



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”  
Multidisciplinario  
10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México  
ISBN: 978-607-95635

## CANCER Y PROTEOMICA

ADRIANA YANETT SIERRA HERNANDEZ

QUÍMICA PhD. Ciencias Biomédicas  
Universidad Internacional de Cataluña, España

[adrianayanett@gmail.com](mailto:adrianayanett@gmail.com)

[sierra\\_adriana@hotmail.com](mailto:sierra_adriana@hotmail.com)

Universidad Metropolitana / Hospital Universitario Metropolitano  
Barranquilla, Colombia



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”  
Multidisciplinario  
10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México  
ISBN: 978-607-95635

## CANCER Y PROTEOMICA

proyectos@congresoucec.com.mx

### Resumen:

Gracias a la implementación rigurosa de toda la tecnología necesaria para un estudio proteómico se logró la identificación de las citoqueratinas 8 y 18, como proteínas metabólicas, que son reguladas por condiciones de hipoxia. Las citoqueratinas como constituyente de la célula actúan como proteínas de soporte o andamiaje, además están involucradas en las vías de señalización intracelulares que regulan la respuesta de las células a las lesiones, el crecimiento celular, y la muerte. Lo más importante de esta revisión es que se dará el aporte metodológico, se mostrara detalladamente la forma como se superaron todos los inconvenientes durante el proceso de estandarización de las técnicas proteómicas.

### Abstract,

Thanks to the rigorous implementation of all necessary technology for proteomic study were identified cytokeratins 8 and 18, metabolic proteins are regulated by hypoxic conditions. Cytokeratins cell acting as support or scaffold proteins, are involved in the intracellular signaling pathways that regulate cell response to injury, cell growth and death. Here, the most important is the detailed methodological explanation, the methodology explained in detail as drawbacks were overcome during the process of standardization of techniques.

### Palabras Clave

Proteómica, Espectrometría de Masas esi-tof, citoqueratinas 8 y 18, metástasis, hipoxia.

**Objetivo:** Identificar proteínas metabólicamente reguladas por hipoxia en células tumorales de cáncer de mama cultivadas y ver su participación en muestras de biopsia de pacientes parafinadas. Diseño y estandarización de metodologías proteómicas para el descubrimiento de proteínas bioreguladas.



## “CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”

Multidisciplinario

10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México

ISBN: 978-607-95635

### **Introducción:**

Las nuevas tecnologías se desarrollan de manera innovadora y de rápido crecimiento, la proteómica como nueva herramienta requieren del manejo idóneo y de la integración de gran número de diferentes metodologías, que van desde el procesamiento de muestras biológicas, su manutención hasta llegar a la identificación por análisis físico-químicos altamente especializados como es la espectrometría de masas. Debido a que son tecnologías emergentes y de punta se hace inminente su aplicación a la solución de problemas de salud pública mundial. Patologías que afectan en gran proporción a la población humana y están alterando el desarrollo social y económico de los países. Debido a esto surge la inquietud de estudiar el cáncer, tratar de entender su metabolismo celular como lo que es, un proceso altamente variable y dependiente de infinidad de factores tanto internos como externos del microambiente celular. Nuestro objetivo es llegar a identificar nuevas dianas blanco que servirán a futuro, para su posterior tratamiento, como nuevo biomarcador o como indicativo de Metastasis, este proceso se debe llevar sin dejar de lado la información complementaria de estudios de polimorfismo y variabilidad genética, acompañada de cuantificación génica como rtc-pcr.

Como se da la explicación del origen del cáncer de mama. Se han realizado muchos esfuerzos interdisciplinarios por explicar la maquinaria celular responsable de la malignización de las células constitutivas de los tejidos mamarios. Es una enfermedad compleja, heterogénea y multifactorial, en la que intervienen tanto factores genéticos como no genéticos.

Algunos autores consideran el cáncer como más de 200 enfermedades diferentes dada su versatilidad en causa, evolución y por ende en el tratamiento tan específico necesario a seguir.(1.

