



**Tesina de graduación de la Licenciatura en Bioquímica
Facultad de Ciencias
Universidad de la República**

***Caracterización proteómica de una
línea celular humana de cáncer de
mama metastásico y su homóloga no
maligna.***

**Bernardina Inés Rivera Soto
Tutor: Dr. Carlos Batthyány**

**Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas
Institut Pasteur de Montevideo
Diciembre 2013**

Índice

Resumen

1. Introducción

1.1 Cáncer

1.1.1 Causas, desarrollo y factores de riesgo

1.1.2 Cáncer de mama

1.2 Proteómica

1.2.1 Origen de la proteómica y conceptos básicos

1.2.2 Técnicas utilizadas en proteómica

1.3 Líneas celulares

1.4 Senescencia Replicativa

2. Objetivo

3. Materiales y Métodos

3.1 Cultivo Celular

3.2 Preparación de los lisados celulares

3.3 Protocolos para microscopio de fluorescencia

3.4 Ensayos de β -galactosidasa

3.5 Electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2D-PAGE)

3.6 Espectrometría de masa (EM)

4. Resultados

4.1 Caracterización de los cultivos celulares

4.2 Estudios de senescencia celular: ensayos de β -galactosidasa.

4.3 Estudios del proteoma celular por electroforesis bi-dimensional y espectrometría de masa MALDI-TOF/TOF

5. Discusión & Conclusiones

6. Conclusiones generales

7. Bibliografía

8. Agradecimientos

Resumen

El cáncer de mama es el más frecuente y una de las principales causas de muerte por cáncer en mujeres en el mundo. En Uruguay posee una alta incidencia y mortalidad ocupando el primer lugar en comparación con otros tipos de cáncer. El objetivo de este trabajo es realizar la caracterización proteómica diferencial de una línea celular humana de cáncer de mama metastásico (MCF-7, HTB-22, ATCC) y la de su homóloga no maligna (MCF-10A, ATCC). La línea celular MCF-7 expresa receptores de estrógeno y progesterona pero no expresa el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2-). Para el estudio de los proteomas de las células control y tumoral se siguió un abordaje proteómico clásico, realizando la separación de proteínas por electroforesis bidimensional y su posterior identificación por espectrometría de masa (MALDI-TOF/TOF; 4800 Abi).

De un total de 106 proteínas identificadas de ambas líneas celulares cultivadas en las condiciones experimentales recomendadas por la ATCC, 21 se encuentran presentes en una sola de las dos líneas celulares, teniendo la mayoría de ellas relevancia como marcadores y/o “targets” moleculares de la actividad tumoral. Las restantes proteínas identificadas poseen una expresión aumentada, disminuida o equivalente si se comparan ambas líneas.

Profundizar en el conocimiento de las proteínas expresadas diferencialmente entre ambas líneas podría generar información útil a los efectos de avanzar en los mecanismos moleculares involucrados en la transformación celular maligna.

1.1 Cáncer

1.1.1. Causas, desarrollo y factores de riesgo

El cáncer es uno de los problemas de salud de mayor relevancia a nivel global. Es la primera causa de muerte en países desarrollados y la segunda causa de muerte en países en desarrollo (Jemal, Bray, & Ferlay, 2011). Durante el desarrollo, las células del cuerpo crecen, se dividen y mueren como parte de un ciclo ordenado. La proliferación celular es más activa durante la embriogénesis y el desarrollo de un organismo, siendo luego en la edad adulta fundamental para la regeneración de tejidos dañados y el remplazo de células muertas. Varios puntos de control durante el ciclo celular previenen una proliferación descontrolada.

Se define a las ***neoplasias como masas anormales de tejido resultantes del crecimiento excesivo y no coordinado con respecto al de los tejidos normales. En general su crecimiento carece de objeto, ataca al huésped y es prácticamente autónomo.*** (Kumar, Aster, Fausto, & Abbas, 2010). Son procesos donde existe pérdida del control proliferativo y de la muerte celular, siendo posible la adquisición de morfología y funcionalidad diferencial por parte de las células transformadas en referencia a las células normales. Es un proceso complejo, dinámico, progresivo y que transcurre en múltiples pasos por los cuales las células adquieren la capacidad de invadir y destruir tejido adyacente (Liotta, 1986) (Bast R.C. Jr., et al, 2003) . La capacidad de producir metástasis también es una característica biológica fundamental de los tumores malignos. Se define este proceso como el crecimiento progresivo de células malignas en un sitio lejano al tumor primario (Welch, Steeg, & Rinker-Schaeffer, 2000).

La inducción neoplásica de las células puede ser causada por diferentes factores, tanto internos, como externos. La acumulación secuencial de mutaciones no letales es capaz de culminar en la alteración de la funcionalidad y el fenotipo celular, favoreciendo la expansión policlonal de las células afectadas (Lengauer, et al., 1998).

Además de los factores genéticos, otros factores causales y de riesgo son los ambientales, así como también los hábitos alimenticios, sedentarismo, estrés, algunas infecciones víricas/bacterianas, desregulación metabólica y estados disfuncionales del sistema inmune entre otros (Yokota, 2000) (Garcia M, et al., 2007). Para iniciar o

promover la carcinogénesis, estos factores pueden actuar en conjunto así como también de manera secuencial. El proceso de desarrollo parece ser similar, aunque no exactamente idéntico, en todos los casos (Clark, 1991), destacándose en la evolución natural de los tumores malignos las siguientes etapas (Kumar et al., 2010):

1. Transformación: Las células tumorales surgen de mutaciones en proto-oncogenes y genes supresores de tumores, afectando el ciclo celular y las cascadas de señalización intra- y extracelulares. Los tipos frecuentes de anomalías no aleatorias son translocaciones, deleciones y amplificación de genes.

2. Crecimiento: Debido a alteraciones en los puntos de control del ciclo celular, las células tumorales ingresan a éste y lo completan con mayor facilidad de la habitual. El crecimiento es desordenado y acelerado, observándose factores determinantes de la velocidad de crecimiento. En este sentido, el factor más importante es la irrigación.

3. Invasión local: Las células tumorales se separan del resto de la masa tumoral lo que facilitará su progresión a los tejidos adyacentes. Luego, para penetrar la matriz extracelular, las células primero se adhieren a componentes de la membrana basal mediante el remodelado de los receptores de adhesión situados en la superficie celular. Así, ***mediante la presión pasiva efectuada por el crecimiento y la secreción de enzimas proteolíticas y glicosidasas las células transformadas invaden el tejido subyacente*** (Kumar et al., 2010).

4. Angiogénesis: La neo-vascularización posee un doble efecto en el crecimiento tumoral. Por un lado aporta elementos nutritivos y oxígeno y por otro las células endoteliales recién formadas estimulan el crecimiento de las células tumorales adyacentes mediante la secreción de factores de crecimiento. Sin vascularización los tumores sólidos y sus metástasis no pueden alcanzar diámetros mayores a 1-2mm. Por otra parte, este proceso es necesario para que el tumor pueda metastatizar, existiendo una fuerte correlación entre la magnitud de éste (densidad de micro-vascularización) y la probabilidad de aparición de metástasis (Kumar et al., 2010).

5. Metástasis a distancia o diseminación tumoral: la diseminación ocurre a través de la microvasculatura luego de la invasión de los capilares finos cerca del tumor, nuevamente mediante la rotura de la matriz extracelular. Cuando penetran en la circulación se vuelven vulnerables a la destrucción por el ataque del sistema inmune quien posee un rol fundamental en el control de la propagación hematógica de los

tumores. También tienden a agregarse en grupos entre sí o con células sanguíneas como plaquetas y leucocitos lo cual potencia su supervivencia y el proceso metastásico. Las células metastásicas deben interactuar de manera correcta con su microambiente, para lo cual se vuelve esencial la selección de clones celulares malignos con distintos fenotipos que puedan ser más ventajosos.

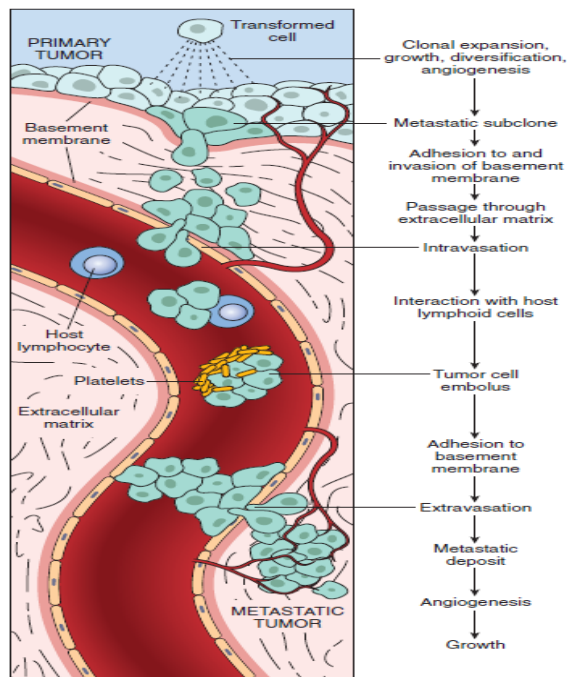


Figura 1. Etapas de la progresión tumoral (tomado de Kumar et al. Robbins Basic Pathology 8ed. 2010)

1.1.2.Cáncer de mama

El cáncer de mama posee una alta incidencia y es una de las principales causas de muerte por cáncer en mujeres en el mundo (Chen, et al., 2008) (Bertucci et al., 2006). En Uruguay posee una alta incidencia y mortalidad con respecto a otros tipos de cáncer que afectan a mujeres (MSP, 2011). Su desarrollo es más frecuente en etapas tardías o medias de la vida, siendo menos común en la juventud, sin embargo si se desarrolla en dicha etapa, es asociado con una forma más agresiva en comparación a la enfermedad de la mayoría de las mujeres adultas.

Glándula mamaria

Las mamas son órganos glandulares de secreción externa característicos de los mamíferos y destinados a la alimentación de las crías. Se forman al inicio del desarrollo embrionario a partir de engrosamientos ectodérmicos paralelos en la cara anterior y a cada lado de la línea media del embrión. Su maduración posterior, así como la constante multiplicación del epitelio mamario, son reguladas por otros procesos como, por ejemplo, el ciclo menstrual y la gestación, ambos estrechamente relacionados con cambios hormonales y una constante estimulación por medio de factores de crecimiento. La mama contiene dos compartimentos: por un lado la porción glandular cuya principal función es la producción y transporte de leche, y por otro el estroma y tejido conectivo. La porción glandular formada por células epiteliales constituye los lobulillos, lóbulos y conductos que se unifican en el pezón interconectando los lóbulos, así como también a la glándula con el exterior. Inmediatamente por detrás del pezón los conductos aumentan su diámetro constituyendo reservorios de leche, estas dilataciones se denominan conductos galactóforos. Una pequeña capa de células mioepiteliales (epiteliales estrictamente en cuanto a su origen pero con la capacidad de moverse en forma similar a las fibras musculares), se encuentran adheridas a la membrana basal rodeando a las células epiteliales. Su función es mantener la estructura tubular de ductos y lóbulos. Rodeando la porción glandular se encuentra el tejido conectivo y conjuntivo junto con los vasos sanguíneos, linfáticos y fibras nerviosas (Hondermarck, 2003). El tejido conectivo-epitelial se comporta principalmente como un receptor hormonal siendo extremadamente sensible a los niveles hormonales en el organismo, fundamentalmente estrógenos y progesterona.

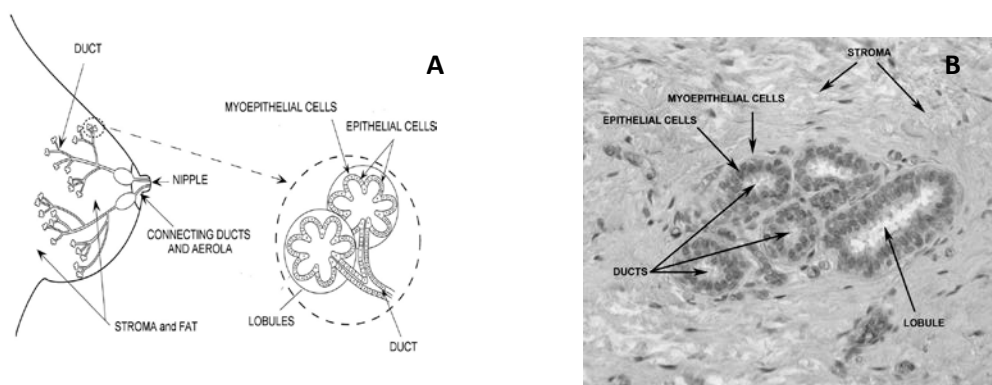


Figura 2. Anatomía (A) e histología (B) de la glándula mamaria humana normal.
Tomado de (Hondermarck, 2003).

La irrigación arterial de la glándula presenta cierta complejidad, y el drenaje venoso de la glándula sigue un trayecto paralelo e inverso al de la red arterial.

El drenaje linfático consiste en una red que desemboca mayoritariamente en la cadena ganglionar axilar.

Nomenclatura y clasificaciones

La mayoría de los tumores de mama son de origen epitelial, siendo nombrados en el caso de los tumores malignos como carcinomas. Los tumores malignos de origen no epitelial son infrecuentes.

En particular y debido a que en general presentan similitud con la glándula mamaria normal y a que además se originan a partir de un epitelio glandular, la gran mayoría de los cánceres de mama son adenocarcinomas. Sin embargo, este grupo comprende diversos tipos de lesiones con diferentes aspectos microscópicos y comportamientos. Un porcentaje muy alto de los casos tiene su origen en la proliferación acelerada y descontrolada de las células epiteliales que tapizan los conductos responsables de conectar los acinos glandulares (conjunto de lóbulos) con los galactóforos. En este caso se denomina adenocarcinoma ductal. Este puede extenderse por el interior de la luz ductal e invadir los acinos en un fenómeno denominado cancerización lobular.

En los casos restantes, es decir cuando el origen son los propios acinos glandulares se le denomina adenocarcinoma lobulillar.

Desde el punto de vista **histológico** se clasifican en: 1. ***Carcinomas in situ***: las células tumorales localizadas tanto en ductos como en lóbulos se mantienen sin daño en la membrana basal y por lo tanto sin invasión del estroma. Estos son potencialmente curables si son extirpados en su totalidad.

2. ***Carcinomas invasivos***: las células tumorales luego de su excesiva proliferación provocan la destrucción de la membrana basal, invadiendo progresivamente el tejido circundante.

En particular, el adenocarcinoma ductal invasivo o infiltrante se puede clasificar **morfológicamente** según el grado de diferenciación de las células que lo componen. La *anaplasia* o falta de diferenciación se considera una característica clave en la

transformación maligna. En este caso la célula tumoral posee un aspecto primitivo, con una relación núcleo/citoplasma anormal (Q=1) y presencia de un gran núcleo polimórfico o de 2 o más núcleos más pequeños. Es el resultado de una proliferación sin maduración de éstas células (Kumar et al., 2010). En el caso de los tumores malignos o benignos con un alto grado de diferenciación, las células poseen un aspecto similar al de las normales del tejido del que proceden, denotando la naturaleza tumoral únicamente la agrupación nodular característica. Son el resultado de la proliferación y posterior maduración de las células tumorales.

Desde el punto de vista molecular la clasificación se ha hecho mediante la utilización de dos técnicas: A. inicialmente mediante inmuno-histoquímica; y B. luego por el uso de “microarrays” (Bertucci et al., 2006).

En el primer caso la clasificación se realiza en función de la presencia o ausencia de diferentes receptores de superficie celular, como por ejemplo receptores hormonales estrógeno (ER), progesterona (PR) o el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2). En particular la ausencia de receptores hormonales se ha asociado a mayor tasa de recurrencias, menor supervivencia y mayor riesgo de diseminación a distancia.

La clasificación obtenida mediante el uso de “microarrays” permite diferenciar los distintos tumores en: Luminal A (RE+) y B (RE+, HER2+), “Basal Like” (RE-, PR-, HER2-) y otros que generalmente son HER2+ pero RE-.

La gran mayoría de los tumores de mama son en primer lugar del tipo ER+, seguidos por los HER2+, teniendo ambas terapias asociadas pero diferenciándose en sus pronósticos ya que tienen buen y mal pronóstico, respectivamente. En contraste a estos, el “Basal Like” está asociado con un peor pronóstico que los ER+ ya que no existen terapias biológicas asociadas, pero presentan un mejor pronóstico que el de los HER2+.

1.2. Proteómica

1.2.1. Origen de la Proteómica y conceptos básicos

Las disciplinas “ómicas” poseen diversos objetos de estudio entre los cuales se encuentran los genes, transcritos de ARN, proteínas y otros productos participantes o

derivados del metabolismo. La alteración de genes y proteínas se encuentra involucrada en la generación y progresión de varias enfermedades, si bien los procesos moleculares no se conocen con exactitud. Por lo tanto la combinación de dichas disciplinas así como el estudio individual de cada una de éstas, puede facilitar el entendimiento sobre el origen y el desarrollo de patologías complejas.

Debido a que la presencia de un ARNm no siempre implica la presencia de una proteína, existen diferencias entre las poblaciones de ARNm y proteínas. Esta variabilidad se debe a factores tales como: el tiempo de vida media de las moléculas de proteínas en el interior de una célula o de un compartimento celular, a la traslocación intra- y extracelular, pero principalmente a cuatro fenómenos: 1.splicing alternativo de los ARNm (mecanismo mediante el cual la expresión de un gen puede dar lugar a diferentes proteínas); 2.regulación de la traducción; 3.modificación postraducciona de las proteínas (fosforilación, acetilación, glicosilación y clivaje de proteínas, todos procesos capaces de afectar aspectos esenciales de la funcionalidad de las proteínas), y 4. SNPs ("single nucleotide polymorphisms") (Koomen, M.J., et al. 2008). Todos estos factores determinan que la expresión de ARNm no aporte información confiable a partir de la cual se pueda determinar la cantidad o la calidad de las proteínas traducidas (Vispo, N. 2004). Por lo tanto, la genómica (estudio del conjunto de genes expresados por un organismo bajo determinadas condiciones y en un momento específico) y la transcriptómica [estudio de la colección de ácidos ribonucleicos que se transcriben del genoma, es decir, el perfil de expresión de ARN mensajero (ARNm)] permiten el estudio de parte del complejo proceso de la expresión proteica. La proteómica por su parte se define como el estudio del proteoma, entendiendo por este al conjunto de todas las proteínas que son expresadas por un tejido o en una célula en un determinado momento (Vispo, N. 2004). A partir de esta herramienta es posible no solo la identificación de proteínas, sino también su caracterización y la determinación de posibles modificaciones en las mismas. El proteoma es característico de una determinada condición, del compartimento celular o del tejido en estudio. Representa una entidad dinámica, siendo capaz de ser modificado debido a alteraciones en su ambiente (estímulos externos e internos), acción de fármacos, requerimientos energéticos, variaciones en el estado fisiológico (normal o patológico), etc. Dichos cambios pueden derivar en modificadas post-

traduccionales, translocaciones proteicas, síntesis de nuevas proteínas o degradaciones. A la hora de realizar un análisis proteómico se presentan varios desafíos. En primer lugar el tamaño del proteoma, así como también la complejidad de esta mezcla. Por otra parte, las variaciones y diferencias en las concentraciones de las proteínas (rango dinámico de concentración que involucra cambios en varios órdenes de magnitud), también representan un grado más de complejidad. Finalmente, las propiedades fisicoquímicas de las proteínas son muy diversas y por ende, el análisis se hace aún más complejo debiéndose contar con herramientas y técnicas versátiles ante masas moleculares, puntos isoeléctricos e hidrofobicidades muy variadas.

