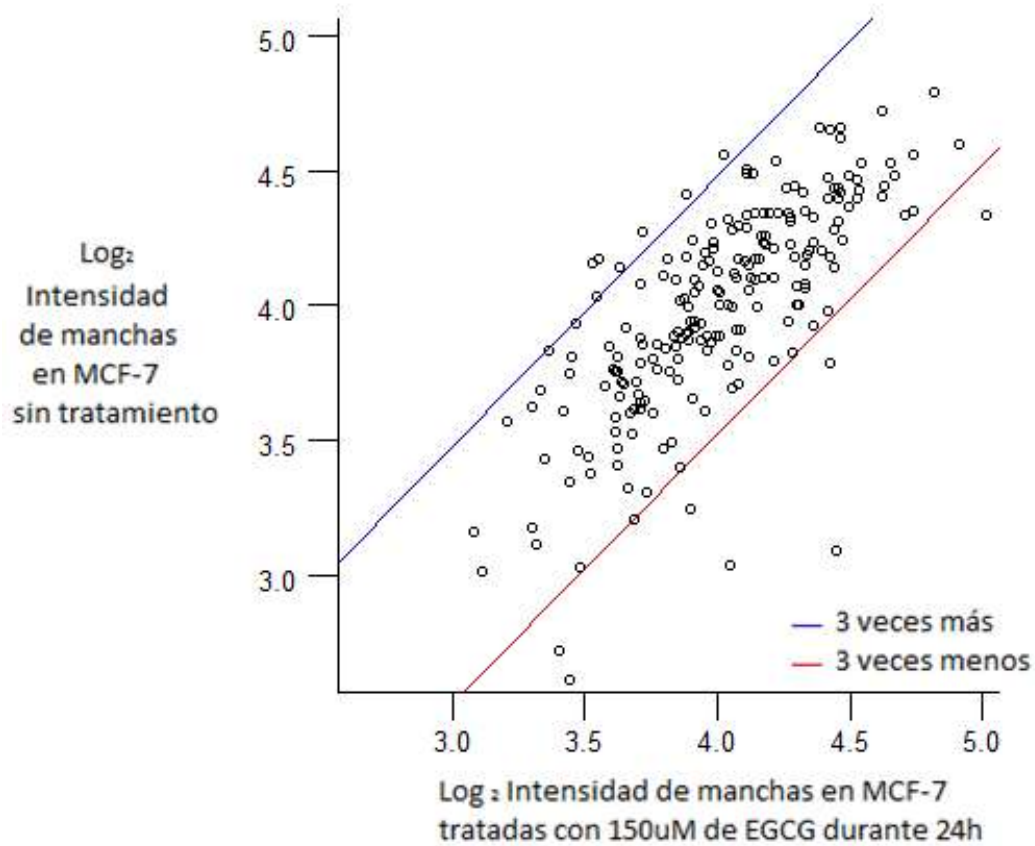


Figura 25. Demostración cuantitativa de proteínas diferencialmente expresadas en las células MCF7 sin tratamiento y tratadas con 150 μ M de EGCG durante 24 h. La gráfica muestra los cambios de expresión que existen entre los perfiles proteómicos de células MCF7 tratadas con 150 μ M de EGCG durante 24 h respecto a las células MCF7 sin tratamiento. Las proteínas representadas por arriba de la línea superior indican un incremento en su expresión de al menos tres veces y los que se encuentran por debajo de la línea inferior son proteínas que disminuyeron su expresión al menos tres veces.

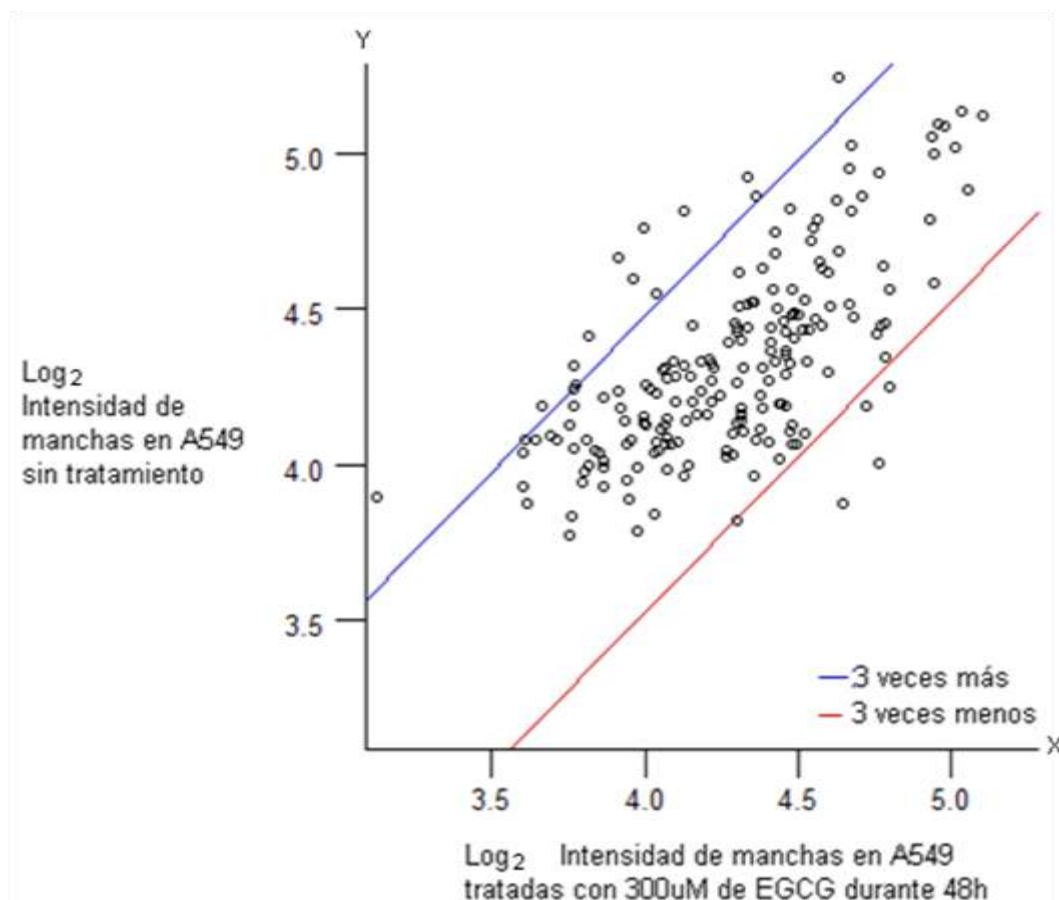


Figura 26. Demostración cuantitativa de proteínas diferencialmente expresadas en las células A549 sin tratamiento y tratadas con 300 μ M de EGCG durante 48 h. La gráfica muestra los cambios de expresión que existen entre los perfiles proteómicos de células A549 tratadas con 300 μ M de EGCG durante 48 h respecto a las células A549 sin tratamiento. Las proteínas representadas por arriba de la línea superior indican un incremento en su expresión de al menos tres veces y los que se encuentran por debajo de la línea inferior son proteínas que disminuyeron su expresión al menos tres veces.

8.8. Elección de proteínas para ser identificadas por ESI-MS/MS.

Con la ayuda del software PDQuest mediante el análisis de comparación entre experimentos se detectaron manchas que presentaron expresión diferencial en función con el control, se eligieron 2 manchas para ser identificadas mediante ESI-MS/MS, las cuales se señalaron con flechas en los perfiles proteómicos de MCF7 representativos para cada condición.