Existen diversas causas pero un 90% de los casos tienen componente genético esporádico. Causa que conducirá a la mutación génica y como consecuencia al



## “CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”

Multidisciplinario

10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México

ISBN: 978-607-95635

desarrollo de células cancerígenas, estas mutaciones se dan por la alteración de la información génica contenida en el ADN, la cual adquiere propiedades proliferativas anormales desarrollándose un tumor y consecuentemente la invasión del resto de tejidos. Para que una célula se convierta en cancerosa depende de varios factores aun no determinados como agentes químicos e ionizantes, errores durante la duplicación celular del DNA, interacción de ciertos agentes virales con el genoma de la célula huésped o hereditarios.(2)

El metabolismo de la célula tumoral no está determinado única y exclusivamente por el microambiente tumoral interno y externo, está además definido por el ambiente global del organismo.

Las rutas metabólicas que utiliza la célula cancerosa son bastante especializadas y tienen una alta biodiversidad, pueden depender de la etapa del ciclo celular en que se encuentre, en la disponibilidad de micronutrientes, como azúcares o ácidos grasos. Se ha demostrado de manera concluyente la estrecha relación que existe entre el consumo de dietas ricas en micronutrientes y el menor riesgo de padecer cáncer o alguna enfermedad crónica.

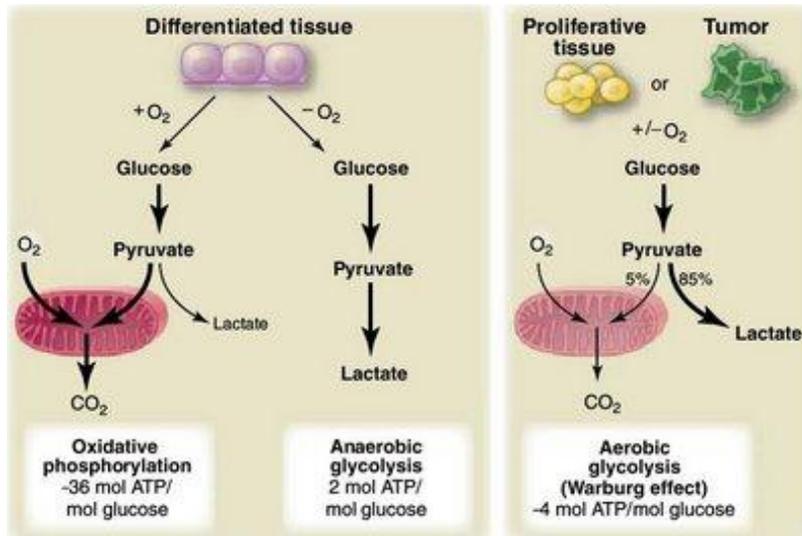
La célula cancerosa tiene la capacidad de tomar rutas alternas y/o modificarlas para asegurar su subsistencia, su velocidad de crecimiento y proliferación, el ciclo celular de las células tumorales tiene las mismas cinco fases (G<sub>0</sub>, G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> Y M) de las normales, la célula se vuelve tumoral por la combinación de lesiones genéticas y por cambios en el microambiente. Una mejor comprensión de esta heterogeneidad puede permitir el desarrollo y optimización de las estrategias terapéuticas que se dirigen a metabolismo del tumor.(3)

“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”

Multidisciplinario

10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México

ISBN: 978-607-95635



Un claro ejemplo de estos mecanismos de evasión son los que nos muestran Vander MG y colaboradores, Figura No1. Aquí se muestra la representación esquemática de las diferencias entre la fosforilación oxidativa, la glucólisis anaeróbica, y la glucólisis aeróbica (efecto Warburg), dependiente de la presencia o ausencia de oxígeno, que en la célula cancerosa se da contrario a la célula normal en donde siempre se va a llevar la ruta de la glicolisis aeróbica. Sin embargo, la glucólisis aerobia es menos eficiente que la fosforilación oxidativa para la generación de ATP.