1.2.2. Técnicas utilizadas en la presente tesina para el análisis proteómico

Debido a la complejidad del análisis a realizar es necesario disponer de técnicas y herramientas variadas pero altamente específicas que permitan:

- a) Simplificar una muestra de análisis compleja en proteínas individuales o grupos de proteínas de forma de facilitar su estudio;**
- b) identificar las proteínas de interés;**
- c) cuantificar la magnitud de los cambios en la expresión de las proteínas.**

Electroforesis bidimensional

La técnica más utilizada para la separación de proteínas es la electroforesis bidimensional (2DE). Esta técnica posee una alta eficacia para resolver mezclas complejas de proteínas, permitiendo separar miles de proteínas en un solo experimento. Si bien ésta técnica es la más utilizada, no hay una técnica de purificación estándar. Dependiendo de las características del “analito” se debe realizar la selección de la técnica a utilizar. La 2DE se basa en la combinación de dos técnicas que no dependen de principios físicos comunes, de manera que las proteínas son separadas de acuerdo a dos propiedades independientes (carga neta y peso molecular) en dos pasos discretos (Ver detalles en materiales y métodos). A su vez esta característica es responsable de la alta resolución que es capaz de alcanzar la técnica (GE- 2DE Handbook, 2005). Experimentalmente el procedimiento comienza con la **preparación**

de la muestra, siendo este el paso más importante, y cuyo proceder se refleja directamente en el gel obtenido. Debido a la gran diversidad de muestras proteicas no hay un protocolo único y el mismo debe ser determinado de forma empírica. Debe ser simple, y la manipulación de la muestra debe ser reducida. En ciertas ocasiones el agregado de pasos al protocolo implica la pérdida de proteínas. El siguiente paso es la **rehidratación** de las tiras “Immobilized pH gradient” (IPG). Estas tiras como su nombre lo indica, poseen un gradiente de pH inmovilizado. El gradiente es generado por el agregado de inmobilinas co-polimerizadas con la matriz de acrilamida en la tira. Las inmobilinas son diferentes pares ácidos, bases débiles y sus sales correspondientes, derivados de la acrilamida que tienen la estructura general $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{R}$, en la que R es un grupo ácido o básico. El uso de éstos mejora la reproducibilidad, resolución de la técnica y además elimina los problemas de inestabilidad del gradiente y baja capacidad de carga asociada a los gradientes de pH preparados con anfólitos (“carrier ampholytes”) utilizados inicialmente en el IEF.

La rehidratación puede realizarse utilizando 2 métodos: mediante rehidratación pasiva o mediante rehidratación activa. En la rehidratación activa se aplica un campo eléctrico de manera de facilitar el ingreso de moléculas de alta masa molecular a la misma por la acción de bajos voltajes. La cantidad de muestra que es cargada depende directamente del gradiente que se utilice, de la longitud de la tira de IPG, e incluso de la complejidad que presente la muestra de estudio. Cuanto más estrecho sea el gradiente y mayor sea la longitud de la tira IPG, mayor resolución tendrá el gel obtenido, pudiéndose identificar así un mayor número de proteínas. Concluida la rehidratación, se procede a realizar la **primera dimensión o isoelectroenfoque (IEF)**. Aquí la separación de proteínas se realiza de acuerdo a su punto isoeléctrico. Las proteínas son moléculas anfotéricas (molécula que tiene cargas positivas y negativas al mismo tiempo) que pueden tener carga neta positiva, negativa o neutra de acuerdo al pH del medio en el que se encuentran. En un gradiente de pH y bajo la influencia de un campo eléctrico estas proteínas migrarán hasta encontrar la posición en el gradiente donde carezcan de carga, es decir su punto isoeléctrico ($\text{pH} = \text{pI}$). La carga neta de la proteína es la suma de todas las cargas positivas y negativas de los aminoácidos que la componen, de manera que tendrán como comportamiento general una carga negativa a pH mayores que su punto isoeléctrico, y una carga positiva a pH menores a su punto

isoeléctrico. De esta manera, las proteínas con carga neta positiva migraran hacia el cátodo (polo negativo) y las proteínas con carga neta negativa lo harán hacia el ánodo (polo positivo).

El siguiente paso es la **equilibración**. Esta es fundamental esencialmente implica saturar la muestra en SDS para garantizar una buena transferencia de las proteínas desde la tira hasta la segunda dimensión. Se realiza en dos etapas, una primera etapa con DTT para reducir los puentes disulfuro, y una segunda etapa con iodo-acetamida para alquilar los grupos sulfhidrilo (-SH) antes reducidos y lograr así una protección contra la re-oxidación.

Culminada esta etapa continúa la **segunda dimensión o SDS-PAGE**, la cual se realizará en sistemas chicos o grandes según la muestra con que se esté trabajando. En esta segunda dimensión de la técnica, las proteínas son separadas según su masa molecular, realizándose una electroforesis en gel de poliacrilamida. Los geles de poliacrilamida se forman por la polimerización de la acrilamida por acción de un agente entre cruzador ("cross-linking"), la bis-acrilamida y en presencia de un iniciador y un catalizador. Como iniciador se suele utilizar TEMED (N,N,N,N'- tetra-metil-enediamina) y como catalizador el ión persulfato ($S_2O_8^{2-}$), el cual se añade en forma de persulfato de amonio. La polimerización se da en presencia de un detergente aniónico muy potente, el dodecil sulfato de sodio (SDS). Este forma micelas globulares y acompleja a las proteínas, de esta forma la carga eléctrica intrínseca de las proteínas de la muestra pierde relevancia, ya que el mismo enmascara dicha carga dejando a las proteínas con una carga neta negativa por unidad de masa. A la hora de preparar el gel para la separación de las proteínas, es importante tomar en cuenta los diferentes rangos de masas proteicas que se desea separar de manera de poder determinar la concentración adecuada de acrilamida que se utilizará. La movilidad de las proteínas en el gel, se encuentra restringida por el tamaño del poro, el cual depende a su vez de la concentración de monómeros en el gel. Así, por ejemplo, geles con un tamaño de poro menor (porcentajes mayores de acrilamida) serán útiles para la separación de proteínas y péptidos pequeños.

La corrida electroforética es llevada a cabo en presencia de un buffer el cual permite la separación de proteínas a altos valores de pH, lo cual confiere la ventaja de una

agregación proteica mínima, permitiendo así una clara separación de las proteínas de la muestra (GE- 2DE Handbook, 2005).

Por último para visualizar los resultados en el gel luego de la **fijación** de las proteínas, se puede aplicar cualquiera de los métodos tradicionales de **tinción**, de manera de alterar mínimamente su análisis posterior y teniendo en cuenta la sensibilidad que presenta cada uno, la reproducibilidad, toxicidad, precio y si el interés es cuantificar además se debe tener en cuenta el rango lineal dinámico. Las más utilizadas son las tinciones con Coomassie o nitrato de plata.

La tinción con azul de Coomassie representa un método sencillo y barato además de ser compatible con la espectrometría de masas. Hay dos tipos de Coomassie, el R250 y el G250 o Coomassie coloidal. La tinción con azul de Coomassie es considerada un método de baja sensibilidad, en particular el R250 detecta de 100 ng a 500 ng por spot, y el Coomassie coloidal de 10 ng a 50 ng. Tienen un rango dinámico lineal bastante bajo (10^2). A diferencia de la tinción con Coomassie, el método basado en el uso del Nitrato de plata presenta una alta sensibilidad (1-5 ng por spot) pero una baja linealidad (menor de 10^2) (102). Además no siempre es compatible con la espectrometría de masa, siendo fundamental la sustitución de glutaraldehído por formalaldehído. Su protocolo es más complejo, tiñendo además ADN y polisacáridos, lo que provoca una visualización menos clara del gel si la muestra no se encuentra totalmente purificada.

Debido a que las modificaciones post-traduccionales son capaces de provocar cambios en la movilidad electroforética a partir de cambios en el punto isoeléctrico (por ejemplo fosforilaciones y oxidaciones), o cambios en el tamaño molecular (como las glicosilaciones y alquilaciones) o ambos, y que esto resulta en modificaciones observables en los patrones de manchas o “spots” obtenidos en el gel bi-dimensional, esta herramienta resulta muy útil para una primera aproximación en la identificación de posibles modificaciones.

Espectrometría de masa

La espectrometría de masa es una técnica analítica que permite la determinación de la masa molecular. Esta técnica mide la relación masa/carga (m/z) de iones moleculares en fase gaseosa generados a partir de moléculas neutras (ionización y vaporización). La

espectrometría de masa determina la masa molecular con mejor exactitud, precisión y sensibilidad que cualquier otra técnica.

La espectrometría de masa (MS) se utiliza para el análisis y reconocimiento masivo de proteínas, permitiendo la resolución de muestras biológicas complejas. Es aplicable a diferentes tipos de muestras y posee un gran potencial analítico. Proporciona un alto grado de especificidad y sensibilidad.

Los tres procesos fundamentales en un análisis por espectrometría de masa son: 1. generación de iones en fase gaseosa; 2. análisis según su relación m/z , y 3. detección. Estos tres procesos ocurren en diferentes partes del espectrómetro de masa, denominados fuente de iones, analizador y detector, respectivamente (Hoffmann, E. 2005). Al final de estos procesos, lo que se obtiene como resultado es un espectro de masa, es decir una representación gráfica de la relación masa carga versus la intensidad de la señal.

Los iones producidos son característicos de un determinado compuesto químico de forma que a través del análisis de su espectro de masa se puede realizar su identificación y caracterización. Habitualmente, la identificación de proteínas por espectrometría de masa depende del análisis de sus mapas peptídicos realizado por digestión de la proteína con una proteasa específica ("peptide mass fingerprint" o huella digital peptídica) y de la comparación *in silico* de los datos así obtenidos con bases de datos de secuencias proteicas. Esto es debido a que la medida de una única masa molecular de la proteína sin digerir se obtiene con mucho error experimental y en el mejor de los casos, únicamente nos aporta un dato. Y esto es insuficiente para identificar una proteína del conjunto de proteínas presentes en muestras biológicas. Sin embargo, a través de la realización de un mapeo peptídico podemos obtener entre 10 y 100 datos y cada uno de ellos con un error experimental mucho menor (con respecto a la medida de la proteína sin digerir). Más aún, a través de la realización de experimentos de MS/MS, podemos obtener entre 1000 y 10000 datos de una determinada proteína, aumentando mucho la confiabilidad de la identificación por comparación de datos experimentales con datos teóricos generados *in silico*:

Tabla I. Masa molecular de proteínas y péptidos y su contenido informativo	
Masa molecular intacta	1 único dato
Mapa peptídico	10 – 100 datos
MS/MS	≥ 1000 datos

Por lo tanto, las proteínas de interés son habitualmente digeridas para generar una huella peptídica (o lista de masas de los péptidos específicamente generados por una proteasa determinada) resultante de dicha digestión proteolítica, pudiéndose utilizar diferentes compuestos o enzimas específicas. En particular es muy utilizada la proteólisis con tripsina la cual provoca una proteólisis específica, ya que corta las proteínas del lado carboxilo terminal de los residuos de lisina o arginina, a menos que éstos estén seguidos de un residuo de prolina en la dirección C-terminal. Seguido de esto, se continúa con el tratamiento de la muestra previo a la introducción de esta al espectrómetro de masa.

Con respecto a la ionización de la muestra, la fuente a utilizar dependerá de la naturaleza de la muestra y de la información que se quiera obtener. En la ionización tipo MALDI, la matriz se encuentra en exceso con respecto a los analitos y se mezcla con la muestra de interés de manera que co-cristalizan en una placa metálica, la cual se coloca en el espectrómetro de masa. Por lo tanto, la muestra de partida es una muestra sólida heterogénea de analitos y moléculas de matriz y no una solución. Esta mezcla es irradiada por un láser con una longitud de onda determinada. La matriz está constituida por compuestos insaturados tales como el ácido sinapínico, el ácido 2,5 dihidroxibenzoico (DHB) y el ácido alfa ciano 4-hidroxicinámico (CHCA), todas moléculas que tienen la capacidad de absorber la energía a la longitud de onda del láser. Cuando el laser es disparado, los fotones del haz absorbidos por la matriz alcanzan un estado electrónicamente excitado. Esta energía en exceso es transferida a los péptidos o proteínas en la muestra, es decir que la matriz absorbe la mayor parte de la energía suministrada y facilita la ionización del compuesto que se desea analizar. El péptido adquiere de esta manera una carga positiva o negativa por la adición o la

eliminación respectiva de protones. En el caso particular de estar utilizando como método de ionización MALDI, los iones son fundamentalmente de carga +1.

Los iones en fase gaseosa son ahora analizados en el analizador de masa. Existen diferentes tipos de analizadores. La elección del analizador también se realiza de acuerdo a la información que se desee obtener. Los distintos tipos de analizador varían según el intervalo y exactitud de las masas que separa, su sensibilidad y su grado de resolución.

La resolución es un parámetro que nos permite inferir el grado de resolución con que se están midiendo nuestras moléculas:

$$R = m/\Delta m$$

donde **m** es la masa y **Δm** es la diferencia de masa. El grado de resolución de un espectrómetro de masa se suele determinar de acuerdo al concepto de FWHM (full width, half maximum), tal que **m** es la masa de la altura máxima del pico y **Δm** es la diferencia de masa al 50% de la altura máxima de dicho:

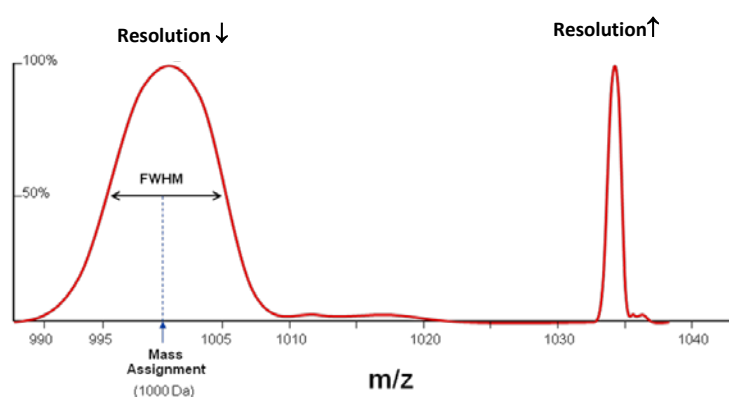


Figura 3. Ejemplo de cómo se determina la resolución en espectrometría de masa.

Entre los analizadores de masas encontramos el TOF (“Time of Flight”: tiempo de vuelo). Los analizadores TOF miden el tiempo que le toma a los iones desplazarse desde el principio hasta el final del analizador en una región de alto vacío, sin rozamiento, hasta ser registrados por el detector. El analizador de tiempo de vuelo es un tubo (de 1 a 4 metros) donde entran los iones generados por el láser siguiendo una trayectoria lineal. En estas condiciones todos los iones que entran en el tubo tienen la

misma energía cinética. La relación m/z de un ión es proporcional al cuadrado del tiempo de vuelo, algebraicamente esto se representa:

$$m/z = 2 \cdot t^2 \cdot K/L^2$$

donde **m** es la masa, **z** la carga del ión, **t** el tiempo de vuelo, **K** la energía cinética de la partícula en movimiento y **L** la distancia que deberá recorrer dicha partícula(distancia de vuelo). Debido a que todos los iones que ingresan al tubo tienen idealmente la misma energía cinética, sus velocidades dentro de éste serán inversamente proporcionales a sus masas. De ésta forma, cuanto menor es la relación m/z de los iones, menor es el tiempo necesario para recorrer el tubo en toda su longitud llegando antes al detector. La masa aproximada de los iones se determina usando la ecuación antes descrita, pero la exactitud de la medida se mejora en gran medida a través de realizar una curva de calibración con moléculas de relación m/z conocida. El analizador TOF es considerado un analizador de gran resolución y buena exactitud de medida para péptidos y moléculas relacionadas.

En la naturaleza, casi todos los elementos, están formados por mezclas de diferentes isótopos. Por ejemplo, la abundancia relativa de Carbono (C) en la naturaleza es: ^{12}C 98.9% y ^{13}C 1.1%. Este hecho reviste una gran importancia ya que todos los compuestos serán mezclas de diversas composiciones isotópicas, no solo del C sino también de los otros elementos.

Tabla II. Abundancia relativa de los isótopos de los elementos más representados en las moléculas biológicas		
Elemento	Masa (Da.)	Abundancia (%)
H	1.0078	99.985
	2.0141	0.015
C	12.0000	98.89
	13.0034	1.11
N	14.0031	99.64
	15.0001	0.36
O	15.9949	99.76
	16.9991	0.04
	17.9992	0.20

Debido a la alta resolución de los espectrómetros de masa modernos y a la existencia en la naturaleza de diversas especies isotópicas, es que para una molécula determinada (por ej. péptido Angiotensina I, fig. 4) el espectrómetro de masa no

detectará un solo pico molecular, sino varios, que corresponderán a las diversas composiciones isotópicas del ion molecular (fig. 4).

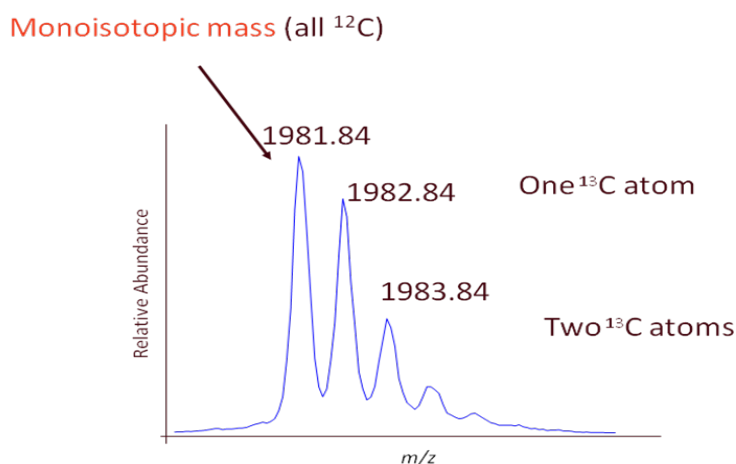


Figura 4. Molécula de 94 átomos de C. Cuando una molécula es medida con resolución isotópica, entonces se recomienda utilizar la masa monoisotópica como el valor de masa molecular.

Se define la masa monoisotópica (M_{mo}) como la suma de las masas exactas de los isótopos más abundantes de cada elemento presente en la naturaleza, en general esta se denomina masa molecular, y corresponde al primer pico de la distribución isotópica: Todos los demás picos corresponden a poblaciones heterogéneas de iones que contienen combinaciones de isótopos sucesivamente más pesados. En contraposición a este concepto se encuentra el de masa promedio, la cual se define como la suma promedio de las masas de todos los isótopos de todos los elementos constituyentes. El espectrómetro de masas permite determinar las masas monoisotópicas o las masas promedio, según la resolución del equipo y para la molécula en cuestión. Debe tenerse en cuenta que ambos tipos de medida siempre incluirán la masa del protón (MH^+_{mo} o $MH^+_{promedio}$).