En la grafica 27 en el panel A se muestran dos geles representativos que muestran el perfil proteómico de células MCF7 sin tratamiento y tratadas con 300 μ M de EGCG durante 48 h. En el panel B se muestran las manchas candidatas a ser identificadas mediante ESI-MS/MS. Finalmente en el panel C se observan las densitometrías donde cada barra de color negro representan la expresión de una macha entre los perfiles proteómicos de las células MCF7 sin tratamiento o tratadas con 150 μ M de EGCG durante 24 h. Por lo tanto la mancha etiquetada como 4006 indica que la proteína se encontró sobre expresada en las células MCF7 sin tratamiento en comparación con las células MCF7 tratadas con el EGCG. Mientras que la densitometría correspondiente a las manchas 6102, 2305 y 4206 indican que la proteína aumento su expresión después de recibir el tratamiento con el EGCG. Por lo tanto con base en los resultados obtenidos se eligieron 4 manchas para ser identificados mediante ESI-MS/MS las cuales se señalaron con flechas en los perfiles proteómicos representativos de las células MCF7 para cada condición.

Finalmente en la figura 28 en el panel A se observan dos geles representativos que muestran el perfil proteómico de células A549 sin tratamiento y tratadas

con 300 μ M de EGCG durante 48 h. Mediante el análisis de comparación entre experimentos utilizando el software PDQuest se detectaron manchas que presentaron expresión diferencial en función con el control. En el panel B se muestran las manchas candidatas a ser identificadas mediante ESI-MS/MS. Finalmente en el panel C se observan las densitometrías, cada barra de color negro representan la expresión de una mancha entre los perfiles proteómicos de las células A549 sin tratamiento o tratadas con 300 μ M de EGCG durante 48 h. Por lo tanto las manchas 7201, 7101, 5201, 3203 y 2302 indican que estas proteínas se encontraron sobreexpresadas en las células MCF7 sin tratamiento en comparación con las células MCF7 tratadas con el EGCG. Mientras que en las densitometrías correspondiente a las manchas 6210, 7202 y 6105 indican que la proteína aumento su expresión tras recibir el tratamiento con el EGCG.

Por lo tanto con base en los resultados obtenidos se eligieron 8 manchas para ser identificados mediante ESI-MS/MS las cuales se señalaron con flechas en los perfiles proteómicos representativos de las células A549 para cada condición.

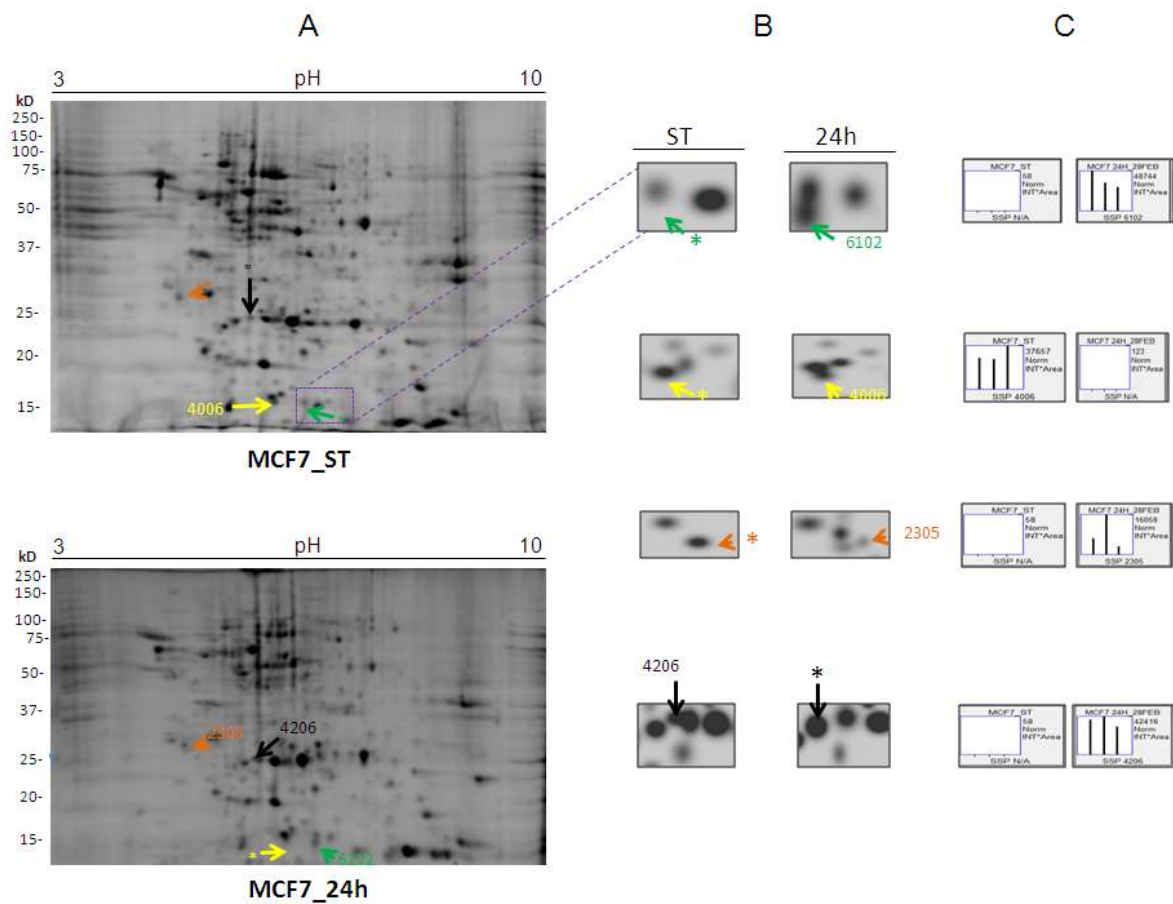


Figura 27. Perfiles proteómicos de células MCF7 sin tratamiento y tratadas con 150 μ M durante 24 h. Panel A muestra dos imágenes representativas de los perfiles proteómicos obtenidos de células MCF7 sin tratamiento (MCF7_ST) y tratadas con 150 μ M de EGCG durante 24 h (MCF7_24 h). Panel B muestra las manchas candidatas para ser identificadas por ESI-MS/MS, los cuales se señalan con flechas. Panel C muestra la expresión diferencial de las manchas candidatas en todos los geles mediante la función Spot Review del programa PDQuest (Bio-Rad).