Los tumores contienen regiones de hipoxia y necrosis debido a que su vasculatura no puede suministrar oxígeno y otros nutrientes vitales a todas las células. Como consecuencia, las áreas de hipoxia y necrosis a menudo presentes en cánceres sólidos generalmente contienen zonas con niveles anormalmente bajos de oxígeno. Tales zonas se denotan como hipóxicas. Desde hace tiempo se sabe que las células de cáncer en tales micro-ambientes hipóxicos son resistentes al tratamiento.

Investigaciones recientes ha demostrado que la hipoxia en tumores es uno de los principales responsables de la propagación metastásica del cáncer, es la principal causa de muerte por la enfermedad. Por lo tanto, la hipoxia es responsable de un



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”

Multidisciplinario

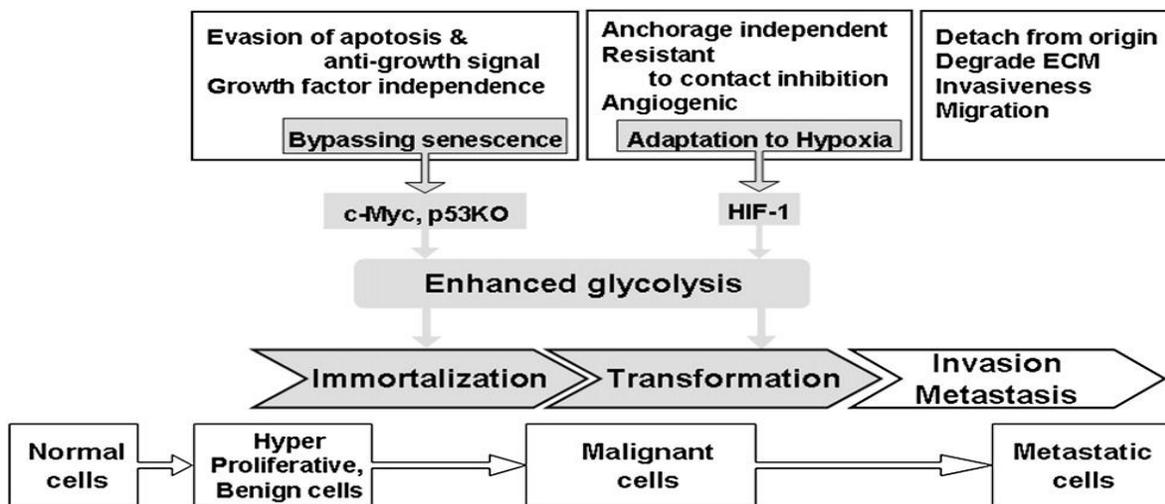
10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México

ISBN: 978-607-95635

doble efecto: reducir el potencial de un tratamiento exitoso de los pacientes con cáncer y de la resistencia al tratamiento y a la capacidad de propagarse.

Por lo tanto, el objetivo a desarrollar es la implementación de métodos que actúen específicamente localizado las células en las zonas de hipoxia, así se podrá obtener un efecto selectivo y específico, y sería dirigido contra las células cancerosas más perjudiciales.

Dentro de la descripción de las diferentes rutas metabólicas que causan la metástasis se ha descrito que un aumento de la glicolisis con lleva a una propensión a transformar células en metástasis.



El secuestro o evasión del metabolismo, es un nuevo factor que con lleva a impulsar la mutación y la selección de las células cancerosas, está acompañado del crecimiento competitivo, angiogénesis, y/o la evasión del sistema inmune.(4)

Levine y colaboradores muestran como las rutas metabólicas en las que participan la glucosa y glutamina, forman parte importante del requerimiento de las vías de señalización y proliferación. Actúan como generadores de ATP, reguladores del



## “CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”

Multidisciplinario

10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México

ISBN: 978-607-95635

potencial redox, control de especies reactivas de oxígeno (ROS), síntesis de los sustratos para proteínas membranales, y ácidos nucleicos.