Otros parámetros importantes en espectrometría de masa antes mencionados, son la precisión y la exactitud. La precisión de la medida es un indicador del error máximo estimado para la medida y determina el grado de dispersión de los datos respecto al valor promedio. Por otro lado, la exactitud es una estimación de la cercanía entre el

valor real y el valor medido. En espectrometría de masa representa la proximidad del valor de m/z registrado experimentalmente ($M_{\text{observada}}$) a su valor calculado de manera teórica ($M_{\text{calculada}}$). La exactitud de una medición de masa se expresa mediante el error relativo, frecuentemente en partes por millón (ppm):

$$\text{Exactitud} = \frac{m/z_{\text{calculada}} - m/z_{\text{observada}}}{m/z_{\text{calculada}}} \times 10^6$$

Luego de la ionización, los detectores convierten el flujo de iones en una señal eléctrica que puede ser amplificada y almacenada. Esto permite obtener un espectro de masas en el que se representa la abundancia relativa de los iones y fragmentos separados respecto a la relación m/z . El pico del espectro con valor más elevado de m/z de un espectro MS corresponde a la molécula ionizada sin fragmentar y normalmente las intensidades de los demás picos se expresan en porcentajes relativos a la intensidad del pico base.

En el caso de la identificación de compuestos en mezclas muy complejas, es necesario utilizar una estrategia más ya que frente a una mezcla de péptidos se obtendrían fragmentos de todos estos y sería imposible interpretar el espectro obtenido. Es necesario entonces lograr el aislamiento de un péptido determinado para el análisis individual de su secuencia. Esto es posible mediante la espectrometría de masas en tándem o MS/MS, la cual logra un aumento en el nivel de la información a partir del acople de dos analizadores de características similares o diferentes aprovechando así las ventajas de cada uno de ellos. Al introducir la mezcla de péptidos en la fuente de ionización, se produce la ionización de los mismos y al ingresar en el primer analizador es posible la selección de uno de ellos. Es decir que el primer analizador selecciona un ión determinado con una relación m/z determinada entre los iones producidos por el sistema de ionización y que llegan al mismo. Dicho ión se denomina ión precursor. El mismo se introduce en una cámara de colisión en presencia de un gas. Los iones moleculares son acelerados por un potencial eléctrico hasta obtener una energía cinética alta de tal manera que colisionan con las moléculas del gas. En la colisión parte de la energía cinética se transforma en energía interna y se fragmenta el ión precursor

en pequeños fragmentos neutros y otros iones, denominados iones producto los cuales entran en el segundo analizador de masas obteniéndose el respectivo espectro de masas. Finalizado este proceso para un péptido, el mismo proceso se repite para el siguiente péptido de manera rápida y automática permitiendo la obtención de espectros para varios péptidos presentes en una determinada muestra.

Luego de la aplicación de ambas técnicas y con el fin de facilitar el estudio e interpretación de los resultados obtenidos, los mismos son analizados mediante la utilización de diferentes tipos de software que permiten un análisis rápido y confiable.

1.3 Información referida a las líneas celulares

En nuestro trabajo de finalización de carrera utilizamos la línea tumoral de cáncer de mama metastásico humano MCF-7 (HTB-22 -ATCC). Esta línea es positiva para receptores hormonales (RRHH+) pero negativa para el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2-). Históricamente esta línea fue aislada a partir de una efusión pleural de una mujer caucásica de 69 años de edad con cáncer de mama metastásico (Levenson & Jordan, 1997). Estas células son ampliamente utilizadas como modelo de cáncer de mama ductal, ya que presentan características similares al de las células del lumen de los ductos mamarios (Chou & Chan, 2003). Son líneas de crecimiento lento pudiéndose producir crecimiento en acúmulos y viabilidad en flotación. También cabe destacar que su grado de invasión es leve por lo cual si bien es metastásica, pueden ser considerados otros modelos si el objetivo del estudio requiere de dicha característica.

Por otra parte, como modelo de un estado basal del epitelio de mama, utilizamos la línea epitelial no tumoral MCF-10 (A-ATCC). Esta línea celular es negativa para receptores hormonales (RRHH-) así como para el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2-) y expresa marcadores comúnmente asociados con el fenotipo basal del tejido epitelial (Debnath, J., 2003). Esta línea fue obtenida a partir de una mastectomía en una mujer pre-menopáusica de 36 años de edad, con enfermedad fibro-quística. La misma inicialmente mortal en un cultivo a largo plazo con bajas concentraciones de calcio, espontáneamente dio origen a dos líneas inmortales MCF-10 A (células adherentes) y MCF10 F (células flotantes). Estudios previos de microscopía electrónica demuestran que MCF-10 A presenta claras

características de células epiteliales pertenecientes al lumen de los conductos mamarios y no de células mio-epiteliales o células pertenecientes a los lóbulos (Tait L., 1990). Además estas células poseen numerosos rasgos típicos del epitelio normal de la mama, como por ejemplo la falta de tumorigenicidad, determinada en estudios previos con ratones y dependencia de factores de crecimiento/hormonas para su proliferación y supervivencia (Debnath J., 2003).

La directa comparación del tejido maligno con tejido normal representaría el método teórico más adecuado para la obtención de proteínas que reflejen realmente las diferencias entre ambas situaciones. Sin embargo la directa comparación de muestra clínicas también incrementa el número de falsos positivos, debido a que la heterogeneidad presente en cada muestra es capaz de interferir con la identificación.

Por esta razón, los modelos celulares como los utilizados en este trabajo, entre otros, son reconocidos como fuentes más informativas en los estudios proteómicos referidos a esta patología (Chou & Chan, 2003).

1.4 Senescencia Replicativa

La senescencia corresponde a un estado de detención permanente del ciclo celular que, aunque es el resultado de extinción de la capacidad de las células diploides normales *in vivo* e *in vitro*, no interfiere con su viabilidad ni con su actividad metabólica (Chuaire-noack, 2010) (O. Hensler P.J et Pereira-Smith, 1995). Este mecanismo ha sido asociado bajo determinadas circunstancias con la transformación maligna (Chuaire-noack, et al., 2010).

Eventos como el acortamiento telomérico, el daño del ADN, la activación de oncogenes, el estrés oxidativo y la privación de nutrientes y/o de factores de crecimiento entre otros, han sido reportados como desencadenantes de la senescencia celular (Ben-Porath & Weinberg, 2005), lo que reviste particular importancia si se la considera como factor de riesgo en el proceso de transformación tumoral.

Se ha demostrado que cuando una célula escapa del estado senescente y se immortaliza, se transforma en una célula maligna (W.M.Elliott, 1993) (Shay & Wright, 2005). ***Además, hallazgos previos de acúmulos de células senescentes adyacentes a lesiones pre-malignas, que exhiben una morfología normal y carecen de capacidad invasiva, han hecho de la senescencia un atractivo marcador de pre-malignidad***

(Collado & Serrano, 2013). Por otra parte, se ha asociado el estado senescente y su inicio a la transición epitelio-mesenquimal descrita como un factor de riesgo de cáncer en el epitelio superficial ovárico (Chuaire-noack, 2010).

Morfológicamente las células senescentes presentan cambios característicos, como un gran aumento de tamaño y adquisición de una forma aplanada, en general multinucleadas y con una elevada granularidad debido al aumento de lisosomas. Una enzima cuya expresión ha sido clásicamente considerada como marcador de senescencia replicativa es la beta-galactosidasa, y el estudio de su actividad a pH 6 revela importante información de este proceso. A este pH la expresión de esta enzima lisosómica se encuentra aumentada en las células envejecidas, lo cual se relaciona con el aumento del número de lisosomas característico de este estado. El aumento de estos organelos se relaciona a su vez con la necesidad creciente por parte de la célula de cortar residuos β -D-galactosa de glicoproteínas y esfingolípidos, que se acumulan como resultado del proceso de envejecimiento celular (Bronstein, et al. 1994).

2. Objetivo

El objetivo de este trabajo fue realizar la caracterización proteómica diferencial de una línea celular de cáncer de mama metastásico (MCF-7) positiva para receptores de estrógeno y progesterona, y negativa para el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) y la de su homóloga no maligna (MCF-10A). Los proteomas de las células control y tumoral se estudiaron por una estrategia de electroforesis bidimensional acoplada a espectrometría de masa.

3. Materiales y métodos

3.1. Cultivo Celular

Para el cultivo y crecimiento de las diferentes líneas celulares se utilizaron los medios recomendados por la “American Type Culture Collection” (ATCC). En particular, la línea MCF-7 (HTB-22 -ATCC) fue cultivada en el medio EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium (ATCC® 30-2003™) que contiene cantidades necesarias de aminoácidos no esenciales, 2mM de L-Glutamina, 1mM de piruvato de sodio y 1500mg/L de bicarbonato de sodio. Este medio además es suplementado con insulina al 0.01% y con suero fetal

bovino (SFB 10%) de manera de favorecer la adhesión de las células a la caja de cultivo, y de una combinación de antibióticos (Estreptomicina- Penicilina) al 1%.

La línea MCF-10A (ATCC), fue cultivada en el medio MEGM (Mammary Epithelial Cell Growth Medium) (Lonza), el mismo contiene los siguientes suplementos para el crecimiento libre de suero: extracto pituitario bovino (BPE), 52 µg/ml; factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF), 10 ng/ml; hidrocortisona 0.5 µg/ml; insulina 5 µg/ml y antibióticos [gentamicina y anfotericina B (GA-1000)]. Además el medio es suplementado en nuestro laboratorio con un agregado de insulina (Insulina al 0,01 v/v) y de una combinación de otros antibióticos (Estreptomicina- Penicilina). Es importante destacar que este medio carece de la adición de Suero Bovino Fetal.

Con el fin de disminuir posibles factores de confusión en el estudio proteómico, ambas líneas también fueron cultivadas en un único medio. Inicialmente se cultivaron MCF-7 (HTB-22 –ATCC) y MCF-10 (A-ATCC) en el medio MEGM (medio recomendado para MCF-10 A, medio sin suero y con factores específicos agregados). En segundo lugar se cultivaron MCF-7 (HTB-22 –ATCC) y MCF-10 (A-ATCC) en el medio EMEM (medio recomendado para MCF-7 con adición de suero).

Durante el crecimiento de los cultivos celulares, los mismos fueron valorados diariamente tanto macroscópicamente como microscópicamente utilizando un microscopio de luz. Con el fin de preservar el material biológico utilizado, todos los procedimientos se realizaron en una cabina de flujo laminar en condiciones de esterilidad dentro del Cuarto de Cultivo. Los protocolos de cultivo, cambio de medio, pasaje de las líneas celulares fueron realizados mediante protocolos estándares, siendo tal vez el más específico el protocolo de pasaje de las líneas celulares. Cada línea fue cultivada en 2 cajas de 75ml y en una caja de 25 ml. Las cajas de 75 ml se utilizaron en cada pasaje estudiado para los análisis de proteómica, y la caja de 25 ml aseguraba la continuidad de la línea con el fin de obtener las réplicas biológicas de cada cultivo y de formar una crioteca. Los cultivos se dejaron en condiciones estables en estufa de CO₂ (3-5%). Los cambios de medio se realizaron cada cuatro días con el fin de renovar los nutrientes necesarios para el crecimiento, disponiendo previamente el medio a baño maría antes de ser utilizado debido a la sensibilidad de las células de estudio a las variaciones de temperatura. En cada oportunidad se realizó un lavado del cultivo con 1ml de buffer fosfato salino (PBS) estéril (previo al agregado del nuevo

volumen de medio) también termostatzado con anterioridad en baño maría, con el fin de eliminar además del medio consumido, “debris” celulares. El PBS consiste en una solución de agua y sales que contiene Cloruro de Sodio (NaCl), Fosfato de Sodio (Na_2HPO_4), Cloruro de Potasio (KCl) y Dihidrógeno Fosfato de Potasio (KH_2PO_4). Las condiciones de osmolaridad y concentración de iones en la solución son similares a las encontradas en el cuerpo humano (isotónicas), lo que permite el reiterado uso de este buffer en los cultivos. Las líneas fueron repicadas según lo recomendado por la ATCC. Para este procedimiento, el contenido de la caja de interés fue despojado del medio antiguo y el cultivo fue lavado con 1 ml de PBS. El cultivo fue levantado de la caja mediante el uso de 1 ml de Tripsina, ya que el uso de “scrapers” o rastrillos no es recomendado para estas líneas celulares. Posteriormente, la caja fue depositada en la estufa de cultivo durante 5 minutos. Por último, el volumen obtenido de la caja fue mezclado con medio fresco (el correspondiente en cada caso) y se procedió a la centrifugación del mismo durante 5 minutos a 2.000 rpm para el caso de la línea MCF-7 (HTB-22 -ATCC) y durante 7-9 minutos a 1400 rpm para el caso de la línea MCF-10 (A-ATCC). Se descartó el sobrenadante y se cultivó el “pellet” resuspendido en medio. Para los casos en que además de realizar el pasaje celular también fué necesario generar una fracción para congelar, las mismas se depositaron en criotubos estériles y estos se almacenaron en el freezer a -80°C , pasando al menos 24 horas en recipiente con isopropanol de manera de evitar el congelamiento rápido. La solución de congelamiento se compone del medio de cultivo indicado para cada línea (EMEM para la línea MCF-7 y EMGM para la línea MCF-10A), más un 10% de dimetil sulfóxido (DMSO), y en particular en el caso de de la Línea MCF-7 se agrega un 90% de SFB. Se registró según planilla de la crioteca, el criotubo ingresado o utilizado para nuevos cultivos. En general para los análisis proteómicos se espero hasta obtener un 80% de confluencia en el crecimiento.

a) Preparados para Microscopía de epifluorescencia y microscopio confocal.

Para la realización de los preparados se cultivó ambas líneas en placas de 6 pocillos, sobre cubreobjetos esterilizados previamente.

b) Ensayos de β -galactosidasa (senescencia replicativa)

Para los ensayos de senescencia replicativa se cultivó la línea MCF-10 (A-ATCC) en el medio EMEM, en placas de 6 pocillos. El ensayo se realizó por triplicado teniendo en

cuenta dos porcentajes de confluencia diferentes. En la primera oportunidad un 70% de confluencia y luego un 50% de confluencia.

3.2. Preparación de lisados celulares

Los cultivos celulares destinados al análisis proteómico (80% de confluencia) se lavaron con PBS 1x 3 veces de manera consecutiva. Luego se procedió a realizar la lisis de los mismos, para lo cual se agrega 1 ml de Buffer de lisis a cada caja de cultivo de 75 ml. El Buffer de lisis se compone de una solución de Urea 7M, Tiourea 2M (ambos agentes caotrópicos capaces de solubilizar y desnaturalizar las proteínas), y CHAPS al 4% (un detergente zwitteriónico capaz de romper las interacciones proteicas no específicas y preservar la forma nativa de éstas); Ditiotreitól (DTT, 18-20 mM; agente reductor que rompe los puentes disulfuro); ARNasa (dilución 1/1000 solución comercial stock); ADNasa (dilución 1/1000 solución comercial stock) e inhibidor de proteasas (dilución 1/10 solución comercial stock).

Los lisados se sometieron a ciclos de congelado y descongelado rápido a -20°C y posteriormente en un baño de hielo se sonicaron durante 30 segundos con ciclos de 10 segundos e intervalos de 1 segundo, primero utilizando una amplitud del 10% y luego del 15% (la intensidad en el sonicado aumenta con una mayor amplitud y disminuye con el aumento de la temperatura).

Por último, los lisados fueron centrifugados a 15.000 g y 4°C durante 15 minutos. El sobrenadante fue retirado, alicuotado y almacenado a -20°C hasta el otro día de forma de continuar con su procesamiento, o a -80°C hasta su posterior utilización.

3.3 Protocolos para Microscopía de fluorescencia.

Se aplicaron inicialmente dos protocolos diferentes para la obtención de los preparados a modo de prueba, de manera de poder decidir luego cual implicaba la mejor opción. Los mismos diferían en el detergente utilizado para permeabilizar los cultivos celulares. Cada muestra se trató por triplicado con ambos protocolos

Se utilizaron dos fluoróforos, por un lado se realizó una tinción con 4', 6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Invitrogen), el cual forma complejo con el ADNdc uniéndose a regiones ricas en bases A-T, y puede pasar a través de la membrana celular por lo que es posible su utilización para marcar tanto células vivas como fijadas de manera de

evidenciar el núcleo celular. También se realizó una tinción con Alexa Flúor 488 Faloidina. En este conjugado, la faloidina se une a la actina con alta selectividad, mientras que Alexa Flúor 488 es quien proporciona la fluorescencia. De esta forma se pone en evidencia el citoesqueleto celular, en particular el estado de polimerización de los filamentos de actina.

Inicialmente y con el objetivo de lograr la fijación de las células cultivadas y la consecuente preservación de la estructura celular, se realizaron tres lavados del cultivo con PBS 1x y se expuso el cultivo a paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS 1x durante 20-30 minutos a temperatura ambiente. El PFA es un polímero del formaldehído que forma puentes entre los aminos de las proteínas. Si bien los protocolos de fijación difieren dependiendo de la naturaleza de las células, de los tejidos a procesar y también del objeto de marcaje, se optó por su utilización debido a su alto poder de preservación y capacidad de rápida penetración en la célula. Además genera menores niveles de auto-fluorescencia (o “ruido”) a determinadas longitudes de onda de excitación.

Debido a que en este paso se utilizó PFA, fue necesario realizar un paso posterior de permeabilización para garantizar el pasaje de ambos fluoróforos al interior celular. Luego de tres lavados consecutivos con PBS 1x se comenzó con los protocolos diferenciales y los respectivos pasos de permeabilización celular, bloqueo e incubación con los fluoróforos seleccionados (la permeabilización se realiza para facilitar el acceso de los fluoróforos al interior de las células).

1er. Protocolo. En este caso se realizaron los pasos de permeabilización y bloqueo simultáneamente, utilizándose Saponina como el detergente de elección para permeabilizar las membranas celulares (permeabilizante suave). Para ello, a cada muestra se le agregó 1ml de PBS 1x, Saponina 0.1% en PBS como permeabilizante y gelatina de piel de pescado (FSG) 0.7% en PBS como agente bloqueante y con el fin de evitar interacciones inespecíficas. Esta solución conforma el Buffer de bloqueo y permeabilización. Los cubre se dejaron en reposo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego, a cada muestra se le agregaron 300µl del buffer de bloqueo y permeabilización en conjunto con los fluoróforos. Para el caso del DAPI, la concentración final utilizada (300 nM), fue la recomendada según el fabricante

(Invitrogen). En el caso de la Faloidina, se utilizó una dilución 1/50 de la solución stock (también según lo recomendado).

La incubación fue llevada a cabo durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Por último, se realizaron 3 lavados con PBS 1x y el cubre fue montado en un portaobjetos con el previo agregado de una gota de Prolong (Life technologies) con el fin de evitar mínimamente el foto-blanqueamiento de los fluoróforos en la muestra.

2do Protocolo. En este caso se utilizó Tritón, detergente no-iónico que sirve para solubilizar proteínas de membrana en su estado nativo como el detergente de elección para permeabilizar las membranas celulares. Se agregó a cada muestra 1ml de Tritón al 0.1% en PBS y se incubó durante 15 minutos a 37° C. Se realizaron 3 lavados con PBS y se agregó a cada muestra 1 ml de PBS 1x y FSG 0.7% en PBS como agente bloqueante. Se incubó durante 1 hora a 37° C. Finalizada la incubación, a cada muestra se le agregó 300µl de PBS en conjunto con los fluoróforos. Las concentraciones finales utilizadas para ambos fueron idénticas a las expresadas en el 1er protocolo. La incubación fue llevada a cabo durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Por último, se realizaron 3 lavados con PBS y el cubre fue montado en un portaobjetos con el previo agregado de una gota de Prolong (Life technologies). Todas las muestras fueron observadas mediante el Microscopio de fluorescencia confocal perteneciente al Institut Pasteur de Montevideo.

3.4 Ensayos de β -galactosidasa

El protocolo utilizado en este ensayo fue una modificación del protocolo utilizado por (Dimri et al., 1995).