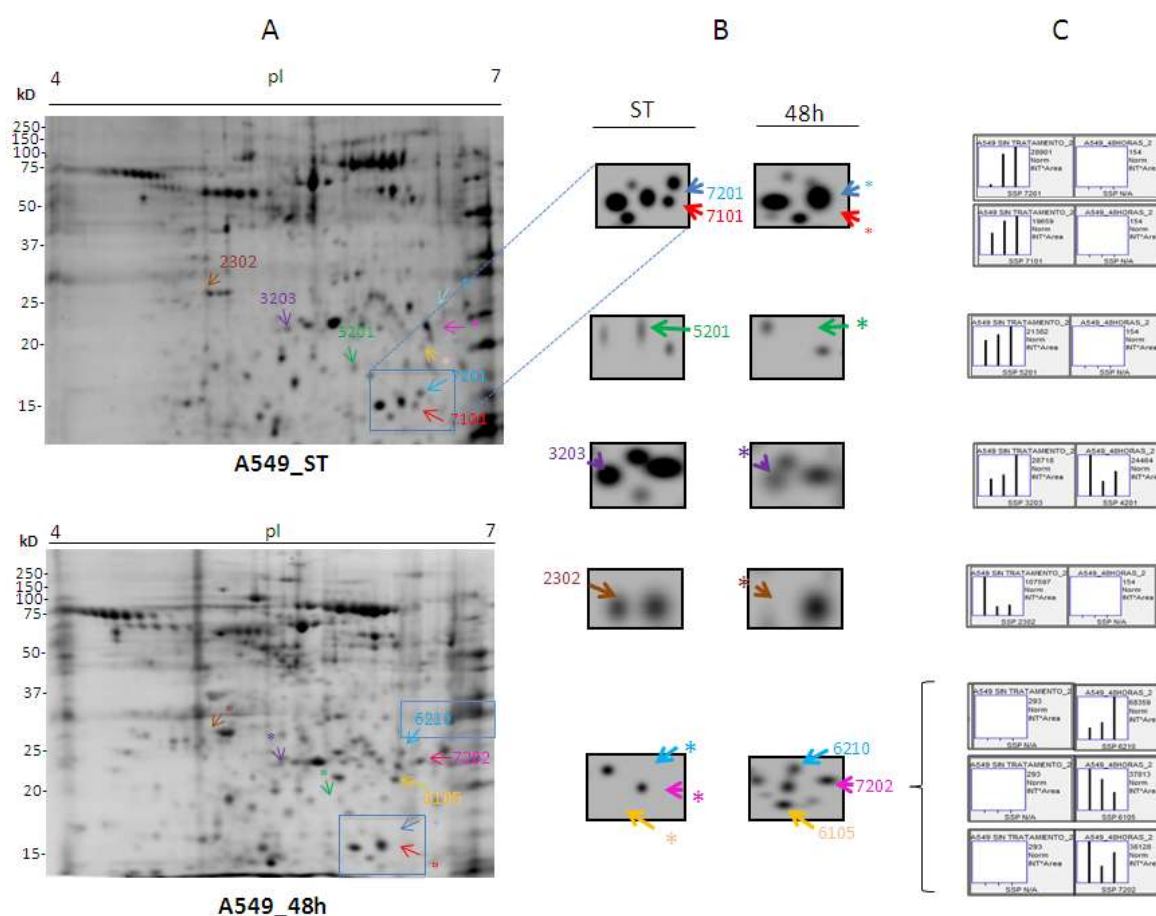


Figura 28. Perfiles proteómicos de células A549 sin tratamiento y tratadas con 300 μ M durante 48 h. Panel A muestra dos imágenes representativas de los perfiles proteómicos obtenidos de células A549 sin tratamiento (A549_ST) y tratadas con 300 μ M de EGCG durante 48 h (A549_48 h). Panel B muestra las manchas candidatas para ser identificados por ESI-MS/MS, los cuales se señalan con flechas. Panel C muestra la expresión diferencial de las manchas candidatas en todos los geles mediante la función Spot Review del programa PDQuest (Bio-Rad).

8.9. Identificación de proteínas mediante ESI-MS/MS.

Una vez separadas las proteínas totales mediante electroforesis en geles de doble dimensión y detectadas las manchas que presentaron expresión diferencial. Se seleccionaron 8 manchas de los perfiles proteómicos de células A549 para su identificación mediante la base de datos MASCOT de las cuales se identificaron 7 proteínas (Tabla 3). De estas, 5 proteínas disminuyeron su expresión en células A549 tratadas con 300 μ M de EGCG durante 48 h. A continuación se menciona cada una de ellas: i) el factor de crecimiento derivado de hepatoma con una cobertura de secuencia del 30%, 72 péptidos encontrados y un score de 96, esta proteína se encuentra involucrada en proliferación y diferenciación celular. ii) La ubiquitin hidrolasa L1 con una cobertura de secuencia del 42%, 94 péptidos encontrados y un score de 105, dicha proteína está involucrada en la maquinaria de ubiquitinación. iii) La superóxido dismutasa de Cu/Zn con una cobertura de secuencia del 16%, 26 péptidos encontrados y un score de 115; esta proteína participa protegiendo a las células del stress oxidativo. Finalmente se identificó una UMPCMP cinasa con una cobertura de secuencia del 15%, 36 péptidos encontrados y un score de 76, esta proteína tienen función transferasa y cinasa. Por otro lado se identificaron 2 proteínas sobre expresadas en las células A549 tratadas con 300 μ M de EGCG durante 48h; la proteína 29 del retículo endoplásmico con una cobertura de secuencia del 17%, 45 péptidos encontrados y un score de 144 la cual participa en los mecanismos de estrés oxidativo. Por último, se identificó a la enoil CoA hidratasa con una cobertura de secuencia del 36%, 106 péptidos encontrados, dicha proteína está involucrada en la beta-oxidación de ácidos grasos. Por lo tanto con base en los resultados la proteína que

resultó de gran interés fue el factor de crecimiento derivado de hepatoma (HDGF), dado que se ha reportado que la inhibición de la expresión de la proteína, está asociada a la inhibición del crecimiento e invasión de células no pequeñas de cáncer pulmonar (NSCLC).

Finalmente se seleccionaron 4 manchas de los perfiles proteómicos de células MCF7 para su identificación mediante la base de datos MASCOT de las cuales se identificaron 2 proteínas (Tabla 4). De estas 2 proteínas 1 disminuyó su expresión en células MCF7 tratadas con 150 μ M de EGCG durante 24 h, y fue identificada como ciclofilina A con una cobertura de secuencia del 18%, participa en la promoción de la proliferación celular, la anti-apoptosis, la migración e invasión celular. La otra proteína que se encontró sobreexpresada en las células MCF7 tratadas con 150 μ M de EGCG durante 24 h, se identificó como el factor Inhibidor de la migración de macrófagos con una cobertura de secuencia del 9%, participa en la regulación negativa del ciclo celular.