El aumento de la captación de glucosa y glutamina por las células cancerosas, combustible de crecimiento de células y proliferación, tiene un costo: excesivas especies reactivas de oxígeno (ROS) que dañan membranas, proteínas y modifican los ácidos nucleicos, puede promover la mutagénesis o la inestabilidad genómica, estimulando la célula a la proliferación celular y la evasión del sistema inmune.

La famosa proteína supresora de tumores p53 tiene varias funciones importantes en la regulación del metabolismo celular: Reduce la absorción de glucosa, disminuye la glucólisis, aumenta la utilización del ciclo de TCA y la fosforilación oxidativa en la mitocondria.

La ausencia de oxígeno permite que las proteínas HIF-1a y HIF: aumenten la transcripción de cientos de genes, la promoción de la angiogénesis, la migración celular, y la supervivencia. También regula genes implicados en el metabolismo energético, incluyendo lactato deshidrogenasa A y piruvato deshidrogenasa quinasa, los cuales mantienen el piruvato lejos de la mitocondria y 9 de las 10 enzimas requeridas para la glucólisis.

El interruptor metabólico observado por Warburg es importante para el desarrollo, el crecimiento y la supervivencia de muchos tipos de cáncer, algunos de los mecanismos por los cuales los tumores inducen el "efecto de Warburg" se han dilucidado, y es probable que muchos de ellos aún no se han descubierto. (5)

Por medio de la proteómica se pueden elucidar todos estos procesos, la proteómica sirve como una herramienta que permite identificar nuevas proteínas blanco, cuando estas son estimuladas o inhibidas por factores externos como la hipoxia, y esta ha sido reportada como un componente importante para el desarrollo de metástasis en células de cáncer de mama.(6)



## “CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”

Multidisciplinario

10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México

ISBN: 978-607-95635

### Metodología:

1. Obtención de la muestra:
  - I. Fraccionamiento o lisis
    - a. Bloques de Parafina de pacientes con cáncer.  
Consentimiento Informado.
    - b. Cultivo celular MCF7, HT29 y u937,  
Condiciones de Hipoxia como inductor de Metástasis  
Ensayo de viabilidad MTT  
Lisis bajo condiciones Nativas, desnaturantes, solubilización con detergentes:  
proteínas de membrana y orgánulos, citoplasma, núcleo y citoesqueleto.  
Inhibidores de proteasas.
  - II. Desalinización y concentración:
    - a. Metanol/cloroformo
    - b. Acetona
    - c. Acetona/ Acido tricloroacético.
    - d. Hidrocloruro de guanidina, urea
  - III. Cuantificación ATA, Bradford
2. Separación.
  - a. Electroforesis bidimensional.  
Métodos de tinción: oriol o coomassie  
Sistema control y sistema perturbado por condiciones de hipoxia.  
Análisis de spot por software de cambios en la regulación proteica  
Corte de spots.
3. Digestión proteolítica
  - a. Reducción
  - b. Alquilación
  - c. Digestión triptica
4. Desalinización y concentración



## “CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”

Multidisciplinario

10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México

ISBN: 978-607-95635

- a. Zip-tip C-18
4. Espectrometría de masas Esi-tof.  
Condiciones HPLC-MS/MS  
Flujo, gradiente, columna, Temp,  
Energía de ionización, condiciones mascot (MPT, tolerancia,) Elimination de interferentes como, contaminantes de plástico y/o otros contaminantes proteicos.  
Estándar de digestión.  
Concentración y volumen muestra (Doble de volumen, score igual)
5. Identificación de proteína. Por huella peptídica en un espectrómetro de masas, Microtof-Q II.

### Resultados:

El mayor logro obtenido hasta el momento, siendo un laboratorio con 2 años de creación (implementación de planta física, equipos y proyecto) se han logrado poner a punto todas las metodologías anteriormente descritas, gracias a esto fue posible la Identificación de proteínas diferencialmente expresadas en células de carcinoma de mama por análisis proteómico.