El ensayo fue realizado para la muestra de estudio por triplicado en dos instancias diferentes. Para ello, los cultivos en placas de 6 pocillos con las células MCF-10 A en EMEM fueron lavados 3 veces con PBS y posteriormente las células fueron fijadas con una solución de Glutaraldehído al 50% y Formaldehído 37% en PBS. Se incubó durante 3 a 5 minutos a temperatura ambiente y posteriormente las células fueron lavadas con PBS en tres ocasiones consecutivas. Finalmente, se tiñeron con una solución formada por un buffer citrato/fosfato de sodio 40 mM, pH6 con Ferricianuro de Potasio 5mM, $MgCl_2$ 2mM; NaCl 150 mM y el sustrato de X-gal 1mg/ml en DMSO. Se incubó con esta solución de tinte durante 16 horas a 37°C en oscuridad y sin utilizar

incubador de CO₂. Como control negativo se utilizaron diferentes pasajes de la línea MCF-10 A cultivadas en el medio recomendado (EMGM). La visualización de los resultados se realizó a través de un microscopio de luz invertido acondicionado con una cámara fotográfica. Si bien es posible realizar la cuantificación de la actividad de la enzima β -galactosidasa asociada a la senescencia mediante técnicas por ejemplo de luminiscencia en este ensayo se buscó simplemente evidenciar al microscopio la presencia de células senescentes en el cultivo.

3.5 Electroforesis bidimensional (2DE)

Ambas líneas celulares fueron analizadas realizando las correspondientes copias técnicas y obteniéndose los triplicados biológicos para cada condición. Mientras que las copias técnicas se realizan con el fin de poner ésta a prueba, tal que deben ser realizadas en las mismas condiciones y en el mismo momento y tienen el fin de disminuir el error sistemático asociado a la variabilidad de la misma, las copias biológicas son de gran relevancia debido a que éstas ponen a prueba a la muestra. Es decir, las copias biológicas permiten constatar que las observaciones realizadas no sean el resultado de un hecho fortuito relacionado a la posible variabilidad del comportamiento de la muestra de estudio, disminuyendo de esta forma el error aleatorio. De esta manera, se obtuvieron 12 geles de 2DE.

a) Cuantificación de las muestras

Las proteínas a analizar fueron cuantificadas utilizando dos metodologías:

A. Inicialmente se cuantificó utilizando el kit comercial 2D-Quant Kit (GE Healthcare).

B. Con el fin de realizar una cuantificación confirmatoria, se realizó una cuantificación “in-gel” en base a los μ g cargados del marcador de peso molecular (MPM). Para la realización de gel se siguió el protocolo recomendado por Amersham Bioscience (1999). Inicialmente, las muestras se mezclaron con el Buffer de carga [Tris-HCl 125 mM pH6.8, Sodio dodecil sulfato (SDS) 4% (detergente aniónico que rodea a las proteínas de una superficie miscelar con carga negativa y de manera que su movimiento relativo a través del gel electroforético sea únicamente determinado por su masa molecular), Glicerol 20%, β -mercapto-etanol 0,05% y Azul de Bromofenol 0,002%]. Luego fueron incubadas durante menos de 10 minutos a 90°C y finalmente

cargadas en el gel. Se utilizaron geles separadores preparados al 12.5% y geles concentradores al 4% de acrilamida, utilizando peines de 0.75 mm de espesor y separadores de 0.75 mm; usando una cuba "Hoefer SE 260" (GE Healthcare). Como marcador de peso molecular se utilizó el "Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis" (GE Healthcare). Se agregó el volumen necesario de Buffer de corrida compuesto por Tris-HCL 0.025M, glicina 0.192 M y SDS 0.1%. La corrida transcurrió a 10 mA por gel hasta que el frente de corrida ingresó al gel separador y luego a 20 mA por gel hasta la finalización de la misma. Para la fijación de las proteínas en el gel se utilizó una solución 50% Etanol, 10% ácido acético, en la cual los geles fueron sumergidos y puestos en agitación durante 30 minutos. Para la tinción de los mismos se utilizó una solución de 80% de Coomassie coloidal y 20% de Etanol en la cual los geles fueron dejados en agitación durante toda la noche. Utilizando un escáner de geles y el software LabScan 5.0 (GE Healthcare) fue posible la adquisición de las imágenes del gel de interés. Por medio de densitometría y utilizando el software Image Quant TL versión v2005 (Amersham Biosciences) se obtuvieron las concentraciones estimadas de las muestras problema.

b) Purificación de la muestra.

Los lisados celulares pertenecientes a cada línea celular y a cada condición fueron purificados utilizando el kit comercial "2D-CleanUp" kit (GE Healthcare) y de acuerdo a las instrucciones descritas en el mismo.

c) Isoelectroenfoque (IEF) o 1ra dimensión.

La separación de proteínas por 2DE se realizó siguiendo los protocolos descritos por GE Healthcare (2004). Inicialmente se utilizaron tiras de 7 cm con un gradiente de pH 3-11 NL (IPGStrip; GE Healthcare) con el objetivo de tener un panorama global del proteoma de cada muestra. Se cargaron 60 µg de cada muestra para estas tiras, según lo recomendado en el manual. Las tiras se rehidrataron en 125 ml de buffer de rehidratación compuesto por urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 2% y azul de bromofenol 0.002%, suplementado con DTT (18 mM) y buffer de isoelectroenfoque (IPG buffer, GE Healthcare) (0.5%). El uso de detergentes no iónicos es fundamental debido a que los únicos iones en la muestra deben ser aportados por las proteínas. La rehidratación se realizó de forma pasiva durante 12 horas a temperatura ambiente.

El isoelectroenfoque se realizó en un equipo IPGPhor (GE Healthcare) aplicando el siguiente perfil de voltaje: 300 V durante 30 min, incremento lineal hasta 1000 V en 30 min, incremento lineal hasta 5000 V en 1 h 20 min y finalmente se aplicaron 5000 V durante el tiempo necesario para alcanzar un total 2.0 KWh. El isoelectroenfoque se realizó a un máximo de 50 μ A por tira y a 20°C. También se realizaron experimentos de 2D-PAGE de rango acotado utilizando tiras de 7 cm con un gradiente de pH 4-7. Para ello se cargaron 50 μ g de proteínas por rehidratación pasiva durante 12 horas a temperatura ambiente. El perfil de voltaje aplicado para ese gradiente fue de 300 V durante 30 min, incremento lineal hasta 1000 V en 30 min, incremento lineal hasta 5000 V en 1 h 30 min y finalmente se aplicaron 5000 V durante el tiempo necesario para alcanzar un total 2.0 KWh. El iso-electroenfoque se realizó a un máximo de 50 A por tira y a 20°C.

d) Corrida electroforética o 2da dimensión.

Las tiras fueron equilibradas en dos etapas en buffer de equilibración compuesto por urea 6 M, tris 75 mM, glicerol 29.3%, SDS 2%, azul de bromofenol 0,0002%. En un primer paso el buffer fue suplementado con DTT (10 mg/ml) y la tira fue dejada en agitación suave durante 15 minutos a temperatura ambiente. En el segundo paso, el buffer fue suplementado con iodoacetamida (IAA) (25 mg/ml) y también fue dejada en agitación durante 15 minutos. Se utilizaron geles al 12.5% de poliacrilamida, de 10 x 10 x 0.1 cm. Se utilizó como marcador de masa molecular el “Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis” (GE Healthcare). Para evitar que los marcadores de masa molecular difundan sin control por el gel, estos se cargan en un papel filtro de 0.5x0.5 de manera de poner 50% MPM y 50% de una solución de Agarosa (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1%, agarosa 0.5%, azul de bromofenol 0.002%). Las tiras se colocaron sobre geles junto con el MPM, tal que ambos fueron inmovilizados con una solución de agarosa y se utilizó una cuba “Hoefer SE 260” (GE Healthcare). Se agregó el volumen necesario de Buffer de corrida (Tris-HCL 0.025M, glicina 0.192 M y SDS 0.1%). La corrida electroforética transcurrió a 10 mA/gel durante 15 min y luego 20 mA/gel hasta la finalización de la corrida. Luego de la segunda dimensión para la fijación de las proteínas, los geles fueron sumergidos en una solución 50% Etanol, 10% ácido acético y puestos en agitación durante 30 minutos.

Para la tinción de los mismos se utilizó una solución de 80% de Coomassie coloidal y 20% de Etanol en la cual los geles fueron dejados en agitación durante toda la noche. Para minimizar la contaminación con queratinas humanas, todos los pasos de preparación de soluciones, ensamblado de geles, preparación de las muestras y tinción se llevaron a cabo en una cámara de flujo laminar (ESCO).

e) Análisis de datos.

Las imágenes de los geles se digitalizaron utilizando un escáner de geles (GE) y el software LabScan 5.0 (GE Healthcare).

A partir de la utilización de otro software [Melanie 6.0 (GeneBio, Swiss Institute of Bioinformatics)] fue posible el análisis comparativo de los geles obtenidos. Para esto en primer lugar es necesario marcar en el gel puntos de referencia generales de manera de poder lograr alinear ambos geles a ser comparados. En nuestro caso en particular, luego de la corrida electroforética y antes de la fijación, se realizan dos cortes en el gel de la 2da dimensión que corresponden a los extremos del gel de la 1ra dimensión. Es posible así a partir de estos cortes determinar en donde comienza y culmina el gradiente IPG utilizado en referencia al gel obtenido en la 2da. dimensión. Otras marcas utilizadas como referencias son las bandas correspondientes al peso molecular. De esta manera y mediante la utilización de herramientas del programa antes nombrado es posible un primer acercamiento a los valores de masa molecular y PI de cada "spot" presente en el gel. Alineando ambas imágenes a partir de las referencias utilizadas es posible inferir también si un spot está o no presente en uno y otro gel y cambios en sus niveles de densitometría.

3.6 Espectrometría de Masas

a) Digestión in gel y extracción de los péptidos

Los "spots" de interés en cada muestra fueron cortados en la cámara de flujo laminar. Como primer paso se procedió al desteñido de los "spots", para esto los mismos se incubaron durante 30 minutos con agitación en una solución de bicarbonato de amonio 0.2M pH 8 y acetonitrilo en una relación 1:1. Este paso se repitió dos veces.

Luego de finalizados ambos ciclos los geles fueron incubados 5-10 minutos con Acetonitrilo (ACN) en las mismas condiciones que anteriormente.

Pasado ese tiempo, comienza la digestión “in gel”. Los geles se dejaron secar y se procedió al agregado de la enzima Tripsina (Promega) en buffer bicarbonato de amonio 67mM, pH 8 y se incubó a 37° C durante toda la noche.

Para realizar la extracción de los péptidos, las muestras son incubadas durante 1 hora a 37°C bajo agitación continua y en dos instancias consecutivas con ACN 60% con Acido trifluoroacético (TFA) 0.1%. En cada etapa de extracción se recolecta el sobrenadante. Por último los sobrenadantes fueron concentrados por centrifugación bajo vacío (Speed Vac), de manera de evaporar el acetonitrilo de la muestra pero evitando su desecación. El volumen final esperado es de aproximadamente 20 µl. Inicialmente fueron sembrados 2 µl de muestra con 1 µl de la solución de matriz compuesta por ácido -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA, Sigma) en ACN 50%, 0.1% TFA.

En aquellas muestras que no se obtuvieron identificaciones estadísticamente significativas, las mismas fueron desaladas utilizando micro-columnas de fase reversa C18 (OMIX Pippete tips, Varian). Las columnas se activan con 20 µl de ACN 50%, y luego son equilibradas con 20 µl de TFA 0.1% (este paso es fundamental para que los péptidos se adhieran a la columna). La elución de los péptidos se realizó con 2.5 µl de la solución de matriz de CHCA y directamente sobre la placa de MALDI-TOF/TOF para el sembrado de muestras.

b) Análisis de las muestras

Los análisis por EM se llevaron a cabo en un equipo MALDI TOF/TOF 4800 Abi (Applied Biosystems). Para la identificación de proteínas por mapeo peptídico, los espectros de masa de las proteínas digeridas con una proteasa específica (por ej. tripsina) fueron medidos en modo reflector, positivo y usando CHCA como matriz. El software utilizado para la adquisición de los espectros fue el programa 4000 Series Explorer TM (Applied Biosystems). Las medidas fueron calibradas de forma externa usando una mezcla de péptidos estándares de masa molecular conocida (Applied Biosystems). Para los análisis se utilizó la masa molecular correspondiente a la masa monoisotópica de cada péptido. Además, se realizaron fragmentaciones de péptidos seleccionados por EM en tándem (MS/MS). El procesamiento de estos datos fue llevado a cabo utilizando el software Data Explorer v.4.9 (Applied Biosystems), de manera de mejorar y limpiar el

espectro para una mejor identificación. Las masas moleculares determinadas de la digestión proteolítica de la muestra proteica, luego de su procesamiento con el programa antes mencionado, se compararon con masas teóricas obtenidas por digestiones proteolíticas virtuales “in silico” de secuencias disponibles en los bancos de datos del NCBI usando el programa MASCOT (Matrix Science, <http://www.matrixscience.com>) Para ello se utilizó el método “sequence query” de dicho motor de búsqueda y se incorporaron los siguientes criterios de búsqueda: todas las entradas taxonómicas, tolerancia de masa monoisotópica 0.06 Da; tolerancia de fragmentos de masa 0.35 Da; oxidación parcial de metionina, carbamidometilación de cisteínas, omisión de un sitio de corte por parte de la enzima.

4. Resultados

4.1 Caracterización de los cultivos celulares

Con el objetivo de poder realizar una primer caracterización fenotípica de la línea celular MCF7 (de cáncer de mama metastásico humano HER 2-), determinar su velocidad de crecimiento y realizar la caracterización de la viabilidad celular en nuestras condiciones experimentales, las líneas celulares en cultivo fueron estudiadas mediante microscopía óptica y observando cultivos con un 80% de confluencia. En estas condiciones, fue posible constatar el crecimiento desordenado, tamaños heterogéneos de aprox. 25 μm y en múltiples capas; todas características típicas de las líneas tumorales malignas. También constatamos la formación de domos tanto en flotación como adheridos a la superficie de la caja de cultivo. Las diferentes microscopías corresponden a las diferentes réplicas biológicas de esta línea celular (Fig. 5).

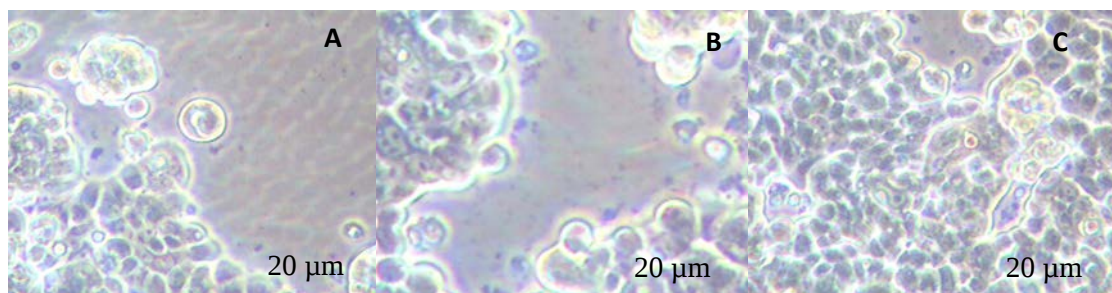


Figura 5. Microscopía óptica de contraste de fase. La línea MCF-7 fue cultivada en el medio EMEM + SFB 10% + Insulina 0.01% y mantenida a 37°C y 5% CO₂.

Por otro lado, cuando analizamos la línea no tumoral de epitelio ductal mamario humano (MCF-10A), constatamos que cuando los cultivos alcanzan una confluencia >70%, las células tienden a adoptar una forma más voluminosa, hexagonal, recordando una superficie pavimentada (Fig. 6, panel B y C) y como previamente reportado (Sarrió, D. et al., 2008). A menores porcentajes de confluencia, las células adoptan una morfología mas alargada, fusiforme, recordando a un fibroblasto (Fig. 6A). Los tamaños son variables siendo cercanos a los 100 μm (Fig. 6). A confluencias mayores, el cultivo presenta pequeñas variaciones en su morfología, siendo las mismas reportadas como habituales. La relación núcleo/citoplasma varía de célula a célula dentro de ciertos parámetros. La mayoría de las veces el núcleo es homogéneo en tamaño, redondo y con un prominente nucléolo (Fig. 6, flecha blanca).

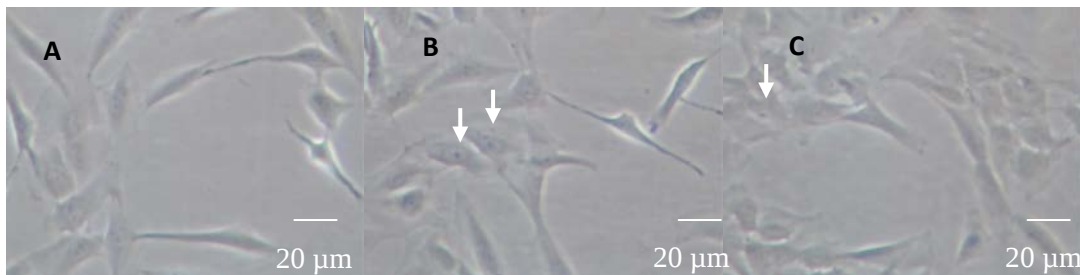


Figura 6. Microscopía óptica de contraste de fase. La línea MCF-10A fue cultivada en el medio EMGM + Insulina 0.01% y mantenida a 37°C y 5% CO₂.

Con el objetivo de disminuir el número de variables experimentales a la hora de realizar el análisis proteómico, nos propusimos estudiar el crecimiento de ambas líneas celulares en uno solo de los medios recomendados por la ATCC. Para ello, en primera instancia cultivamos la línea tumoral maligna MCF-7 en las condiciones recomendadas para su homóloga no maligna MCF-10A: EMGM + insulina 0.01%. Como se observa en la figura 7, en estas condiciones las células carecen de adherencia a la superficie de cultivo. Si bien es posible observar acúmulos celulares en flotación, la observación de células individuales no adheridas permite inferir la falta de viabilidad de las mismas. Esto se comprobó ya que las mismas no se replicaron, ni crecieron.

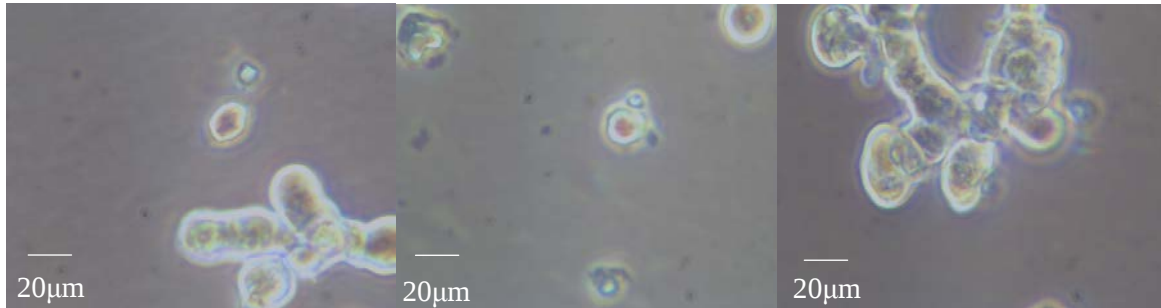


Figura 7. Microscopía óptica de contraste de fase (Microscopio de luz invertido).

Cultivo celular de la línea MCF-7 en el medio EMGM + Insulina 0.01% y mantenida a 37°C y 5% CO₂.