Proteínas sobreexpresadas en respuesta al tratamiento con EGCG (300 µM) a las 48 h								
Proteína (número de spot)	Peso Molecular/pI	Símbolo del Gen	Número de acceso	Mascot Score	No. de péptidos encontrados	Cobertura de secuencia	MS/MS secuencia peptídica (ion scores)	Función
Proteína 29 de retículo endoplasmático	28975/6.77	ERP29	NP_006808	144	45	17%	⁶ GALPLDVTYFYK ²⁷ (76) ⁸⁸ LNMELSEK ⁷⁹ (17) ¹⁷⁸ ILDQGEDFPASEMTR ¹⁸² (93) ²¹³ SLNLTAFQK ²¹² (52)	Chaperona (Inhibe el crecimiento celular en cáncer de mama)
Enoil CoA hidratasa	31351/8.94	ECHS1	CAA66808	228	106	36%	ASGANFEVIAEK (87) NNTVGLQLNRPK (57) IFEEDPAVGAIVLTGGDK (92) AFAAGADIK (38) AQFAQPEILIGTIPGAGGTQR (50) SLAMEMVLTGDR (67) LFYSTFATDDR (60) EGMTAFVEK (49)	Involucrada en la Beta oxidación de ácidos grasos,
Proteínas que disminuyen su expresión en respuesta al tratamiento con EGCG (300 µM) a las 48h								
Proteína (número de spot)	Peso Molecular/pI	Símbolo del Gen	Número de acceso	Mascot Score	No. de péptidos encontrados	Cobertura de secuencia	MS/MS secuencia peptídica (ion scores)	Función
Factor de crecimiento derivado de hepatoma	26903/4.65	HDGF	BAG37895	96	72	30%	²⁰ IDEMPEAAVK ³⁵ (56) ⁴² VQVFFFGTHETAFGLPK ⁵¹ (22) ¹³⁸ LVIDEPAK1 ¹⁴⁸ (49) ¹⁸² EAATLEVERPLPMEVEK ¹⁸⁷ (74) ¹⁸⁸ NSTLSEPGSGR ²⁰⁸ (20) ²²⁷ EDAEAPGIR ²³² (18)	Involucrado en proliferación y diferenciación celular
Ubiquitin carboxilo terminal isozima hidrolasa L1	24808/5.33	UCH-L1	NP_004172	105	94	42%	¹ NQLKPMINPENLUNK ¹² (33) ²⁰ LGVAAGQWR ²⁷ (38) ⁴⁶ QIEELKGQEVSPK ⁷⁸ (45) ⁷⁹ VYFMK ⁸³ (27) ¹⁰⁸ LGFEFGSGVLK ¹¹² (59) ¹¹⁸ QFLSETEK ¹²³ (59) ¹³⁸ NNEAIQAAHDAVAQEGQCR ¹⁵³ (45) ¹⁷⁹ MPFPVNHGASSEDTLTK ¹⁸² (51)	Importante en el proceso de ubiquitinación, proliferación y diferenciación celular. Involucrada en transformación oncogénica e invasión de NSCLC)
Tiorredoxina reductasa dependiente de peróxido	27675/7.67	PRDX3	NP_006784	57	30	11%	¹³² GLFIIDPNGVIK ¹³⁶ ¹⁸⁷ HLNVNDLPVGR ²⁰⁷ ²⁰⁸ SVETELR ²¹⁴	Antioxidante, regula la proliferación y diferenciación celular
Superóxido dismutasa de Cu/Zn	15747/5.70	SOD1	AAB05662	115	26	16%	¹¹ GDBGPVQGIINFEQK ²⁴ (67) ⁸¹ HVGDGNGVTADK92 (94)	Destruye radicales que son tóxicos para las células, se une Cu y Zn
UMP-CMP cinasa	25838/8.14	CMPK1	NP_057392	76	36	15%	³⁹ GYTHLSAGELLR ⁷¹ (15) ¹²² FLIDGFPR ¹²⁷ (54) ²¹² SVDEVFDEVVQIFDK ²¹⁶ (62)	Tiene función transferasa y cinasa, por lo tanto cataliza la transferencia de fosfato a partir de ATP a AMP y CMP

Tabla 4. Identificación de proteínas moduladas en respuesta al tratamiento con EGCG en células A549 mediante ESI-MS/MS.

Proteína que disminuyen su expresión en respuesta al tratamiento con EGCG (150 µM) a las 24h								
Proteína (número de spot)	Peso Molecular/pI	Símbolo del Gen	Número de acceso	Mascot Score	No. de péptidos encontrados	Cobertura de secuencia	MS/MS secuencia peptídica (ion scores)	Función
Ciclofilina A	17870/7.82	PPIA	P62937	64	3	18%	¹⁹ VSFELFADK27 (64) ⁸² FEDENFILK ²⁰ (18) ¹³³ EGMINIVEAMER ⁴³ (23)	Promueve proliferación celular, anti-apoptosis, migración e invasión celular
Proteínas sobre expresadas en respuesta al tratamiento con EGCG (150 µM) a las 24 h								
Proteína (número de spot)	Peso Molecular/pI	Símbolo del Gen	Número de acceso	Mascot Score	No. de péptidos encontrados	Cobertura de secuencia	MS/MS secuencia peptídica (ion scores)	Función
Factor inhibidor de la migración de macrófagos	12441/7.74	Mif	1MIF_A	55	1	9%	² PMFIVNTNVPR12 ¹² (55)	Regulación negativa del ciclo celular (para el ciclo celular)

Tabla 5. Identificación de proteínas moduladas en respuesta al tratamiento con EGCG en células MCF7, mediante ESI-MS/MS.

8.10. Predicción de las rutas celulares.

8.10.1. Interactoma de ciclofilina A.

Las rutas celulares se buscaron en base a las proteínas de nuestro interés y que estuvieran participando en procesos de proliferación celular. Se llevo a cabo la identificación sistemática realizando un interactoma del HDGF el cual se identificó en la línea celular A549, así como de la ciclofilina A cuya proteína moduló su expresión y fue identificada en las células MCF7. El interactoma se realizó a fin de observar una predicción de interacciones entre proteínas y predecir con que otras proteínas interactúan, además de conocer si están involucradas en procesos oncogénicos y/o antioncogénicos.

En la figura 29 podemos observar la red de interacciones predicha por el programa STRING versión 9.0 para la ciclofilina A. 1 proteína de las 10 predichas que interactúan en la remodelación de la cromatina y en el procesamiento del ARN ribosomal (PIN4). Las otras 9 proteínas restantes se encontraron que son desreguladas en cáncer como, CAMLG que se encarga de regular el tráfico de receptores membranales como el EGFR, la proteína PRLR que desempeña un papel en el desarrollo de tumores, la proteína CCR5 cuya expresión es necesaria para la transformación oncogénica, el factor de transcripción YY1 cuya función es participar en la regulación de la tumorigenesis, las proteínas PPP3CA y PPP3R1; regulan la transcripción de IL2, y disminuyen su expresión en células cancerosas, la proteína BSG tiene un rol en la progresión tumoral, y las proteínas FKBP2 y FKBP1A que disminuyen su expresión en células cancerosas, provocando aumento de expresión de metaloproteinasas.

8.10.2. Interactoma de HDGF.

En la figura 30 se muestra la red de interacciones predicha por el programa STRING versión 9.0 para el factor de crecimiento derivado de Hepatoma (HDGF). Donde 3 de las nueve proteínas que aparecen en el interactoma se encuentran desreguladas en cáncer, como la proteína TSPYL2 cuya función es inhibir la proliferación celular, la proteína ZBT17 que participa en el ciclo celular y en procesos de inhibición de crecimiento celular, por último la proteína SHC1 la cual está implicada en el proceso de angiogénesis y en la regulación del crecimiento celular.

Con base en los resultados podemos mencionar que el HDGF y la Ciclofilina A participan en muchos procesos celulares, dado que interactúa con muchos factores de transcripción o con proteínas que se encuentran desreguladas en cáncer. Donde el factor de crecimiento derivado de hepatoma (HDGF) resultó de gran interés debido a que existen estudios que han reportado que la inhibición de la expresión de la proteína, está asociada a la inhibición del crecimiento e invasión de células NSCLC.