Se encontraron proteínas de relevancia tumoral como las citoqueratinas 8, 18.

Las queratinas 8 y 18 (K8/18) son proteínas esenciales para la integridad del tejido y están implicados en las vías de señalización intracelulares que regulan la respuesta de las células a las lesiones, el crecimiento celular, y la muerte. Expresión de K8/18 se debe usar como reguladores de la señalización celular del cáncer. La pérdida de la expresión K8/18 fue observada al inducir metástasis por hipoxia en la línea celular MCF7.

La citoqueratina actúa como andamio interno celular sirve de soporte, transporte intracelular además da estructura al citoplasma, resistencia a factores externos de estrés, mantenimiento estructural de mitocondrias, procesos celulares como



## “CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”

Multidisciplinario

10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México

ISBN: 978-607-95635

apoptosis, mitosis, progresión del ciclo celular, señalamiento celular, marcador epitelial o comportamiento de la célula tumoral.(7)

### **A futuro**

La medición del número de células tumorales circulantes en el torrente sanguíneo antes y después del tratamiento contra el cáncer, puede proporcionar información acerca de si un paciente con enfermedad metastásica está respondiendo al tratamiento, será un diagnóstico de pacientes en etapa de metástasis por ck 18, por espectrometría de masas.

Se van a utilizar esta metodología para el estudio de células tumorales circulantes y sus implicaciones metabólicas. (8).

Se evaluará el Polimorfismo y variabilidad genética (genes recién identificados) en la población, y así se definirá posible respuesta a tratamientos, se deberá evaluar la respuesta inmunológica frente al aumento o bloqueo de los biomarcadores identificados, se diseñarán moléculas que actuaran como tratamiento o vacunas terapéuticas. Será necesario evaluar la efectividad y la bioseguridad en estudios de laboratorio (cultivo celular) y en animales. Así como diferentes métodos de administración para conducirnos a un ensayo clínico.

### **Conclusiones**

Dentro del proceso de investigación científica patrocinada por las directivas de la institución se hace necesaria la difusión y el fortalecimiento del intercambio de experiencias. En el proceso de creación, que llevamos la cabeza en la costa Atlántica Colombiana, es nuestro deseo abrirnos a la participación en proyectos de colaboración.

El método aquí propuesto de medida de los niveles de citoqueratinas 8 y 18, como método de seguimiento de metástasis, es un método de poco acceso pero muy relevante, en el diagnóstico de una etapa metastásica, y poco traumático para el paciente.



## “CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2014”

Multidisciplinario

10 y 11 de abril de 2014, Cortazar, Guanajuato, México

ISBN: 978-607-95635

Nuevamente reitero la importancia de la estandarización de las metodologías proteómicas para el reporte veraz del diagnóstico.

### Bibliografía

1. Torrades, S.2003.El origen genético del cáncer de mama. OFFARM, Núm 6. Vol 22. Junio.
2. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, et al.2013.Signatures of mutational processes in human cancer Nature Aug, 500(7463):415-21.
3. Cantor JR, Sabatini DM. 2012.Cancer cell metabolism: one hallmark, many faces. Source Cancer Discov.
4. Levine AJ, Puzio-Kuter AM.2010.The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes. Cancer Cell Science. 3;330(6009):1340
5. Levine AJ, Puzio-Kuter AM.2010. The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes. Cancer Cell Science. 3;330(6009):1340
6. Gort EH, Groot AJ, van der Wall E, et all. 2008. Hypoxic regulation of metastasis via hypoxia-inducible factors. Curr Mol Med, Feb;8 (1):60-7.
7. Weng YR, Cui Y, Fang JY. 2012. Biological functions of cytokeratin 18 in cancer. Cancer Res. Apr;10(4):485-93.
8. Fortier AM, Asselin E, Cadrin M. 2013.Keratin 8 and 18 loss in epithelial cancer cells increases collective cell migration and cisplatin sensitivity through claudin1 up-regulation. J Biol Chem. Apr 19;288(16):11555-71.