Cuando se realizó el cultivo de la línea no tumoral en las condiciones recomendadas para el cultivo de la línea tumoral, comprobamos un cambio fenotípico importante (fig. 12), destacándose evidencias de sufrimiento celular. Estas observaciones nos hicieron postular que en estas condiciones experimentales, las células podrían inducir el estado de senescencia celular, para lo cual realizamos experimentos específicos para demostrar o descartar esta hipótesis (ver más adelante y fig. 12). Para continuar profundizando en estas observaciones y en cómo influye el medio de cultivo en la morfología y comportamiento de cada línea celular, realizamos un co-cultivo de las mismas en el medio recomendado por la ATCC para la línea tumoral maligna MCF-7 (Fig. 8). En estas condiciones experimentales, observamos un crecimiento normal de la línea tumoral MCF-7, sin cambios fenotípicos ni en la velocidad de crecimiento. Sin embargo, la línea no tumoral presentó importantes cambios en su morfología (Fig. 8, flechas), siendo notorio el cambio en la relación núcleo/citoplasma así como un gran polimorfismo nuclear. Por otra parte también se observó una disminución en la velocidad de crecimiento.



Figura 8. Microscopía óptica de contraste de fase (Microscopio de luz invertido)

Cocultivo celular de las líneas MCF-10 y MCF-7 en el medio EMEM + SFB 10% + Insulina 0.01% y mantenida a 37°C y 5% CO₂.

Para continuar caracterizando el fenotipo de las células tumorales malignas, procedimos a realizar experimentos de microscopia de fluorescencia confocal centrándonos en el análisis del citoesqueleto celular (fig. 9).

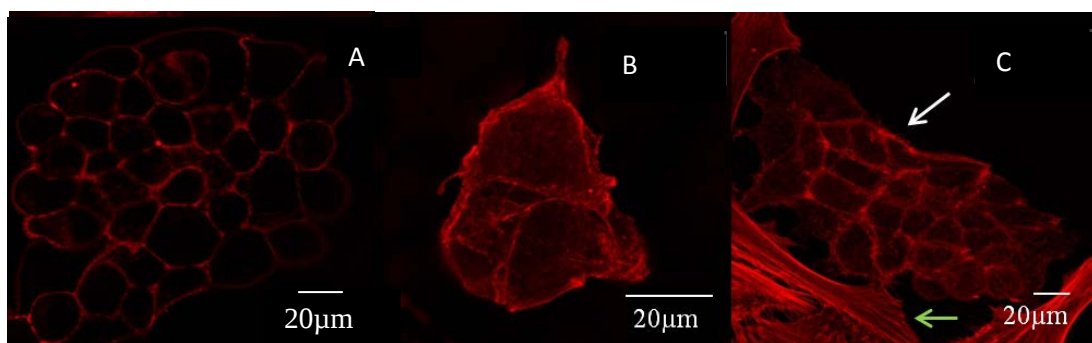


Figura 9. Microscopía de fluorescencia con Faloidina-Alexa 647 para visualizar citoesqueleto celular. MCF-7 en el medio EMEM + SFB 10% + Insulina 0.01%. Las células fueron permeabilizadas con Triton 0.1%. La tinción se realizó utilizando Faloidina conjugada con Alexa Flúor 647, de manera de poder observar el estado de los filamentos de actina del citoesqueleto (ROJO). Los preparados fueron observados con un microscopio confocal. En el panel C puede observarse un co-cultivo de ambas líneas en el medio EMEM + SFB 10% + Ins 0.01% (MCF-7 flecha blanca, MCF-10 flecha verde)

En estas condiciones experimentales, nuevamente evidenciamos el crecimiento desordenado y multicapas característico de la línea tumoral maligna. En cuanto a la disposición de las proteínas del citoesqueleto, comprobamos que las células MCF-7 presentan una fina malla de actina en todo el citoplasma celular además de un anillo de actina cortical sub-membrana plasmática (Fig. 9).

De manera similar estudiamos las células no tumorales MCF-10A (fig. 10).

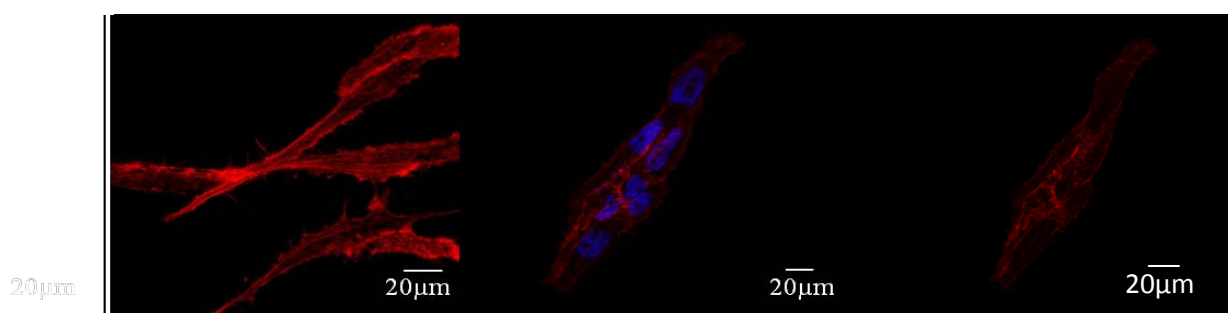


Figura 10. Microscopía de fluorescencia para visualizar citoesqueleto (Faloidina-Alexa 647) y el núcleo (DAPI) celular. MCF-10 en el medio EMGM + Insulina 0.01%. Los preparados fueron observados en el microscopio confocal. En este caso la tinción se realizó utilizando Faloidina-Alexa Flúor 647, de manera de poder observar el estado de los filamentos de actina del citoesqueleto (ROJO) y diamino-2-fenilindol (DAPI) de manera de evidenciar los núcleos celulares (AZUL).

A diferencia de las células tumorales malignas, las células MCF-10A muestran las características fibras de estrés de filamentos de actina que atraviesan la superficie de células fusiformes y que no se observan en la línea tumoral (fig.10). Si bien estas fibras de estrés se mantienen cuando estas células son cultivadas en el medio recomendado para la línea tumoral maligna (EMEM + SFB 10% + Ins 0.01%), en estas condiciones experimentales las células no tumorales presentan un cambio marcado en su morfología perdiendo la forma fusiforme característica (fig. 11).

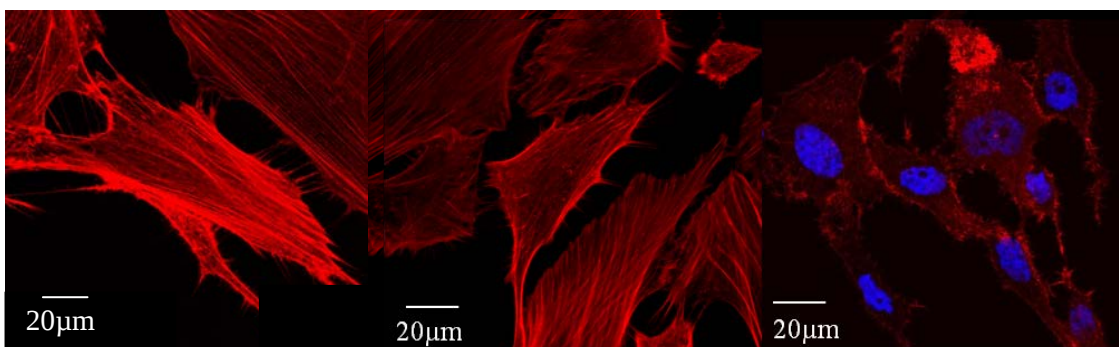


Figura 11. Microscopía de fluorescencia para visualizar citoesqueleto (Faloidina-Alexa 647) y el núcleo (DAPI) celular. MCF-10 en el medio EMEM + SFB 10% + Insulina 0.01%.

4.2 Estudios de senescencia celular: ensayos de β - galactosidasa.

Cuando se realizó el cultivo de la línea no tumoral MCF-10A en las condiciones recomendadas por la ATCC para el cultivo de la línea tumoral maligna, comprobamos un cambio fenotípico importante, destacándose evidencias de sufrimiento celular, planteamos que en dichas condiciones experimentales las células MCF-10A podrían inducir el estado de senescencia celular. Para confirmar o descartar esta hipótesis, las células MCF-10 fueron cultivadas en ambos medios hasta una confluencia menor al 80% para no inferir un estado de senescencia por contacto. Luego de fijadas, las células fueron incubadas con una solución de X-Gal (durante toda la noche a 37° y en oscuridad). La coloración azulada perinuclear de las células MCF-10 en el medio EMEM

demuestra la presencia de la β -galactosidasa (Fig. 12). La expresión de esta enzima aumenta cuando las células envejecen y en la senescencia celular.

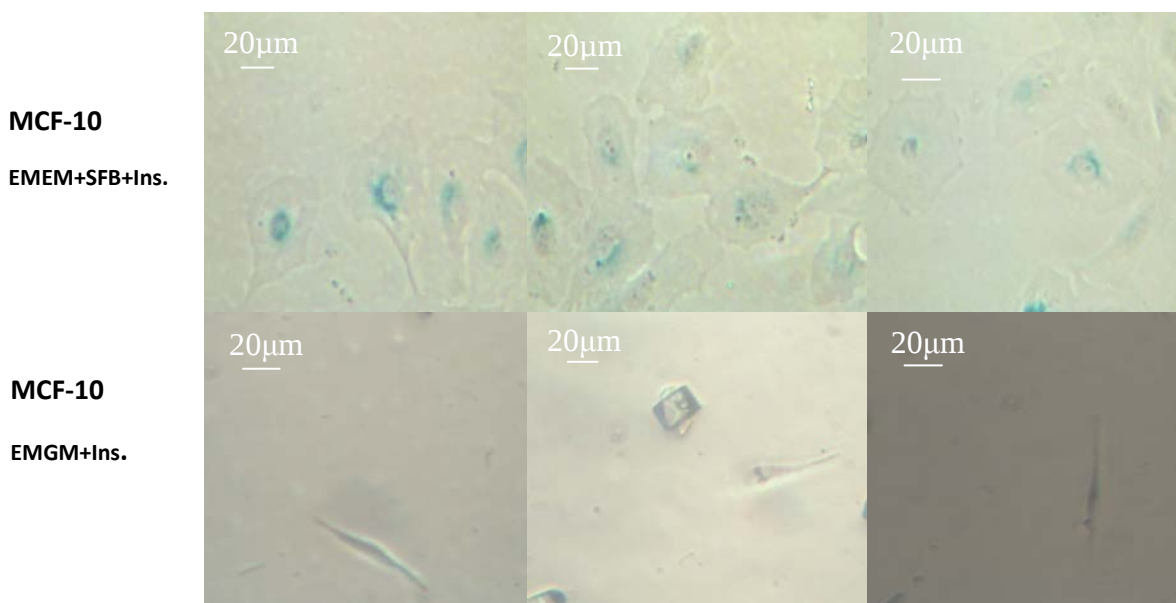


Figura 12. Estudios de senescencia de MCF-10 en función de las condiciones de cultivo. Se analizó la presencia de células senescentes en un cultivo de MCF-10A en EMEM y en EMGM (control negativo) utilizando el ensayo clásico de β -galactosidasa.

4.3. Estudio del proteoma celular por electroforesis bidimensional y espectrometría de masa

La caracterización del proteoma de ambas líneas celulares se realizó a través de la aproximación tradicional de electroforesis bi-dimensional acoplada a espectrometría de masa de tipo MALDI-TOF/TOF. Dado que no fue posible cultivar ambas líneas utilizando el mismo medio de cultivo, optamos por cultivarlas de acuerdo a lo recomendado para cada una de ellas por la ATCC. Luego que las células alcanzaron niveles de confluencia superiores al 80%, se procedió a levantar las células y realizar el extracto proteico total de ambas líneas celulares. Inicialmente, las proteínas de ambas líneas celulares fueron separadas por electroforesis bi-dimensional utilizando un gradiente no lineal de pH 3 – 11 (fig. 13 y 14).

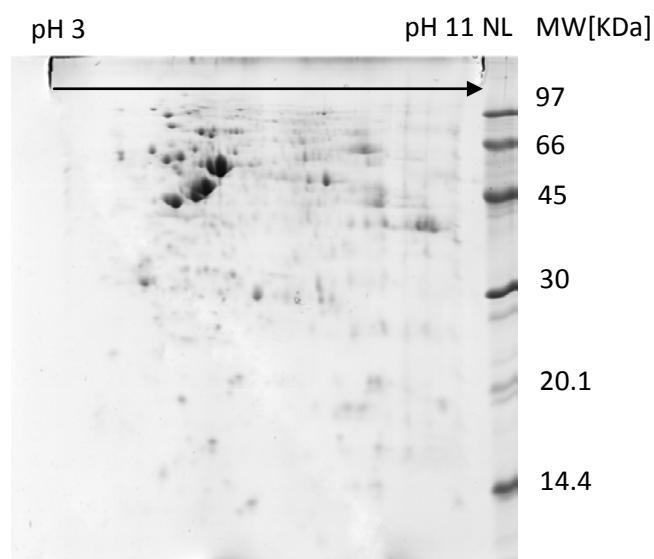


Figura 13. Electroforesis Bidimensional Gradiente 3-11 NL MCF-7 EN EMEM + SFB 10% + 0.01% Insulina. El extracto proteico total fue cuantificado y purificado utilizando los kits comerciales “2-D Quant Kit” y “2-D Clean Up Kit” (GE Healthcare). El gel fue revelado utilizando Coomassie G Coloidal.

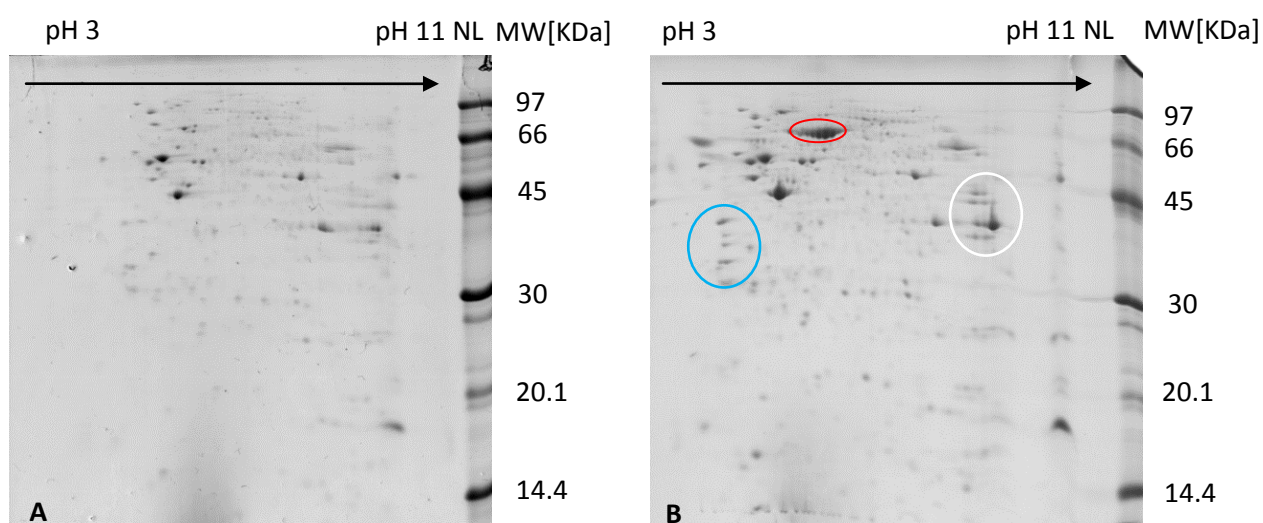


Figura 14. Electroforesis Bidimensional Gradiente 3-11 NL MCF-10. El gel **(A)** corresponde al perfil proteómico de la línea MCF-10 cultivada en EMGM + Insulina (sin SFB).

El gel **(B)** corresponde al perfil proteómico de la línea MCF-10 cultivada en EMEM + SFB + Insulina. Los métodos de cuantificación y purificación así como el utilizado para la tinción de los geles fueron los mismos que los utilizados anteriormente.

El análisis de los geles de las proteínas de las células tumorales malignas *versus* las no tumorales permite observar importantes diferencias entre ambos proteomas. Por otro lado, el perfil de proteínas de la línea no tumoral MCF-10A en ambos medio presenta algunas diferencias sobre un patrón general muy constante (círculos rojos y blanco en fig. 14B). Estas proteínas que presentaron una expresión diferencial en ambas condiciones experimentales correspondieron a la albúmina bovina (6 "spots" diferenciales círculo rojo en fig. 14B), un artefacto del experimento ya que esta proteína proviene del suero bovino adicionado al medio de cultivo. Por otro lado, las proteínas señaladas con un círculo blanco o azul y que presentan una expresión aumentada en EMEM están siendo estudiadas en este momento. Sin embargo, y si bien las proteínas se distribuyen a lo largo de todo el gel, claramente se concentran en el rango de pH 4 a pH 7 (Figs. 13 y 14).

A los efectos de poder obtener una mejor resolución de los proteomas y poder separar mejor las proteínas que presentarían una expresión diferencial, se realizaron separaciones de proteínas utilizando gradientes acotados de pH para la 1er dimensión (IEF con rango de pH 4-7; figs. 15).

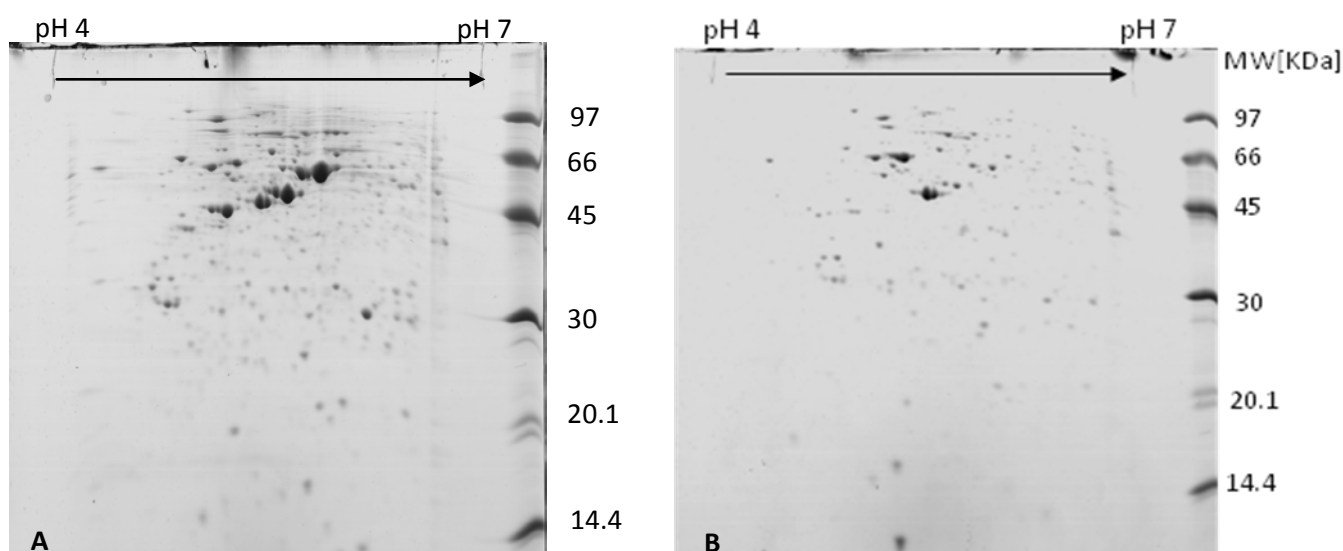


Figura 15. Electroforesis Bidimensional Gradiente 4-7. El gel (A) corresponde al perfil proteómico de la línea MCF-7 cultivada en EMEM + SFB + Insulina. El gel (B) corresponde al perfil proteómico de la línea MCF-10 cultivada en EMGM + Insulina. Los métodos de cuantificación, purificación y tinción fueron los mismos que anteriormente.