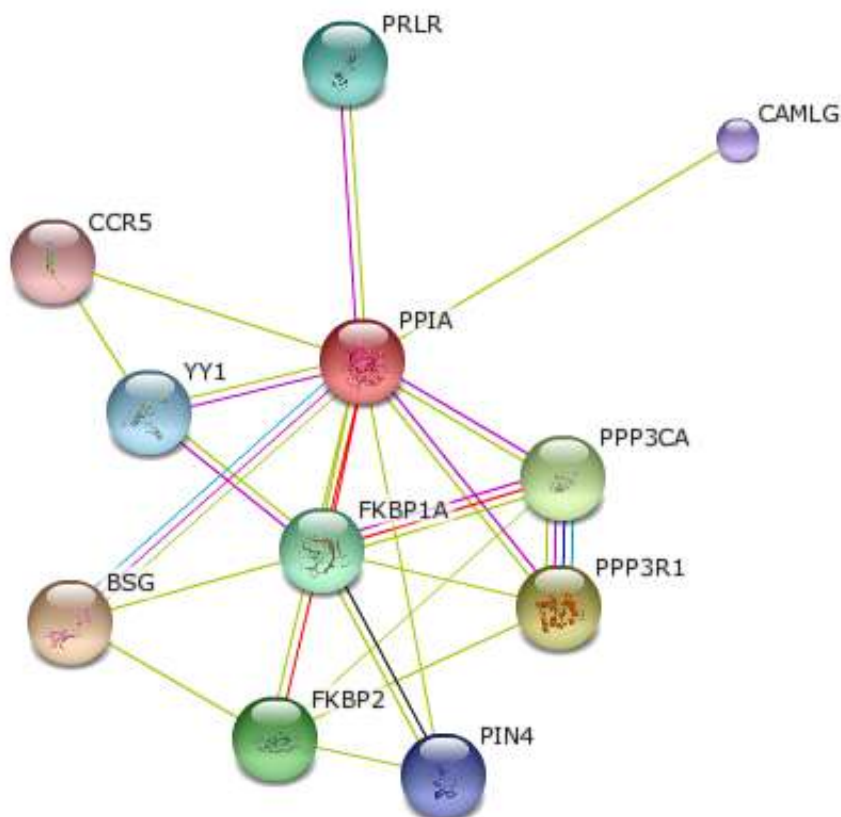


Figura 29. Interactoma de la ciclofilina A. 1/10 proteínas que interactúan con HDGF participan en la remodelación de la cromatina y en el procesamiento del RNA ribosomal (PIN4). 9/10 proteínas que interactúan con HDGF están desreguladas en cáncer (CAMLG; regula tráfico de receptores membranales (ejem. EGFR), PRLR; desempeñan un papel en el desarrollo de tumores, CCR5; su expresión es necesaria para la transformación oncogénica, YY1; factor de transcripción, regula la tumorigenesis, PPP3CA y PPP3R1; regulan la transcripción de IL2, disminuyen su expresión en células cancerosas, BSG; rol en la progresión tumoral, FKBP2 y FKBP1A; disminuyen su expresión en células cancerosas, provocando aumento de expresión de MMP

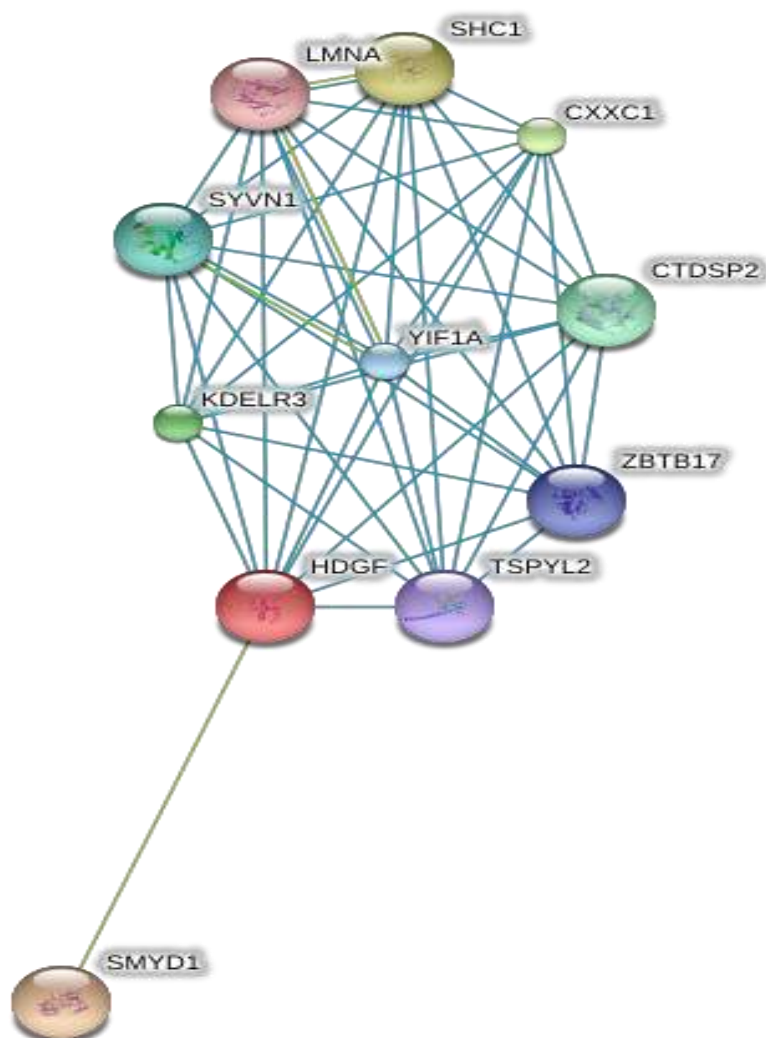


Figura 30. Interactoma del HDGF. 4 de 9 proteínas que interactúan con HDGF participan en la transcripción, 3 de 9 proteínas están desreguladas en cáncer como la proteína TSPYL2 que inhibe el crecimiento celular, la proteína ZBT17; inhibe crecimiento y ciclo celular y la proteína SHC1, implicada en angiogénesis y en la regulación del crecimiento celular.

8.11. Western blot de HDGF.

Esta técnica molecular se desarrollo para validar un resultado obtenido mediante ESI-MS/MS con respecto a que disminuyo la expresión del Factor de crecimiento derivado de hepatoma en las células A549 tras recibir un tratamiento con 300 μ M durante 48 h en comparación con las células no tratadas las cuales presentaron sobreexpresión de esta proteína.

Antes de realizar el western blot, se evaluó la calidad los extractos proteicos totales obtenidos de las células A549 sin tratamiento y tratadas con 300 μ M durante 48 h, Para esto se realizó una cuantificación por el método de Bradford posteriormente se determino cargar 50 μ g de proteínas por pocillo en el gel de poliacrilamida al 10% a efecto de realizar una electroforesis y de separar las proteínas en función de su peso molecular. El gel fue teñido con Azul de Coomasie y fotodocumentado en el equipo GelDoc a fin de observar la presencia de las bandas proteicas (figura 31)

Posteriormente se investigo la expresión de la proteína HDGF en extractos proteicos totales obtenidos a partir de células A549 sin tratamiento y tratadas con 300 μ M durante 48 h. En la figura 32 en el panel A se muestra la membrana de nitrocelulosa tras la detección mediante quimioluminiscencia y autoradiografía utilizando el reactivo ECL Plus. En el carril uno se corrieron extractos proteicos totales de A549 sin tratamiento y se detecto una banda la cual hace referencia a la proteina HDGF de 40 kDa, En el carril dos se corrieron extractos proteicos totales obtenidos a partir de células A549 tratados con 300 μ M de EGCG durante 48 h, se observó una disminución en la

detección de la banda correspondiente al HDGF. Se utilizó como control de carga la β -actina, por lo que se descarta que lo observado en la detección de HDGF para ambas condiciones haya sido producto de la concentración de proteínas. En el panel B se muestran los resultados del Western blot de manera cuantitativa, como podemos observar la expresión de HDGF disminuyó en un 90% su intensidad relativa en las células A549 tras recibir el tratamiento con el EGCG respecto a los extractos proteicos totales obtenidos de células A549 sin tratamiento.

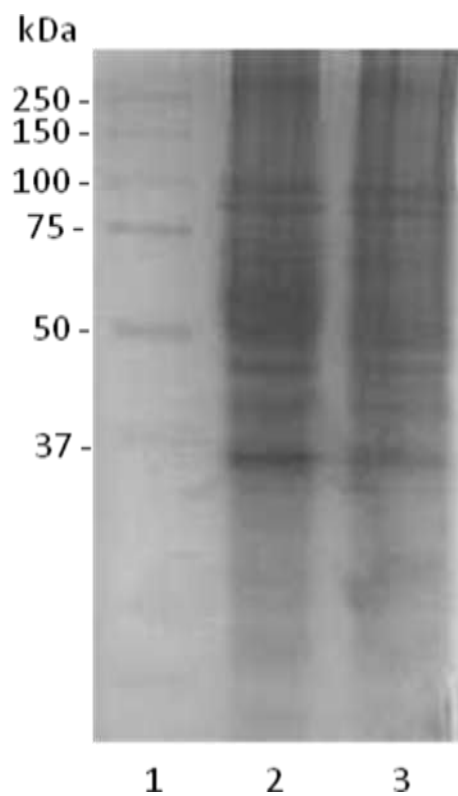


Figura 31. Gel de integridad SDS-PAGE al 10%. Carril 1; marcador de peso molecular (Bio-Rad), Carril 2; extractos de proteínas totales de la línea celular A549 sin tratamiento. Carril 3; extractos de proteínas totales de línea celular A549 tratadas con 300 µM de EGCG durante 48 h.

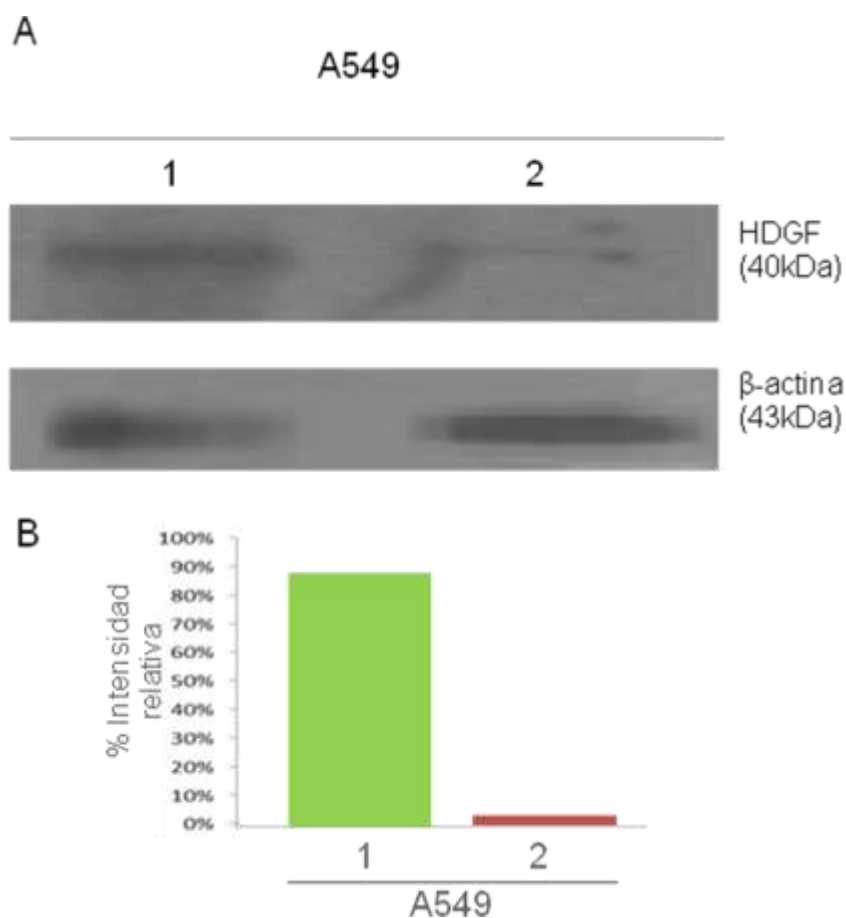


Figura 32. Western blot de HDGF. (A) Se analizaron dos extractos proteicos totales, carril 1; extractos proteicos totales a partir de células A549 sin tratamiento. Carril 2; extractos proteicos totales a partir de células A549 tratadas con 300 μ M durante 48 h. Los resultados revelaron una disminución en la expresión de la proteína HGDF en las células A549 tras recibir el tratamiento con el EGCG. Se utilizó como control de carga la β -actina. (B) Gráfica que muestra de manera cuantitativa el porcentaje de intensidad relativa detectado en el Western blot. La intensidad relativa de la proteína HDGF disminuyó en un 90% en los extractos proteicos de células A549 tratadas con el EGCG, con respecto a la intensidad relativa de los extractos proteicos de células A549 sin tratamiento.

VI. DISCUSIÓN

Las líneas celulares son células de origen animal o humano las cuales se adaptaron a vivir en medio de cultivo, poseen capacidad de proliferación ilimitada debido a que han sufrido un proceso de transformación, el cual puede ocurrir de manera espontánea o inducido por radiaciones, agentes químicos o virus. Los cultivos celulares tienen como objetivo mantenerlas vivas fuera de su organismo de origen, a fin de observarlas bajo un ambiente experimental controlado y poder estudiar la morfología celular, el ciclo celular, comparar el efecto de una variedad de agentes químicos a diferentes concentraciones sobre el crecimiento y metabolismo, así como el control del crecimiento de células tumorales. En este estudio se utilizaron líneas celulares de cáncer de mama MCF7 y células de cáncer de pulmón A549, las cuales son de tipo adherente transformadas. El medio de cultivo debe contener bajas concentraciones del ion Calcio, aminoácidos esenciales, factores de crecimiento proporcionados por el suero fetal bovino (FBS) , la mayoría de los medios de cultivo contienen rojo de fenol como un sistema regulador de pH y se debe mantener el cultivo bajo un ambiente controlado (temperatura y oxígeno). Otro suplemento que debe contener el medio de cultivo es un antibiótico a fin de disminuir el riesgo de contaminación por microorganismos. Todas estas condiciones permiten al máximo la proliferación celular.

En la mayoría de ensayos biológicos donde se utilizan líneas celulares se necesita medir la supervivencia o proliferación celular. En el presente estudio se determinó la viabilidad celular tras un tratamiento con EGCG en las líneas celulares MCF7 y A549 de cáncer de mama y pulmón respectivamente mediante el ensayo de exclusión utilizando azul de tripano. Este método está basado en que las células no viables pierden la permeabilidad de la membrana celular por lo tanto absorben el colorante mientras que las viables no lo hacen. El resultado fue una disminución de manera dosis dependiente, es decir a manera que aumento la concentración de EGCG así como el tiempo de incubación, incrementaron el número de células no viables.