Como se puede observar en la fig. 15, a través de la utilización de un gradiente acotado de pH en la 1er. dimensión, obtuvimos una separación de proteínas de ambas líneas celulares muy superior a la obtenida con el rango amplio de pH. ***En estas condiciones experimentales, se ponen en evidencia diferencias significativas entre ambos proteomas celulares.***

Por último, procedimos al análisis por espectrometría de masa de los "spots" (ver material y métodos). Se cortaron, procesaron y analizaron 106 "spots" por MALDI-TOF/TOF, de los geles correspondientes a ambas líneas celulares analizadas con gradientes de IEF de pH 4-7. Mediante la digestión trípica de las banda de coomassie provenientes de dichos geles 2D-PAGE, posterior tratamiento y medida en el MALDI TOF/TOF, es posible obtener primero su correspondiente espectro MS, y luego el espectro MS/MS según el ión precursor seleccionado. A partir del procesamiento de estos datos utilizando el software Data Explorer v.4.9 (Applied Biosystems), es posible mejorar la relación señal/ruido del espectro, seleccionar los picos de interés y limpiar el espectro de picos no útiles para la identificación, entre otras mejoras.

Luego, a partir de la lista de masas obtenidas de la depuración del espectro y utilizando en este caso el software libre MASCOT (Matrix Science, www.matrixscience.com), es posible realizar la identificación de las proteínas (fig.16). La lista de masas obtenida experimentalmente es comparada con listas de masas teóricas obtenidas a partir de lo que se denomina digestiones "in silico" (digestiones virtuales) de secuencias conocidas y disponibles en los bancos de datos del NCBI, utilizando ciertos criterios de búsqueda (ver materiales y métodos).

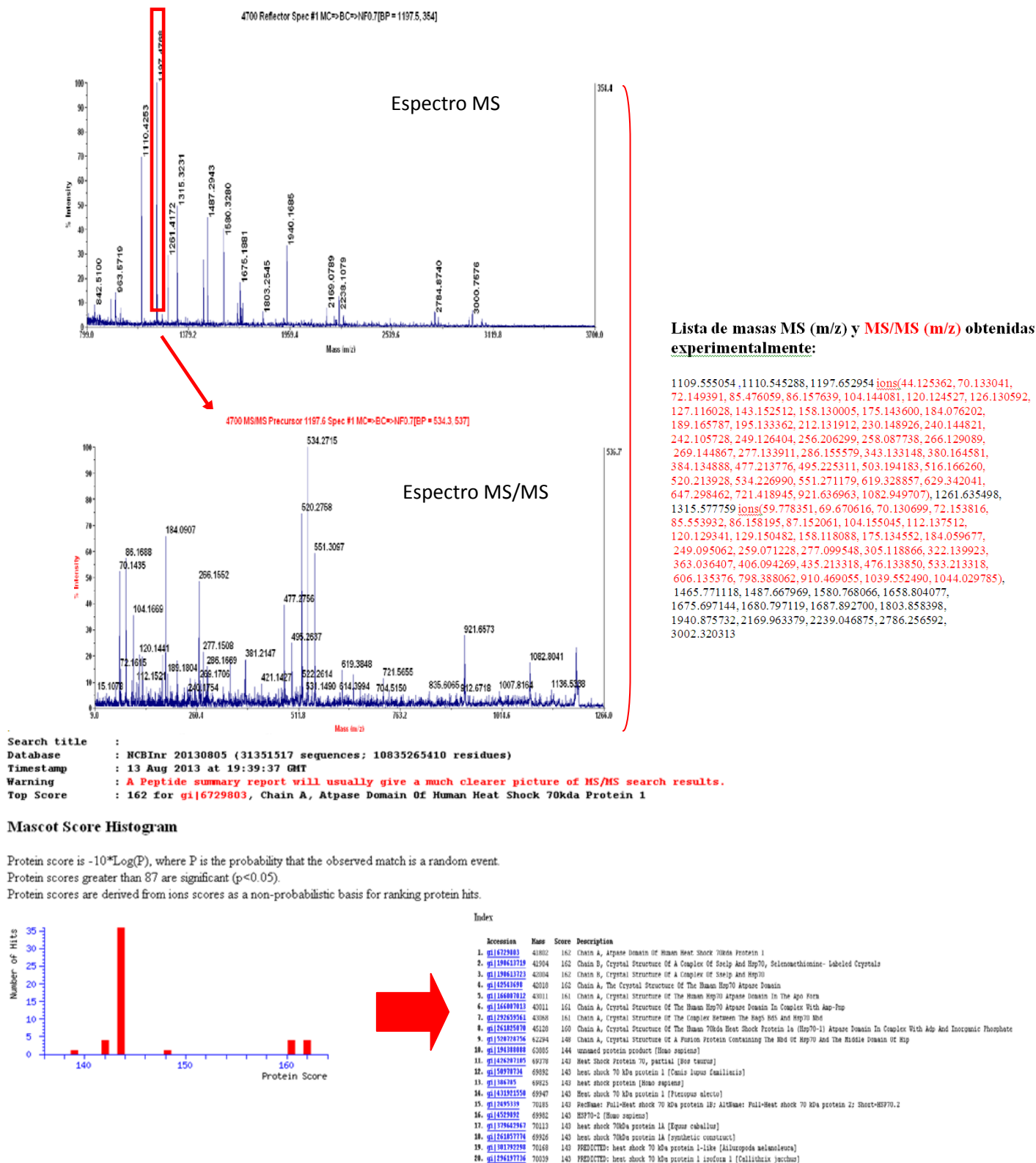


Figura 16. Identificación de una proteína. Diagrama del procesamiento de datos obtenidos a partir de experimentos MS y MS/MS y la posterior identificación de una proteína por comparación de datos obtenidos con datos teóricos disponibles en bases de datos. Para ello se utiliza el método “sequence query” del motor de búsqueda “mascot” (www.matrixscience.com). En este caso el espectro corresponde a la proteína HSP70, proteína chaperona encontrada en ambas líneas con un nivel de expresión aumentado en MCF-7.

Los resultados de las proteínas identificadas con niveles de expresión diferente entre las dos líneas celulares estudiadas se presentan en las Tabla III. En particular, 11 proteínas, incluyendo 3 citoqueratinas, 3 HSP, actina, tubulina y una proteína que une la membrana plasmática al citoesqueleto, presentan una expresión aumentada en las células tumorales con respecto a las normales. La peroxiredoxina 2, que presenta propiedades proliferativas y anti-apoptóticas, es una de las proteínas que presentan un aumento de su expresión en las células tumorales.

Tabla III. Lista de proteínas identificadas con niveles de expresión diferencial entre MCF-10A y MCF-7 y sus implicancias o funciones biológicas.

Proteína	Expresión en MCF-7	Implicancia y/o función biológica
Citokeratina 8	Aumentada	Presente en abundancia en células secretoras, glandulares normales (Tait,L., et al. 1990). Marcador típico de tumor epitelial (Tait,L., et al. 1990).
Citoqueratina 17	Aumentada	Presente en epitelio plano estratificado no queratinizado de órganos normales (Tait,L. et al. 1990). Expresión aumentada se correlaciona con una pobre prognosis. (Fillies,T., et al. 2006).
Citokeratina 18	Aumentada	Presente en epitelio plano estratificado no queratinizado de órganos, y mayoría de células secretoras normales (Tait,L., et al. 1990). Expresión aumentada se correlaciona con una pobre prognosis. (Fillies,T., et al. 2006).
HSP 27	Aumentada	Chaperona involucrada en el plegamiento correcto de las proteínas, protegiéndolas del estrés (Zagouri, F. et al. 2012). Expresión aumentada se correlaciona con migración celular y resistencia a drogas (Wei, L., et al. 2011).
HSP 60	Aumentada	Expresión aumentada en etapas tempranas se correlaciona con progresión y crecimiento del tumor (Desmetz, C., et al. 2008).
HSP 90	Aumentada	Expresión aumentada se correlaciona con una disminución en la sobrevida del paciente (Pick, E., et al. 2007).
α -tubulina	Aumentada	Células resistentes contienen de 2 veces mayor cantidad de alfa-tubulina que células MCF-7 células de tipo salvaje, por lo tanto un aumento en su expresión se correlaciona con el fenómeno de resistencia adquirida (Banerjee, A.,2002).
Actina- β	Aumentada	Desempeñar un papel en la migración, la motilidad y la invasión de células epiteliales mamarias, incluyendo células de cáncer de mama (Marhefka, J.N., et al 2012).
Proteína activadora de Tirosin 3-monoxigenasa/Triptofano 5-monoxigenasa(YWHAE/ Proteína 14-3-3)	Aumentada	Proteína reguladora de diferentes vías de señalización y moduladora del procesos de autofagia, apoptosis y progresión en el ciclo celular. Su expresión disminuida se correlaciona con sensibilidad a las terapias (Hermeking, H. 2003).
Peroxirredoxina 2	Aumentada	Prx II tiene propiedades proliferativas y anti-apoptóticas pudiendo inducir transformaciones malignas (Noh,.D.I.,et al. 2001).
Ezrina	Aumentada	Molécula "crosslinker" entre la membrana plasmática y el citoesqueleto, miembro de la familia de las moesinas, que regula varias funciones relacionadas con el citoesqueleto, incluyendo la adhesión, la sobrevida y la motilidad celular. (Eliott, B.E., 2005). En células tumorales se da un aumento de su expresión en el citoplasma y una disminución de su expresión en la membrana (Kobashayi, H., et al. 2003) (Hipfner, D.R.,et al 2004). Es un componente clave en el proceso metastásico, ya que su silenciamiento induce un aumento de la expresión de E-cadherina (Li, Q., et al. 2008). También se asocia al mecanismo de resistencia a quimioterapia.
β -tubulina (mayor expresión)	Disminuida	Participa en la formación y recambio de los microtúbulos, mutaciones en el gen para esta proteína se asocian con fenómenos de resistencia a drogas quimioterapéuticas (Kavallaris, M., et al. 1997)
Tropomiosina - α	Disminuida	Miembro de la familia de proteínas de unión a actina, tal que su función es estabilizar los microfilamentos. En células malignas se produce una expresión disminuida de las tropomiosinas de alta masa molecular, lo que se correlaciona con el carácter invasivo (Raval, G.N., et al. 2003)

GRP 78 (Proteína regulada por glucosa)	Disminuida	GRP78 se induce por el estrés fisiológico que perturba la función del RE, la homeostasis y la protección contra el tejido o daño de órganos en condiciones patológicas. Su nivel se mantiene bajo en los principales órganos y está fuertemente inducida en tumores. Representa una necesidad crítica para la supervivencia de las células estresadas. (Lee, A.S. 2007). Expresión aumentada se correlaciona con mecanismos evasivos del proceso de apoptosis y resistencia (Lee, A.S., et al. 2011).
Proteína Disulfuro Isomerasa (Tapasina)	Disminuida	La vía de MHC de clase I presenta gran relevancia tanto en el inicio de las respuestas inmunes antitumorales a través la presentación cruzada de antígenos tumorales a las células T CD8+, como en el reconocimiento y la muerte de las células tumorales. La chaperona Tapasina (Glicoproteína de 48-KDa) es importante para dichos procesos ya que su única función conocida es la carga de péptidos antigénicos a las moléculas de clase I. Expresión alterada se correlaciona con resistencia a la quimioterapia (Liu, Y., et al. 2006). Su expresión se encuentra disminuida en varios carcinomas humanos (Lou, Y., et al. 2008).
S100 (Calgizarina)	Disminuida	Proteínas implicadas en numerosas funciones celulares normales y patológicas, incluyendo las respuestas inflamatorias e inmunes, la homeostasis de Ca ²⁺ , la dinámica de los componentes del citoesqueleto, así como la proliferación celular, la diferenciación y la muerte. Está presente en el tejido mamario y en la matriz extracelular, su presencia en células tumorales se correlaciona con tumores menos agresivos (Fleming, J.M., et al. 2012).
Inhibidor de la disociación rho-GDP	Disminuida	Rho-GDP son proteínas clave en la transducción de señales. Rho involucrada en progresión del Ciclo celular, reorganización del citoesqueleto y expresión génica. Se ha asociado la sobre activación de vías de señalización de Rho GTPasas con la transformación maligna (Alonso, D.F. & Gomez, D.E. 2010).
HSP 70	Igual	Chaperona involucrada en el transporte proteico en la mitocondria, RE y núcleo. Mantiene el plegamiento correcto de las proteínas precursoras, y protege a las proteínas de estrés (Barnes, J., et al 2001). Chaperona encontrada típicamente en altas concentraciones en la línea MCF-7. Se asocia a fenómenos de resistencia, y a una alta actividad proliferativa (Barnes, J., et al 2001).
eIF 5A	Igual	Factor de iniciación de la traducción altamente conservado en eucariotas y fundamental para la proliferación celular (Silvera, D., et al. 2010). La inhibición en vías de señalización de este factor de iniciación de la traducción permite in vitro la inhibición del crecimiento tumoral (Nishimura, K., et al. 2002).
Inhibidor de la disociación rab-GDP	Igual	Rab involucrada en el tráfico vesicular, vías endocíticas y secretorias. Se ha asociado la sobre-activación de vías de señalización de Rho GTPasas con la transformación maligna (Alonso, D.F. & Gomez, D.E. 2010).
Proteína de unión a hormona Tiroidea	Igual	Las hormonas tiroideas pueden desempeñar un papel en el desarrollo de glándulas mamarias y en el control de la síntesis de caseína. Los receptores de la hormona tiroidea se han descrito típicamente en células mamarias normales, como en algunas líneas tumorales de cultivo (Cerbón, M., et al. 1981).
ATP Sintasa mitocondrial	Igual	Expresión aumentada se correlaciona con sensibilidad a la quimioterapia (Yi, W, et al. 2013). También La reprogramación metabólica de las células cancerígenas es una característica fenotípica necesaria para la proliferación y supervivencia celular. Estudios recientes han demostrado a nivel transcriptómico, proteómico y funcional que la progresión del cáncer requiere, inevitablemente, la selección de las células cancerígenas que presentan una elevada actividad glucolítica debido a la represión bioenergética de sus mitocondrias, la misma puede ser llevada a cabo mediante la inhibición de esta enzima (Aragó, M.J., et al. 2012).

Otras 11 proteínas presentaron o una disminución en su expresión en la línea tumoral (ver filas en rojo, tabla III) o niveles similares de expresión en ambas líneas tumorales (ver filas en negro, tabla III).

Las proteínas que presentaron una expresión diferencial (de tipo “on/off”) entre ambas líneas celulares se presentan en la tabla IV. Encontramos 11 proteínas presentes únicamente en la línea tumoral y 10 proteínas presentes únicamente en la línea no tumoral (ver tabla IV).

Tabla IV. Proteómica comparativa diferencial MCF-7 A vs. MCF-10 y sus implicancias o funciones biológicas.			
Proteína	MCF-10	MCF-7	Función Biológica/pronóstica
Citoqueratina 7	+	-	Distribución típica en epitelios normales de conductos (Tait,L., et al. 1990)
Glutación S- transferasa	+	-	Familia de isoenzimas que desempeñan un papel importante en la protección celular contra agentes citotóxicos y carcinogénicos. Secuencias reguladoras del gen que da lugar a esta proteína pueden presentar metilaciones, lo cual se correlaciona con transformaciones neoplásicas de células normales (Esteller, M., et al. 1998)
Maspina	+	-	Se expresa en las células epiteliales mamarias normales, pero no en la mayoría de líneas celulares de carcinoma de mama. Es una proteína relacionada con la familia de las serpinas (serin-proteasas inhibidoras). Funciona como un supresor de tumores (Zou, Z., et al. 1994)
Anexina A5	+	-	Proteína de unión a fosfolípidos dependiente de calcio y mediador de las respuestas inflamatorias reguladas por glucocorticoides. Su expresión esta disminuida en el cáncer de mama humano (Shen, D., et al. 2006)
Nicotinamida N- metil transferasa (agresiva)	+	-	Esta enzima se sobre expresa en varios tipos de tumores y se correlaciona con una menor agresividad del tumor Las aberraciones metabólicas que afectan a proteínas y la metilación del ADN son una fuente potencial de cáncer. La metilación tiene un doble papel en el cáncer: la hipermetilación en algunos casos inhibe supresores tumorales, mientras que la hipo-metilación puede activar oncogenes (Shlomioshua, T., et al. 2013).
L-lactato deshidrogenasa	+	-	Si bien la función normal de esta enzima es participar en el metabolismo energético anaerobio, regenerando NAD ⁺ a partir de la reducción del piruvato resultante del proceso de glucólisis, esta enzima detectada en suero en elevadas concentraciones se correlaciona con la presencia de un posible proceso neoplásico.
Vimentina	+	-	Un importante mecanismo responsable de la progresión del cáncer de mama se debe a que las células tumorales pierdan sus características epiteliales y la obtención de propiedades mesenquimales, evento muy similar a la transición epitelial-mesenquimal en el desarrollo embrionario, dándose un cambio en los filamentos intermedios desde una red rica en queratina conectada con uniones adherentes y hemidesmosomas, a una red rica en vimentina ricos conectada a adhesiones focales (Kokkinos, M.I., et al. 2007).
Galectina 1	+	-	β -galactósido-lectina de unión endógena es un regulador clave de la tolerancia inmune y la homeostasis. Se encuentra sobreexpresada en una amplia gama de tumores y estroma asociado a tumor, y su expresión se correlaciona con respuestas antitumorales deterioradas (Dalotto-Moreno, T., et al. 2013).
Super óxido dismutasa Cu-Zn	+	-	Principal enzima antioxidante protectora de los efectos de las especies reactivas del oxígeno presente en tejidos mamíferos y juega un papel importante en mediar los eventos inducidos por el óxido nítrico En pacientes con Cáncer previene el daño y reduce la mortalidad, actuando como un supresor de genes tumorales (López, A., et al. 2012).
Peroxirredoxina(6)	+	-	Único miembro de esta super-familia de tipo 1-Cys. Se expresa en todos los órganos principales. El aumento en su expresión se correlaciona con un aumento en las defensas antioxidantes (Manevich, Y. & Fisher, A.B. 2005). Existe un aumento en su expresión en las células tumorales teniendo un efecto directo en la proliferación y el potencial metastásico de células del cáncer de mama (Chang, X. -Z., et al.2007).
Complejo activador del proteasoma	-	+	Activación esencial para muchos procesos celulares como regulación de vías de señalización, degradación de ciclin-quinasas dependientes de ciclina, y

			durante la mitosis. Si su actividad está sobre-expresada también se relaciona con la angiogénesis, y degradación de proteínas reguladoras de vida corta, como factores de transcripción (Orlowski, R.Z., et al 2003)
Proteína de unión al ácido retinoico	-	+	El ácido retinoico y sus isómeros (reguladores del crecimiento embrionario y epitelial) ingresan al núcleo celular y se unen a los receptores allí presentes formando homo y heterodímeros. Estos activan el proceso de transcripción de genes para respuesta a retinoides. Esto permite un aumento en procesos apoptóticos, inhibición de la carcinogénesis permitiendo la regresión de tumores epiteliales (Corso, M., et al. 2001)
Nucleósido difosfato quinasa	-	+	Expresión aumenta en células malignas de carcinomas de mama (Sastre-Garau, X., et al. 1992)
Proteína de unión a Selenio	-	+	Alta expresión en células MCF-7 de cáncer de mama y baja expresión en células de MCF-10A no tumorigénicas. El Selenio parece presentar in vitro capacidades quimiopreventivas inhibiendo el crecimiento de MCF-7 durante un tiempo acotado y de manera dependiente de la concentración (Sytkowski, A. 2005)
Calreticulina	-	+	Expresión deficiente, o fallas en la misma se correlacionan con errores en los patrones de glicosilación de proteínas (Ni, M. & Lee, S. 2007)
Antígeno de rechazo tumoral	-	+	Péptidos con capacidad inmunoterapéutica (vacunas) (Matsutake, T., 1995)
Canal de cloro	-	+	Se relaciona el proceso de tumorigénesis con una pérdida de funcionamiento en canales de Calcio (Ko, J.H., et al 2013)
Proteína del complejo T	-	+	Chaperona que contiene una cavidad central que se une a polipéptidos no plegados, los secuestra desde el entorno celular y facilita el plegado dependiente de energía (ATP). Debido a las limitaciones estéricas de la cavidad solo algunos sustratos son óptimos para ésta. Su función no puede ser sustituida por otras chaperonas, implicando la pérdida de esta proteína la muerte celular. Sus sustratos clásicos son la actina y la tubulina. No se conoce mucho de esta proteína, pero la misma se encuentra sobre-expresada en algunos tipos de cáncer (Rogers, S., et al. 2008) (Coghlin, C., et al. 2006).
Inhibidor de la disociación Rab-GDP	-	+	
Citoqueratina 19	-	+	Expresión positiva antes y/o después de la quimioterapia en pacientes con cáncer de mama operable se asocia con un peor pronóstico clínico (Saloustros, E., et al 2011).
Cofilina 1	-	+	Proteína moduladora de actina intracelular ampliamente distribuida que se une y despolimeriza filamentos de F-actina e inhibe la polimerización de monómeros de actina G. Se ha identificado la vía de la cofilina como un determinante importante de la metástasis, determinante en el fenotipo invasivo y metastásico de las células tumorales de mama que según evidencias recientes es característico e inherente de estos tumores y no un evento raro, y adquirido tardíamente (Wang, W., et al. 2007).