La proteómica es una herramienta importante en el análisis de proteínas. Hasta la fecha se ha secuenciado el genoma completo de más de 400 especies distintas. Se han estimado más de 30,000 genes dentro del genoma humano. Pero la síntesis de ARN, las modificaciones postraduccionales y las variaciones en la expresión génica provoca que se estimen en cientos de miles las proteínas existentes. En este estudio se realizó el proteoma de las células MCF7 y A549 sin tratamiento y tratadas con 150 μ L y 300 μ L EGCG durante 24 h. y 48 h., a fin de obtener la dotación completa de proteínas expresadas en un momento determinado y conocer las posibles rutas celulares moduladas por el EGCG en estas líneas celulares. Por lo tanto para los estudios proteómicos se requieren cultivos con elevada población celular a efecto de realizar los análisis comparativos de expresión global de genes entre las células sin tratamiento y las tratadas con el EGCG. Los resultados obtenidos

revelan que se pueden identificar diferencias en los patrones proteínicos de células sin tratamiento y las tratadas.

La otra herramienta clave de la proteómica es la espectrometría de masas de ionización suave, dado que es la que se encarga de la identificación de las proteínas mediante el programa MASCOT el cual se encuentra disponible en la red. Este programa hace búsquedas en diferentes bases de datos a efecto de determinar la secuencia de las proteínas. Mediante esta técnica, se lograron identificar proteínas que presentaron expresión diferencial en las células tratadas con EGCG con respecto a las no tratadas. Para el caso de las células MCF7 tratadas con 150 μ M de EGCG durante 24 h se identificó la ciclofilina A y el factor inhibidor de la migración de macrófagos. Por otro lado en las células A549 tratadas con 300 μ M de EGCG durante 48 h se identificaron proteínas oncogénicas, como; ERP29, UHC-L1 y HDGF, donde esta última resultó de gran interés pues Jun Z. y cols., 2006 reportaron que al inhibir la expresión de la proteína mediante la selección de dos sitios blanco para siARN en el ARNm del HDGF, resultó en la inhibición del crecimiento e invasión de células de tipo CPCNP. Ren H. y cols., 2009 determinaron los efectos biológicos en tumores de tipo CPCNP en modelos de ratón tratados con el anti-HDGF, encontrándose que el anti-HDGF inhibió el crecimiento de células cancerosas. Por lo tanto el HDGF es un nuevo blanco terapéutico para el cáncer pulmonar y puede ser un blanco efectivo.

La validación del resultado obtenido se realizó mediante Western Blot , de esta forma se confirmó la disminución en la expresión de la proteína HDGF en células tratadas con EGCG

El HDGF es una proteína con actividad mitogénica se encuentra sobre expresada en tumores, por lo que su expresión se correlaciona con alta incidencia tumoral con probabilidad de metástasis y poca tiempo de vida en pacientes con cáncer pulmonar de tipo CPCNP.

VII. CONCLUSIONES

1. La viabilidad celular disminuyó de manera dosis dependiente, al ser tratada con diferentes concentraciones de EGCG durante 24 y 48 h.
2. El tratamiento con EGCG en las líneas celulares induce diferencias en el perfil proteómico de las células sin tratamiento en comparación con las células tratadas.
3. El EGCG inhibió la expresión de la ciclofilina A en la línea celular MCF7. Por otro lado en la línea celular A549 tras el tratamiento disminuyó la expresión de proteínas oncogénicas como; ERP29, UHC-L1 y HDGF. Resultando de gran interés esta última debido a que se ha reportado en diferentes artículos científicos que la inhibición de su expresión favorece la disminución del crecimiento celular canceroso en diferentes tumores. Lo cual hace promisorio el uso de este fitoquímico como coadyuvante en el tratamiento del cáncer de pulmón.

IX. BIBLIOGRAFIA

1. Andrew A.S, Schned A.R, Heaney J.A and Karagas M.R.(2004) Bladder cancer risk and personal hair day use. *Int. J. Cancer* 109;4:581-586
2. Sharma SV, Settleman J. (2007) Oncogene addiction: setting the stage for molecularly targeted cancer therapy. *Genes Dev.*,15;21(24):3214-31
3. Per Hydbring and Lars-Gunnar Larsson (2010) Cdk2: a key regulator of the senescence control function of Myc, *AGING*, 2;4:244-250
4. Pei H, Li C, Adereth Y, Hsu T, Watson DK, Li R. (2005) Caspase-1 is a direct target gene of ETS1 and plays a role in ETS1-induced apoptosis. *Cancer Res.*15;65(16):7205-13
5. Mure K, Rossman TG.(2001) Reduction of spontaneous mutagenesis in mismatch repair-deficient and proficient cells by dietary antioxidants. *Mutat Res.*,1;480-481:85-95
6. Yamada K, Zhong X, Kanazawa S, Koike J, Tsujita K, Hemmi H.(2003) Oncogenic pathway of sporadic colorectal cancer with novel germline missense mutations in the hMSH2 gene. *Oncol Rep.*,10(4):859-66
7. Meeran SM, Patel SN, Chan TH, Tollefsbol TO (2011) A novel prodrug of a epigallocatechin-3-gallate: differential epigenetic hTERT repression in human breast cancer cells. *Cancer Prev Res (Phila)*, Aug;4(8):1243-54.
8. Balantic M, Rijavec M, SkerbinjekKavalari M, Suskovic S, Silar M, Kosnik M,Korosec P. (2012) Asthma Treatment Outcome in Children Is Associated with Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGFA) Polymorphisms. *MolDiagn Ther.*1;16(3):173-80
9. Press MF, Cordon-Cardo C, Slamon DJ. Expression of the HER-2/neu proto-oncogene in normal human adult and fetal tissues. *Oncogene*. 1990, Jul;5(7):953-62

10. National Cancer Institute. <http://www.cancer.gov/>
11. Taipale J. and Philip A. (2001) Beachy The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature* 411;349-354
12. Organización Mundial de la Salud. <http://www.who.int/es/>
13. Globocan 2008, actualizado 27-02-2012. <http://globocan.iarc.fr/>
14. Torres A.L.P., Vladislavovna D.S. (2007) Cáncer de mama, detección oportuna en el primer nivel de atención. *RevMedInstMex Seguro Soc* 45;2:157-166
15. Omar M. Rashid, Kazuaki Takabe (2012) The evolution of the role of surgery in the management of breast cancer lung metastasis. *Journal of Thoracic Disease* 4;4:420-424
16. Thomas P.A., Breast Cancer and its Precursor Lesions, Current Clinical Pathology, Springer Science Business Media, New York USA, 2011, pp.7- 8, 43-45.
17. Cardiff R.D. and Wellings S.R. (1999) The Comparative Pathology of Human and Mouse Mammary Glands. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 4; 1:1-18
18. Ramsay D.T., Kent J.C., Hartmann R.A. and Hartmann P. E. (2005) Anatomy of the lactating human breast redefined with ultrasound imaging, *Journal of Anatomy*, 206; 6: 525–534.
19. Latarjet M., Alfredo Ruiz Liard, Anatomía Humana, Editorial medica panamericana, Buenos Aires Argentina, 2005. pp. 1667-1668.
20. Gusterson B.A, Ross D.T., Heath V.J. and Stein T. (2005) Basal cytokeratins and their relationship to the cellular origin and functional classification of breast cancer. *Breast Cancer Research*, 7;4:143-148
21. Sociedad Española de Oncología Médica. <http://www.seom.org>