Por tanto y de un total de 106 “spots” analizados, se identificaron 43 proteínas diferentes en ambas líneas cultivadas y en las condiciones experimentales recomendadas (tablas III y IV). Algunas de estas proteínas, se identificaron en varios “spots”, lo que en gran medida explica la diferencia entre el número de “spots” analizados y el número de proteínas identificadas.

De las 43 proteínas identificadas, 21 se encuentran presentes en una sola de las dos líneas celulares, teniendo algunas de ellas relevancias como marcadores y/o “targets” moleculares de la actividad tumoral (en azul en tabla IV y ver sección discusión y

conclusiones), y el resto se encuentran con variaciones en su nivel de expresión o con expresión equivalente (tabla III).

5. Discusión & Conclusiones

El cáncer de mama es una de las principales causas de muerte por cáncer en las mujeres en Uruguay y el mundo. Los factores genéticos, ambientales así como los hábitos personales guardan una importante relación influyendo en el desarrollo de la enfermedad.

Las condiciones definidas para el cultivo previo al análisis proteómico, parecen ser las indicadas, debido a que si bien la utilización de un único medio presentaba la ventaja a priori de disminuir una variable experimental, los resultados obtenidos del cultivo en uno u otro medio revelaron que las líneas celulares sufren un deterioro importante si las condiciones de cultivo no son las recomendadas para cada una de ellas. Más aún, los resultados de los ensayos de β -galactosidasa son el resultado más importante que demuestra la importancia de la utilización de medios diferenciales para el cultivo de estas líneas. La inducción de senescencia celular en la línea no tumoral MCF-10A cultivada en EMEM, medio carente de factores específicos y que se utiliza para el cultivo de la línea tumoral, es un claro resultado de que no se puede utilizar un mismo medio para el cultivo ambas líneas. Previamente se ha reportado que la omisión de estos factores, como el factor de crecimiento epidérmico, la insulina, hidroclotisona, extracto de glándula pituitaria (aditivos aquí utilizados) y colerotoxina, es sumamente perjudicial para el crecimiento de las células MCF-10A. También ha sido reportado tanto la leve diferenciación de las células MCF-10A en cultivos en presencia de suero fetal, como la disminución en la velocidad de crecimiento de esta línea en presencia de ciertos porcentajes del mismo y el aumento de la velocidad de crecimiento para otros porcentajes. Sin embargo, el estado de senescencia resultante de la exposición a porcentajes equivalentes al 10% de suero en el medio de cultivo no ha sido explícitamente reportado.

En este estudio se utilizó una estrategia proteómica clásica para analizar el proteoma de dos líneas celulares, la línea tumoral de cáncer de mama metastásico humano MCF-7 y la línea de epitelio normal de mama MCF-10, considerada según la literatura su homóloga no maligna. Las diferencias entre el proteoma de células

normales epiteliales de mama versus células malignas, se encuentran limitadas. Esto queda claro ya que de un total de 106 proteínas identificadas de ambas líneas cultivadas en las condiciones experimentales recomendadas, solamente 21 se encuentran presentes en una sola de las dos líneas celulares, teniendo algunas de ellas relevancias como marcadores y/o “targets” moleculares de la actividad tumoral (en azul en la tabla V), y el resto se encuentran con variaciones en su nivel de expresión o con expresión equivalente.

Del análisis de tabla V y de las funciones descritas para las diferentes proteínas (tablas III y IV) surgen las siguientes observaciones y comentarios generales que discutimos a continuación.

Con respecto a las proteínas positivas para la línea no tumoral MCF-10A y negativas para MCF-7, ha sido reportado que la citoqueratina 7 identificada se encuentra ampliamente distribuida en el epitelio ductal normal.

Lo mismo puede observarse en el caso de la Maspina, proteína que se expresa en las células epiteliales mamarias normales, pero no en la mayoría de las líneas celulares tumorales malignas. Esta enzima pertenece a la familia de las serpinas (proteínas inhibidoras de serin-proteasas) es en general codificada por genes supresores de tumores. Principalmente actúa bloqueando la respuesta a factores pro-angiogénicos necesarios para el crecimiento y evolución de un potencial tumor maligno.

La Anexina V, otra proteína encontrada diferencialmente entre ambas líneas, tiene como función mediar determinadas respuestas inflamatorias, y se ha reportado que su expresión se encuentra disminuida en el cáncer de mama. La anexina-V es una proteína dependiente de calcio que se une específicamente al fosfolípido fosfatidilserina, ubicado en la cara interna de la membrana plasmática en condiciones normales y que es expuesto en la cara externa al comienzo del proceso de apoptosis. El proceso de apoptosis o muerte celular programada es evadido en las transformaciones malignas como manera de perpetuar los cambios generados y lograr un crecimiento y diseminación clonal de esta nueva célula transformada. Fallas en esta proteína pueden estar relacionadas con este proceso de evasión de la apoptosis, por lo tanto es compatible con la identificación positiva de esta proteína en la línea MCF-10A y no en MCF-7.

Con respecto a la SOD (Super óxido dismutasa), proteína con poder antioxidante, protectora contra los efectos de Especies Reactivas del Oxígeno (ERO), representa uno de los mecanismos esenciales en la defensa para atrapar radicales libres dañinos y poder así prevenir diferentes enfermedades entre ellas el cáncer. Los radicales libres son capaces de causar cambios en el ADN, de manera que estas mutaciones pueden interferir en el correcto funcionamiento de genes supresores de tumores, y aumentar la actividad de oncogenes. Es así que la expresión de esta enzima debe estar aumentada en las células no tumorales MCF-10 y es de esperar que su expresión se encuentre disminuida en la línea tumoral MCF-7.

Con respecto a la Peroxirredoxina 6, proteína perteneciente también a la familia de enzimas antioxidantes, participa como mediador en las cascadas de transducción de señales en células de mamíferos. Su aumento por tanto implica una activa cascada así como un aumento en las defensas antioxidantes. Su expresión aumentada en la línea no tumoral MCF-10A parece ser esperada en relación a la línea tumoral MCF-7.

Por otro lado, encontramos proteínas expresadas diferencialmente en la línea tumoral maligna MCF-7. En primer lugar resulta interesante que se encontró aumentada la expresión de la proteína identificada como complejo activador del proteasoma. El proteasoma, complejo macromolecular que tiene como función principal la degradación de proteínas de forma selectiva según la previa señalización vía ubiquitina. La sobre-expresión de proteínas del complejo activador, y por ende de la actividad del proteasoma, puede llevar a la degradación de proteínas que en condiciones basales no deberían de ser degradadas, como por ejemplo proteínas reguladoras de vida corta, teniendo gran relevancia los factores de transcripción. La degradación de estos factores de transcripción podría llevar a cambios considerables en la expresión génica vinculados a patologías como el cáncer.

Por otra parte, las células que se dividen rápidamente, necesitan grandes cantidades de ADN y ARN. De esta manera para participar en la síntesis de ambos ácidos nucleicos, los nucleósidos monofosfato deben primero convertirse en nucleósidos trifosfato. Esto se da a través de una reacción secuencial, donde el segundo paso se encuentra catalizado por la enzima nucleósido di-fosfato quinasa. Es así que la expresión aumentada de esta enzima guarda una gran relación con transformaciones malignas, y como encontramos en nuestro modelo de estudio.

Otra proteína aumentada en su expresión en la línea tumoral es la Proteína de unión a Selenio. El Selenio es un oligo-elemento esencial para el organismo que forma el núcleo activo de varias enzimas antioxidantes y de numerosas proteínas y que constituyen la familia de las selenoproteínas. Existen varios mecanismos propuestos para los efectos preventivos del Selenio, incluyendo la estimulación de la apoptosis, la inducción de la detención del ciclo celular, la inhibición de la invasión de células tumorales, y la influencia sobre el estrógeno a través de su receptor, y por lo tanto sobre los tumores malignos clasificados como ER+. Según resultados publicados anteriormente, esta enzima se expresa principalmente en células de cáncer de mama ER + y luminales. En particular la línea MCF-7 se clasifica como ER+. Además, la baja expresión de esta enzima también fue reportada en la línea no tumoral MCF-10. Estos resultados concuerdan con lo obtenido en el presente trabajo. Cabe destacar que los niveles de esta proteína están disminuidos en tumores malignos clasificados como ER-, esto sugiere que existen características moleculares en las células tumorales que pueden hacer que su comportamiento sea diferente el uno del otro. La misma observación es válida para la siguiente proteína encontrada diferencialmente en este estudio. La calreticulina es una chaperona de unión a calcio ubicada en el lumen del Retículo Endoplásmico. Se ha vinculado a condiciones patológicas como trastornos auto-inmunes y ciertos tipos de cáncer. Posee dos funciones principales, actuar como chaperona molecular asistiendo el plegamiento de otras proteínas y regular la homeostasis intracelular del calcio. Debido a la actividad como segundo mensajero de este ión en varias vías de señalización intracelular, la calreticulina posee un papel esencial en la señalización celular. En particular existe una correlación entre la expresión aumentada de esta proteína y la presencia de metástasis de cáncer de mama. Además y de igual forma que para la Proteína de Unión a Selenio, se ha reportado que la Calreticulina presenta una aún mayor expresión en tumores malignos con fenotipos más agresivos (ER+).

El antígeno de rechazo tumoral o antígeno tumoral que se expresa en la superficie de una célula resultante de una transformación maligna. En general un antígeno es reconocido y marcado por el sistema inmunitario para su destrucción. Sin embargo, en el caso de antígenos tumorales el sistema inmune no siempre logra destruir todas las células malignas. La expresión de esta proteína es típica de una célula maligna y no de

una célula normal, coincidiendo con la expresión diferencial que encontramos en este trabajo.

Continuando con los resultados obtenidos, encontramos una expresión aumentada en la línea tumoral MCF-7 de los canales de cloro. Los canales iónicos y en particular los canales iónicos dependientes de voltaje tales como los canales de cloro, son moléculas de señalización con estructuras glico-proteicas complejas, que se expresan en casi todo tipo de tejidos y que participan directamente en diferentes procesos celulares tales como proliferación, transporte de iones, invasión, expresión génica, sinapsis neuroquímica, comunicación celular, entre otros. Es así que defectos en su funcionamiento se vinculan directamente a varias patologías y en particular al cáncer. Por otra parte, otras proteínas asociadas a estos canales actuando junto con ellos tienen un rol fundamental en la formación de nuevos vasos sanguíneos a través de los preexistentes, es decir en el proceso de angiogénesis, promoviendo tanto la morfogénesis de células epiteliales, así como la formación de nuevos capilares.

Con Respecto a la proteína del complejo T, también aumentada en la línea tumoral MCF-7, ésta es una chaperona con un rol único y fundamental que lleva a la muerte celular si se da su ausencia. Si bien no se conoce mucho de esta proteína, la misma se encuentra aumentada en su expresión en varios tipos de cáncer y en particular en el cáncer de mama.

En este trabajo también encontramos sobre-expresada la Proteína Inhibidora de la Disociación Rab-GDP, las cuales constituyen una familia de GTPasas de masa molecular baja y que poseen una función principal en el tráfico vesicular entre organelos regulando el intercambio GDP-GTP. La sobre-expresión de estas proteínas se vincula directamente con la transformación maligna ya que el intercambio de información intra-vesicular se postula como uno de los mecanismos por los cuales las células tumorales envían y reciben señales que inducen a fenómenos tales como la evasión de la apoptosis, transformación y crecimiento desordenado, resistencia entre otros. La citoqueratina 19 es una proteína de filamento intermedio expresada en todos los epitelios y en un pequeño número de otros tejidos. Existen numerosos estudios que la presentan como un marcador sensible para la detección de células de cáncer de mama. Posee un alto nivel de expresión en las células tumorales, muy superior a la expresión en el tejido mamario normal. Esta proteína fue identificada únicamente en

la línea tumoral MCF-7 lo que concuerda con lo descrito. Por último, la cofilina 1 también la encontramos aumentada en la línea tumoral, proteína que está involucrada en los procesos de metástasis y agresividad tumoral. Y finalmente destacar que el cambio relativo en los niveles de expresión de las otras 6 proteínas identificadas (tabla IV), no presentan concordancia con lo reportado hasta el presente.

Cuando se realizan análisis de proteómica diferencial, es preferible centrar la atención en aquellas proteínas que presentan cambios marcados, de tipo “on/off”, y no tanto a proteínas que presentan cambios más pequeños en sus niveles de expresión en una condición con respecto a la otra. Por otro lado, existen otras técnicas que permiten disminuir errores inherentes a estas técnicas proteómicas y, con mayor seguridad, analizar diferencias menores en los niveles de expresión de las proteínas. En este sentido, el DIGE (Electroforesis bidimensional de fluorescencia diferencial) es la herramienta recomendada. Sin embargo, incluso a través de esta primer aproximación experimental y tomando en cuenta que se realizaron triplicados biológicos y réplicas técnicas, pudimos objetivar la expresión aumentada de ciertas proteínas en las células tumorales con respecto a las células normales y que se encuentran en la mayoría de los casos vinculada a procesos muy relevantes para la biología tumoral (ver filas en azul, tabla III). En particular, 11 proteínas, incluyendo 3 citoqueratinas, 3 HSP, actina, tubulina y una proteína que une la membrana plasmática al citoesqueleto, presentan una expresión aumentada en las células tumorales con respecto a las normales. La peroxiredoxina 2, que presenta propiedades proliferativas y anti-apoptóticas, es una de las proteínas que presentan un aumento de su expresión en las células tumorales.

Es decir que su expresión aumentada según lo obtenido en este trabajo coincide ampliamente con lo esperado según estudios anteriores. Una excepción a los resultados reportados en la literatura es la proteína GRP 78, la cual presentó una mayor expresión en la línea MCF-10 (normal) vs. MCF-7 (tumoral) (ver filas en rojo, tabla III). Esta proteína regulada por glucosa es inducida frente al estrés fisiológico y se mantiene en bajos niveles en condiciones normales y su expresión se encuentra aumentada en tumores, según lo expresado en la literatura. Por último, la proteína Disulfuro Isomerasa, la cual participa en los procesos de resistencia a agentes quimioterápicos, presentó una expresión disminuida en la línea tumoral. De todos modos si bien podía ser esperable el aumento de su expresión en la línea tumoral

debido a su actividad se debe tener en cuenta que esta proteína según lo reportado en la literatura permanece con una baja expresión en varios carcinomas humanos (ver línea roja, tabla III).

Por tanto y de un total de 106 “spots” analizados, se identificaron 43 proteínas diferentes en ambas líneas cultivadas y en las condiciones experimentales recomendadas. Algunas de estas proteínas, se identificaron en varios “spots”, lo que en gran medida explica la diferencia entre el número de “spots” analizados y el número de proteínas identificadas. De las 43 proteínas identificadas, 21 se encuentran presentes en una sola de las dos líneas celulares, teniendo algunas de ellas relevancias como marcadores y/o “targets” moleculares de la actividad tumoral, y el resto se encuentran con variaciones en su nivel de expresión o con expresión equivalente.

6. Conclusiones Generales

- De los resultados obtenidos a partir del análisis por microscopía y del ensayo de β -galactosidasa se concluye que el mejor método de cultivo implica la utilización de dos medios diferentes (EMEM y EMGM) a pesar de representar esto una variable adicional a los efectos de realizar el estudio de proteómica comparativa de ambas líneas celulares.
- Si bien el cultivo de las células MCF-10A en EMEM induce el proceso de senescencia celular, no se pudieron observar cambios muy significativos en los mapas 2D de ambas situaciones experimentales.
- La utilización de un gradiente de pH acotado (4-7) permitió una mejor resolución del proteoma celular. De un total de 106 proteínas identificadas de ambas líneas celulares cultivadas en las condiciones experimentales recomendadas por la ATCC, 21 se encuentran presentes en una sola de las dos líneas celulares, teniendo la mayoría de ellas relevancia como marcadores y/o “targets” moleculares de la actividad tumoral.
- La obtención de proteínas expresadas diferencialmente entre ambas líneas podría generar información útil a los efectos de avanzar en los mecanismos moleculares involucrados en la transformación celular maligna.

7. Bibliografía

1. Alonso, D. F. & Gomez, D. E. ARTICULO ESPECIAL RHO GTPASAS COMO BLANCOS TERAPEUTICOS RELEVANTES EN CANCER Y OTRAS ENFERMEDADES HUMANAS. 555–564 (2010).
2. Aragón, M.J., Cuezva, O. & UAM). in *Dep. Biol. Mol. Cent. Biol. Mol. Sev. Ochoa, Cons. Super. Investig. Cientificas - Univ. Autónoma Madrid (CSIC -UAM)* (2012).
3. Bambang, I. F. *et al.* Overexpression of endoplasmic reticulum protein 29 regulates mesenchymal-epithelial transition and suppresses xenograft tumor growth of invasive breast cancer cells. *Lab. Invest.* **89**, 1229–42 (2009).
4. Banerjee, A. Increased levels of tyrosinated alpha-, beta(III)-, and beta(IV)-tubulin isotypes in paclitaxel-resistant MCF-7 breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293**, 598–601 (2002).
5. Barnes, J. a, Dix, D. J., Collins, B. W., Luft, C. & Allen, J. W. Expression of inducible Hsp70 enhances the proliferation of MCF-7 breast cancer cells and protects against the cytotoxic effects of hyperthermia. *Cell Stress Chaperones* **6**, 316–25 (2001).
6. Bast RC Jr, Kufe DW, Pollock RE, et al., E. *Holland-Frei Cancer Medicine. 6th edition.* chapter 10 (2003).
7. Ben-Porath, I. & Weinberg, R. a. The signals and pathways activating cellular senescence. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **37**, 961–76 (2005).
8. Bertucci, F., Birnbaum, D. & Goncalves, A. Proteomics of breast cancer: principles and potential clinical applications. *Mol. Cell. Proteomics* **5**, 1772–86 (2006).
9. Bronstein, I., Fortin, J., Stanley, P. E., Stewart, G. S. A. B. & Kricka, L. J. Chemiluminescent and Bioluminescent Reporter Gene Assays. *Anal. Biochem.* **219**, 169–181 (1994).
10. Cerbon, M., Pichon, M., Milgrom, E., Cerbon, M. & Milgrom, E. Thyroid Hormone Receptors in Human Breast Cancer Thyroid Hormone Receptors in Human Breast Cancer1. 4167–4173 (1981).
11. Chang, X.-Z. *et al.* Identification of the functional role of peroxiredoxin 6 in the progression of breast cancer. *Breast Cancer Res.* **9**, R76 (2007).
12. Chen, S., Pan, T. & Juan, H. Breast tumor microenvironment: proteomics highlights the treatments targeting secretome. *J. proteome ...* **7**, 1379–1387 (2008).
13. Chou, H. & Chan, H. Proteomic Analysis of Potential Breast Cancer Biomarkers. (2003).
14. Chuaire-noack, L. Actividad de la b -galactosidasa como marcador de senescencia en cultivos primarios del epitelio superficial del ovario . **51**, 351–367 (2010).

15. Chuaire-noack, L., S, M. C., Roc, S., Rez-clavijo, R. A. M. Í. & The, S. The Dual Role of Senescence in Tumorigenesis Papel Dual de la Senescencia en la Tumorig é nesis. **28**, 37–50 (2010).
16. Clark, W. H. Tumour progression and the nature of cancer. *Br. J. Cancer* **64**, 631–44 (1991).
17. Coghlin, C., Carpenter, B., Dundas, S., Lawrie, L., Telfer, C. and Murray, G. Characterization and over-expression of chaperonin t-complex proteins in colorectal cancer. *J. Pathol.* **210**: 351–3, (2006).
18. Collado, M. & Serrano, M. Europe PMC Funders Group Senescence in tumours : evidence from mice and humans. **10**, 51–57 (2013).
19. Corso,M., Rivera, S., Romero, T., Vilorio, M.E., Camacho, J., Núñez, J. Induction of mamary cancer in rats: Chemoprevention and immunomodulation. *FCV-LUZ XI, N° 4*, 355–356 (2001).
20. Dalotto-Moreno, T. *et al.* Targeting galectin-1 overcomes breast cancer-associated immunosuppression and prevents metastatic disease. *Cancer Res.* **73**, 1107–17 (2013).
21. Debnath, J., Muthuswamy, S. K. & Brugge, J. S. Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures. *Methods* **30**, 256–268 (2003).
22. Desmetz C, Bibeau F, Boissière F, Bellet V, Rouanet P, Maudelonde T, Mangé A, S. J. Proteomics-based identification of HSP60 as a tumor-associated antigen in early stage breast cancer and ductal carcinoma in situ. *Proteome Res.* **7(9):3830-**, (2008).
23. Dimri, G. P. *et al.* A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 9363–7 (1995).
24. Elliott, B. E., Meens, J. a, SenGupta, S. K., Louvard, D. & Arpin, M. The membrane cytoskeletal crosslinker ezrin is required for metastasis of breast carcinoma cells. *Breast Cancer Res.* **7**, R365–73 (2005).
25. Esteller, M. *et al.* Inactivation of Glutathione S -Transferase P1 Gene by Promoter Hypermethylation in Human Neoplasia P1 Gene by Promoter Hypermethylation. 4515–4518 (1998).
26. Fillies, T. *et al.* Cytokeratin 8/18 expression indicates a poor prognosis in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *BMC Cancer* **6**, 10 (2006).
27. Fleming, J. M., Ginsburg, E., Oliver, S. D., Goldsmith, P. & Vonderhaar, B. K. Hornerin, an S100 family protein, is functional in breast cells and aberrantly expressed in breast cancer. *BMC Cancer* **12**, 266 (2012).
28. Friedman, D. B., Wang, S. E., Whitwell, C. W., Caprioli, R. M. & Arteaga, C. L. Multivariable difference gel electrophoresis and mass spectrometry: a case study on transforming growth factor-beta and ERBB2 signaling. *Mol. Cell. Proteomics* **6**, 150–69 (2007).
29. Garcia M, Jemal A, Ward EM, Center MM, Hao Y, Siegel RL, T. M. J. & 2007., G. C. F. & F. Global Cancer Facts & Figures. *Atlanta, GA Am. Cancer Soc.* (2007).

30. GE. *2-D Electrophoresis Principles and Methods Handbook* 80-6429-60AC. (2005).
31. Graveley, B. R. Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world. *Trends Genet.* **17**, 100–7 (2001).
32. Graves, P. R. & Haystead, T. A. J. Molecular Biologist 's Guide to Proteomics. **66**, 39–63 (2002).
33. Gygi, S. P., Corthals, G. L., Zhang, Y., Rochon, Y. & Aebersold, R. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 9390–5 (2000).
34. Hermeking, H. The 14-3-3 cancer connection. *Nat Rev Cancer* **3**, 931–943 (2003).
35. Hipfner, D. R., Keller, N. & Cohen, S. M. Slik Sterile-20 kinase regulates Moesin activity to promote epithelial integrity during tissue growth. *Genes Dev.* **18**, 2243–8 (2004).
36. Hondermarck, H. Breast cancer: when proteomics challenges biological complexity. *Mol. Cell. Proteomics* **2**, 281–291 (2003).
37. J.E. VAN EYK5, and M. J. D. C. G. D. R. * C. C. L. P. D. A. R. L. W. NIH Public Access. *J Muscle Res Cell Motil* **24**, 251–260 (2003).
38. Jemal, A., Bray, F. & Ferlay, J. Global Cancer Statistics. **61**, 69–90 (2011).
39. Kavallaris, M. *et al.* Taxol-resistant epithelial ovarian tumors are associated with altered expression of specific beta-tubulin isotypes. *J. Clin. Invest.* **100**, 1282–93 (1997).
40. Kavallaris, M. & Marshall, G. M. Proteomics and disease: opportunities and challenges. *Med. J. Aust.* **182**, 575–9 (2005).
41. Ko, J.-H. *et al.* Expression profiling of ion channel genes predicts clinical outcome in breast cancer. *Mol. Cancer* **12**, 106 (2013).
42. Kobayashi, H., Sagara, J., Masumoto, J., Kurita, H., Kurashina, K. and Taniguchi, S. Shifts in cellular localization of moesin in normal oral epithelium, oral epithelial dysplasia, verrucous carcinoma and oral squamous cell carcinoma. *J. Oral Pathol. Med.* **32**: **344–34**, (2003).
43. Kokkinos, M.I. · Wafai, R. · Wong, M.K. · Newgreen, D.F. · Thompson, E. W. ·. Vimentin and Epithelial-Mesenchymal Transition in Human Breast Cancer – Observations in vitro and in vivo. *Cells Tissues Organs* **185**:**191–20**, (2007).
44. Kumar, V., Aster, J. C., Fausto, N. & Abbas, A. K. *Robbins y Cotran. Patología estructural y funcional.* (Elsevier Health Sciences Spain, 2010). at <<http://books.google.com.uy/books?id=kGS1OMWqVZwC>>
45. Lee, A. S. GRP78 induction in cancer: therapeutic and prognostic implications. *Cancer Res.* **67**, 3496–9 (2007).
46. Lee, A. S. & Hui Zhou, Yi Zhang, Yong Fu, L. C. Protein (GRP78): ENDOCRINE Function of 78-kDa Glucose-regulated Novel Mechanism of Anti-apoptotic. *J.Biol Chem* **286**:**25687-**, (2011).

47. Lengauer, C., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* **396**, 643–9 (1998).
48. Lengauer, C., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* **396**, 643–9 (1998).
49. Levenson, A. S. & Jordan, V. C. MCF-7 : The First Hormone-responsive Breast Cancer Cell Line. *Cancer Res.* **57**, 3071–3078 (1997).
50. Li, Q. *et al.* Ezrin silencing by small hairpin RNA reverses metastatic behaviors of human breast cancer cells. *Cancer Lett.* **261**, 55–63 (2008).
51. Liotta, L. A. Tumor Invasion and Metastases - Role of the Extracellular Matrix. *Cancer Res.* **46**, 1–7 (1986).
52. Liu, Y., Liu, H., Baoguang Han, A. & Zhang, J.-T. Identification of 14-3-3 σ as a Contributor to Drug Resistance in Human Breast Cancer Cells Using Functional Proteomic Analysis. *Cancer Res* **66**; **3248**, (2006).
53. López, A. . & Lazarova, C.F., Bañuelos, R., Sánchez, S. H. Antioxidantes , un paradigma en el tratamiento de enfermedades Antioxidants , a paradigm for diseases treatment. **5**, (2012).
54. Lou, Y. *et al.* Combining the antigen processing components TAP and Tapasin elicits enhanced tumor-free survival. *Clin. Cancer Res.* **14**, 1494–501 (2008).
55. Manevich, Y. & Fisher, A. B. Peroxiredoxin 6, a 1-Cys peroxiredoxin, functions in antioxidant defense and lung phospholipid metabolism. *Free Radic. Biol. Med.* **38**, 1422–1432 (2005).
56. Marhefka JN, A.-A. R. Validation of the Cancer BioChip System as a 3D siRNA Screening Tool for Breast Cancer Targets. *PLoS One* **7(9)**: **e460**, (2012).
57. Matsutake T, N. E. Tumor rejection antigen and cancer immunotherapy. **22(13):187**, (1995).
58. McIntosh A, Shaw C, Evans G, Turnbull N, Bahar N, Barclay M, Easton D, Emery J, Gray J, Halpin J, Hopwood P, McKay J, Sheppard C, Sibbering M, Watson W, Wailoo A, H. A. (2004). The classification and care of women at risk of familial breast cancer in primary , secondary and tertiary care. (2006).
59. Mitulovic, G. & Mechtler, K. HPLC techniques for proteomics analysis--a short overview of latest developments. *Brief. Funct. Genomic. Proteomic.* **5**, 249–60 (2006).
60. Moll, R., Franke, W. W., Schiller, D. L., Geiger, B. & Krepler, R. The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* **31**, 11–24 (1982).
61. MSP. Registro Nacional de Cáncer- Mortalidad por cáncer en Uruguay 2011. *Regist. Nac. Cáncer* (2011).
62. Neoplasias, U. T. I. “ Epidemiología del cáncer : Magnitud del problema en el Uruguay y en el mundo ”. (2011).
63. Neoplasias, U. T. I. “ Epidemiología del cáncer : Magnitud del problema en el Uruguay y en el mundo ”. (2011).

64. Ni, M. & Lee, A. S. ER chaperones in mammalian development and human diseases. *FEBS Lett.* **581**, 3641–3651 (2007).
65. Nishimura, K. *et al.* initiation factor 5A (eIF5A) by deoxyspergualin. **768**, 761–768 (2002).
66. Noh DY, Ahn SJ, Lee RA, Kim SW, Park IA, C. H. Overexpression of peroxiredoxin in human breast cancer. *Anticancer Res.* **21(3B):208**, (2001).
67. O. Hensler P.J et Pereira-Smith. Human replicative senescence a molecular study. *Am. J. Pathol.* **147**, 1–8 (1995).
68. Orłowski, R. Z. & Dees, E. C. The role of the ubiquitination-proteasome pathway in breast cancer Applying drugs that affect the ubiquitin-proteasome pathway to the therapy of breast cancer. 1–7 (2003). doi:10.1186/bcr460
69. Pick, E. *et al.* High HSP90 expression is associated with decreased survival in breast cancer. *Cancer Res.* **67**, 2932–7 (2007).
70. Raval, G. N. *et al.* Loss of expression of tropomyosin-1, a novel class II tumor suppressor that induces anoikis, in primary breast tumors. *Oncogene* **22**, 6194–203 (2003).
71. Rogers, S. *et al.* Investigating the correspondence between transcriptomic and proteomic expression profiles using coupled cluster models. *Bioinformatics* **24**, 2894–900 (2008).
72. Saloustros, E. *et al.* Cytokeratin-19 mRNA-positive circulating tumor cells during follow-up of patients with operable breast cancer: prognostic relevance for late relapse. *Breast Cancer Res.* **13**, R60 (2011).
73. Sarrió, D. *et al.* Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Res.* **68**, 989–997 (2008).
74. Sastre-Garau X, Lacombe ML, Jouve M, Véron M, M. H. Nucleoside diphosphate kinase/NM23 expression in breast cancer: lack of correlation with lymph-node metastasis. *Int J Cancer.* **20;50(4):5**, (1992).
75. Shay, J. W. & Wright, W. E. Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase. *Carcinogenesis* **26**, 867–74 (2005).
76. Shen, D. *et al.* Decreased expression of annexin A1 is correlated with breast cancer development and progression as determined by a tissue microarray analysis. *Hum. Pathol.* **37**, 1583–1591 (2006).
77. Shlomioshua, T., Rabinowitz, D. Cancer mistunes methylation. *Nat Chem Biol* **9**, 293–294 (2013).
78. Silvera, D., Formenti, S. C. & Schneider, R. J. Translational control in cancer. *Nat Rev Cancer* **10**, 254–266 (2010).
79. Sytkowski, A. Selenium and Breast Cancer Growth. *U.S. Army Med. Res. Mater. Command Fort Detrick, Maryl.* 21702-5012 1–12 (2005).
80. Tait L., H. D. Ultrastructural and Immunocytochemical Characterization of an Ultrastructural and Immunocytochemical Characterization of an Immortalized. *Cancer Res* **50**, 6087–6094 (1990).

81. Vassallo, J. A. & Musetti, C. *Enrique Barrios Mariela Garau*. (2010).
82. Vispo, N. S. in *Comb. Mol.* (Scientiae, E.) <http://elfoscientiae.cigb.edu.cu/PDFs/Muestras/In> (2004).
83. W.M.Elliott, N. A. Growth of normal human ovarian surface epithelial cells in reduced-serum and serum-free media. *Vitr. Cell Dev Biol* **29**, 9–18 (1993).
84. Wang, W., Eddy, R. & Condeelis, J. The cofilin pathway in breast cancer invasion and metastasis. *Nat Rev Cancer* **7**, 429–440 (2007).
85. Wei, L. *et al.* Hsp27 participates in the maintenance of breast cancer stem cells through regulation of epithelial-mesenchymal transition and nuclear factor- κ B. *Breast Cancer Res.* **13**, R101 (2011).
86. Welch, D. R., Steeg, P. S. & Rinker-Schaeffer, C. W. Molecular biology of breast cancer metastasis. Genetic regulation of human breast carcinoma metastasis. *Breast Cancer Res.* **2**, 408–16 (2000).
87. Yi, W. *et al.* Differential protein expressions in breast cancer between drug sensitive tissues and drug resistant tissues. **2**, 62–68 (2013).
88. Yokota, J. Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis* **21**, 497–503 (2000).
89. Zagouri, F., Bournakis, E., Koutsoukos, K. & Papadimitriou, C. a. Heat Shock Protein 90 (Hsp90) Expression and Breast Cancer. *Pharmaceuticals* **5**, 1008–1020 (2012).
90. Zou, Z. *et al.* Maspin, a serpin with tumor-suppressing activity in human mammary epithelial cells. *Science (80-.).* **Vol. 263 n**, (1994).
91. Keller et al. Cell Culture Supporting Information. www.pnas.org/cgi/content/short/1017626108
92. John M. Koomen,† Eric B. Haura, Gerold Bepler, Rebecca Sutphen, Elizabeth R. Remily-Wood, Kaaron Benson, Mohamad Hussein, Lori A. Hazlehurst, Timothy J. Yeatman, Lynne T. Hildreth, Thomas A. Sellers, Paul B. Jacobsen, David A. Fenstermacher, and W. S. D. Proteomic Contributions to Personalized Cancer Care*. *Mol Cell Proteomics* **Mol Ce 7(1)**, (2008).
93. Hoffmann, E. 2005. in *Mass Spectrom. Kirk-Othmer Encycl. Chem. Technol.* (2005).

8. Agradecimientos

Como primeras personas quisiera agradecer a mis padres por haberme enseñado lo importante que es estudiar, esforzarse y cumplir con las metas. Gracias por su continua motivación desde pequeña y a pesar de haberles fallado alguna vez espero al fin puedan estar orgullosos. Lamento no estén los dos conmigo para poder ver esto culminar los 3 juntos.

Al resto de mi familia quien también ha estado conmigo siempre. Javi y Carola, hermanos para mí; el Tío y mil errores informáticos arreglados rápidamente por él, los “hace lo que quieras” de mi Tía y sus entradas a internet de último momento. Los consejos de ambos. Gracias a ellos por ser mi lugar de “vacaciones de los padres” preferido. Mi segunda casa.

A Fede, mi esposo, eterno novio, compañero y amigo, quien pasó horas y días aguantando los nervios de cada parcial, exámen y ahora la tesis. Yo se que siempre estás y vas a estar ahí todos los días.

A mi Tutor, quien me brindó muchas oportunidades, académicas y laborales, pero sobre todo confió en mí, gracias por guiarme, ser mi referente e incentivarme siempre a más. Carlos espero no haberte defraudado.

Rosario muchas gracias por estar también a mi lado en este camino, con consejos y sugerencias más allá de lo académico. Gracias también por ser parte de un plan futuro.

A Gonza con quien paciencia y dedicación me enseñó un poco de lo mucho que sabe, gracias por las horas dedicadas, los chistes, las correcciones ,los errores cometidos, de los cuales aprendimos mucho y sobre todo los logros, los cuales siempre me hiciste sentir que eran de ambos.

Analía, Made y Maggie, demasiado que decir... más que compañeras, tías, madres y hermanas todo en uno. Tres personas que me ayudaron, cuidaron y guiaron todo este tiempo, y que me siguen guiando. Con ellas aprendí a usar equipos y realizar diferentes técnicas, cosas más útiles para mi vida profesional, pero también aprendí a disfrutar un té luego de una larga mañana; a perderle el miedo a muchas cosas, a crecer y a valorar el trabajo propio y ajeno. Incontables horas dedicadas a mí y este trabajo que espero al menos un poco agradecer aquí y con mis actitudes día a día. Sin dudarlo elegiría mil veces el Gallinero que al fin y al cabo no es nada sin ustedes tres.

A todos los que forma parte de la UByPA, a quienes hoy en día puedo decir con orgullo mis compañeros, a “los menores de 25”, Jorge por alegrar cada día con sus ocurrencias, y a Jessica por darme una gran mano en parte de este trabajo con sus conocimientos de microscopía.

A mis amigos de siempre quienes me aguantaron faltar a asados, cumpleaños, bailes y ramblas, o peor aún me tuvieron que aguantar en sus casas estudiando a lo largo de mi carrera mientras ellos estudiaban lo suyo y que hasta alguna vez me acompañaron un sábado al IP. Gracias por estar durante todo este camino, espero sigamos juntos.

A mis amigos y compañeros de Facultad de Ciencias que me escucharon muchas veces mis dudas, mis errores, con quien intercambié “piques”, con quienes pase horas y horas en cantina, biblioteca, y luego en sus casas, o en la mía, estudiando y aprendiendo a ser lo que siempre quisimos.

A mi Facultad por todo lo que me dio y porque es un orgullo haber sido parte de ella.

A los integrantes de la Comisión Coordinadora porque en momentos tristes y difíciles para mí me brindaron oportunidades, dándome fuerza así para continuar y cumplir hoy mi sueño.

A Ilda quien es más que una integrante de la Bedelía, todo una consejera.

Mil gracias a todos...porque agradecer nunca esta demás.