22. Harumi I., Mizuki N., Hiroto H. (2004) Architecture of the Lung: Morphology and Function, *Journal of Thoracic Imaging*, 19; 4:221-227.
23. Narod S. A. (2011) Hormone replacement therapy and the risk of breast cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*. **8**: 669-676.
24. Opdahl S., Alsaker M. D. K., Janszky I., Romundstad P. R and Vatten L.J.(2011) Joint effects of nulliparity and other breast cancer risk factors. *British Journal of Cancer*. 105; 5: 731–736.
25. Lacey J.V., Kreimer A.R., Buys S., Marcus P., Chang S., Leitzmann M., Hoover R., Prorok P., Berg C.D. and Hartge P.(2009) Breast cancer epidemiology according to recognized breast cancer risk factors in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial Cohort. *BMC Cancer* 9:84;1-8.
26. Awatef M, Olfa G, Kacem M, Sami L, Makram H, Slim BA. (2011) Association between body mass index and risk of breast cancer in Tunisian women. *Ann Saudi Med* 31;393-397.
27. Romieu I., Lajous M.(2009) The role of obesity, physical activity and dietary factors on the risk for breast cancer: Mexican experience. *Salud Pública de México* 51; 2:172-180.
28. Puray M. y Yesenia P. (1999) Acumulación de la Proteína p53 en Cáncer de Pulmón. Hospital Nacional Guillermo Almenara I. 1990 – 1997.
29. *Anales de la Facultad de Medicina*, 60; 1: 30 – 35.
30. Toledo G. (2000) Patología molecular de las neoplasias del pulmón. *Rev. Esp. Patol*, 33;3:251-261.

31. Brandan M.E. y Villaseñor N.Y.(2006) Detección del cáncer de mama: estado de la mamografía en México. *Cancerología* 1;147-162.
32. Leong A., Zhuang Z.(2011) The Changing Role of Pathology in Breast Cancer Diagnosis and Treatment. *Pathobiology* 78;2:99-114.
33. Stickeler (2011) Prognostic and Predictive Markers for Treatment Decisions in Early Breast Cancer. *Breast Care* 2011;6:193–198.
34. Eisner A. and Luoh S.W.(2011) Breast Cancer Medications and Vision: Effects of Treatments for Early-stage Disease. *Informa Healthcare* 1-19.
35. Stickeler E.,(2011) Prognostic and Predictive Markers for Treatment Decisions in Early Breast Cancer. *Breast Care* 6;3:193-198.
36. Kanwar J, Mujtaba Taskeen , Imthiyaz Mohammad, Congde Huo, Tak Hang Chan², Qing Ping Dou (2012) Recent advances on tea polyphenols. *Frontiers in Bioscience* E4, 1;111-131.
37. Surch Y.J. (2003) Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature*. 3: 768-777.
38. Bode A. M. and Zigang Dong (2009) Epigallocatechin 3-gallate and green tea catechins: United they work, divided they fail. *Cancer Prev. Res.* 2;6:514-517.
39. Kim J.W., Ruhul A.R.M. and Shin D.M. (2010) Chemoprevention of Head and Neck Cancer with Green Tea Polyphenols. *Cancer Prev Res.* 3;8:900-909.

40. Kanwar J., Mujtaba T., Imthiyaz M., Congde H., Tak H. C. and Qing P. D. (2012) Recent advances on tea polyphenols. *Front Biosci.* 1; 4: 111–131.
41. Yang C.S. Joshua D. L., Shengmin S (2009) Antioxidative and anti-carcinogenic activities of tea polyphenols. *Arch Toxicol.* 83;1: 1-17.
42. Published online 2010 June 15. doi: 10.1016/j.abb.2010.06.013
43. Lambert J.D. and Ryan J. E. (2010). The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: a role in cancer prevention. *Arch Biochem Biophys*, 1; 501(1): 65–72.
44. Carlson J., Bauer B., Vincent A., Limburg P., Wilson T., (2007) Reading the tea leaves: anticarcinogenic properties of (-)-Epigallocatechin-3-Gallate. *MayoClinProc* 82;6: 725-732.
45. Tanaka K., Hayatsu T., Negishi T., Hayatsu H. (2006) Effect of green tea on the formation of nitrosamines and cancer mortality. *Journal of Health Science* 52; 3: 211-220.
46. Leone, M., Zhai, D., Sareth, S., Kitada, S., Reed, J.C., Pellecchia, M., (2003) Cancer prevention by tea polyphenols is linked to their direct inhibition of antiapoptotic Bcl-2-family proteins. *Cancer Res.* 63;8118–8121.
47. Tachibana H. (2011) Green tea polyphenol sensing. *Proc. Jpn. Acad., Ser. 87; 3: 66-79.*
48. Warden B.A., Smith L.S., Beecher G.R., Balentine D.A. and Clevidence B.A. (2001) Catechins Are Bioavailable in Men and Women Drinking Black Tea throughout the Day, *American Society for Nutritional Sciences.* pp. 1731-1737.

49. Patra S.K., Rizzi F., Silva A., Rugina D.O., Bettuzzi S. (2008) Molecular Targets Of (–)-Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG): Specificity And Interaction With Membrane Lipid Rafts, *Journal Of Physiology And Pharmacology*. 59; 9:217-235.
50. Fujimura Y, Mami S., Kaori S., Shuntaro T., Koji Y., Hirofumi T. (2012) Green Tea Polyphenol EGCG Sensing Motif on the 67-kDa Laminin Receptor. *PLoS ONE* 7(5):1-12.
51. Lamy, S., Gingras, D., Beliveau, R. (2002). Green tea catechins inhibit vascular endothelial growth factor receptor phosphorylation. *Cancer Res*. 62; 381–385.
52. Shimizu M., Shirakami Y. and Moriwaki H. (2008) Targeting Receptor Tyrosine Kinases for Chemoprevention by Green Tea Catechin, EGCG, *Int. J. Mol. Sci.* 9; 1034-1049.
53. Nandakumar V., Vaid M. and Katiyar S.K. (2011) (–)-Epigallocatechin-3-gallate reactivates silenced tumor suppressor genes, *Cip1/p21* and *p16^{INK4a}*, by reducing DNA methylation and increasing histones acetylation in human skin cancer cells. *Carcinogenesis*. 32; 4: 537–544.
54. Kanwar J., Mujtaba T., Imthiyaz M., Congde H., Tak H.C. and Qing P. D. (2012) Recent advances on tea polyphenols. *Front Biosci*. 4: 111–131.
55. Ruhul A., Omer K., Fadlo R. and Shin D.M. (2009) Perspectives for Cancer Prevention With Natural Compounds. *J Clin Oncol*. 27; 16: 2712–2725.
56. Kim J.W., Ruhul A.R.M. and Shin D.M. (2010) Chemoprevention of Head and Neck Cancer with Green Tea Polyphenols. *Cancer Prev Res*. 3; 8: 900-909.

COMITÉ EVALUADOR

El jurado designado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México aprobó esta tesis el día 31 de enero del 2013, en la Ciudad de México D.F. para optar al Grado de Maestra en Ciencias Genómicas, a la Biól. Exp. Lidia López Sánchez.

Dr. César López Camarillo

Dra. Elena Aréchaga Ocampo

Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez

Dra. Mavil López Casamichana
