



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO. División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Formato SS-1

SOLICITUD DE TÉRMINO DE SERVICIO SOCIAL

Mtra. María Elena Contreras Garfias
Directora de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud
PRESENTE

Por este medio le informo del término del Servicio Social, cuyos datos son los siguientes :

Fecha de Recepción	Día	Mes	Año	Fecha de Aprobación	Día	Mes	Año
	15	10	2018		5	11	2018

Datos del Alumno

Nombre : Liliana Santos Castro	
Matrícula : 2142033281	Licenciatura : Química Farmacéutica Biológica
Domicilio : Bucareli 171 Colonia Juárez, Delegación Cuauhtémoc	
Teléfono : 5514127488	Celular : 5514127488
Correo Electrónico : lili_50395@hotmail.com	CURP : SACL950305MGRNSL02

Datos del Proyecto

Nombre del Proyecto : Análisis de la expresión de la sialoglicoproteína AGP-1 en líneas celulares de y su posible relación con la expresión tumoral							
Lugar dónde se realizó el Servicio Social : Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío VI							
Dependencia : Publica							
Entidad Federativa : Distrito Federal							
Municipio : Tlanpan	Localidad : Tlanpan						
Fecha de Inicio	Día	Mes	Año	Fecha de Término	Día	Mes	Año
	1	10	2018		1	4	2019

PARA SER LLENADO POR LOS ASESORES

Sector: 3.- Público	Tipo: 2.- Interno
Orientación: 8.- Salud, Alimentación Y Nutrición	

FIRMAS

M.en C. **Alejandro Palma Ramos**
Asesor Interno **15941**
Nombre, firma y No. Económico

Dr. **Raúl Barrera Rodríguez**
Asesor Externo
Nombre, firma y No. Económico

Liliana Santos Castro
Alumno
Nombre, firma

Felipe Mendoza Pérez
Vo. Bo. de la Comisión
Nombre y firma de la persona que autoriza

Ciudad de México, 08 de abril de 2019.

ASUNTO: Terminación de Servicio Social

MTRO. JESÚS OBDULIO LÓPEZ MURILLO
Coordinador Divisional de Servicio Social
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco
P R E S E N T E

Por medio de la presente informamos a usted que la alumna: **SANTOS CASTRO LILIANA**, con número de **matrícula 2142033281**, quien cursa la Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica, concluyó satisfactoriamente **su servicio social** en el Laboratorio de Autoinmunidad de este Instituto, en el período comprendido 01 de octubre de 2018 al 01 de abril de 2019, de lunes a viernes 09:00 a 14:00 horas.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

A T A T E N T A M E N T E



DR. JUAN CARLOS VÁZQUEZ GARCÍA
Director de Enseñanza




DRA. MARÍA DE LA LUZ CHAN CHAN
Jefa del Departamento de Formación
de Pregrado



DR. RAÚL BARRERA RODRÍGUEZ
Adscrito al Laboratorio de Autoinmunidad

MLCC/sahc*



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Ciudad de México, 26 de octubre de 2020

Asunto: carta de terminación de servicio Social

C.D.E. Patricia Enzaldo de la Cruz
Coordinador divisional de servicio social
División de ciencias biológicas y de la salud
Universidad Autónoma Metropolitana
PRESENTE

Por medio de la presente informo a usted que la alumna: **LILIANA SANTOS CASTRO**, con matrícula 2142033281, quien curso la licenciatura en Química Farmacéutica Biológica, concluyo satisfactoriamente su servicio social en el laboratorio de Autoinmunidad del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas", en el periodo comprendido 01 de octubre de 2018 al 01 de abril de 2019, de lunes a viernes de 09:00 a 14:00 horas.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

ATENTAMENTE

M. en C. Alejandro Palma Ramos



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



INSTITUTO NACIONAL
DE ENFERMEDADES
RESPIRATORIAS
ISMAEL COSÍO VILLEGAS

DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN
DEPTO. ENFERMEDADES CRÓNICAS-DEGENERATIVAS
LAB. AUTOINMUNIDAD

Ciudad de México a 28 de octubre de 2020

C.D.E. Patricia Enzaldo de la Cruz
Coordinador divisional de servicio social
División de ciencias biológicas y de la salud
Universidad Autónoma Metropolitana
PRESENTE

Por medio de la presente me permito comunicar a usted que la alumna:

Liliana Santos Castro Matrícula 2142033281 concluyó el proyecto de Servicio Social: "Análisis de la expresión de la sialoglicoproteína AGP-1 en líneas celulares de tumores de mama y su posible relación con la progresión tumoral". Que se realizó en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ubicado en: Ciqa. Tlalpan 4502, Col. Sec. XVI. 14080, Del 01 de octubre del 2018 al 01 de abril del 2019 bajo mi asesoría, cubriendo un total de 480 horas.

ATENTAMENTE

Dr. Raúl Barrera Rodríguez
Cedula Profesional: 1514789
Investigador "C".
Tel 54871700 ext. 5243; e-mail: raul_barrera@iner.gob.mx
Personal Websites: https://www.researchgate.net/profile/Raul_Barrera

c.c.p. Director (a) de la División de CBS UAM-X

Calzada de Tlalpan 4502, Colonia Sección XVI, C.P. 14080, Alcaldía Tlalpan, CDMX
Tel. (55) 5487 1700 www.iner.salud.gob.mx



2020
AÑO DE
LEONA VICARIO
BENENÉRITA MADRE DE LA PATRIA



Unidad Xochimilco

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Licenciatura en Química Farmacéutica Bióloga

Liliana Santos Castro

Matricula: 212033281

Proyecto: análisis de la expresión de la sialoglicoproteína AGP-1 en líneas celulares de tumores de mama y su posible relación con la progresión tumoral.

Instituto nacional de enfermedades respiratorias

"Ismael Cosío Villegas"

1 de octubre 2018 al 1 de abril 2019

M. en C. Alejandro Palma Ramos

Asesor interno 15741

Dr. Raúl Barrera Rodríguez

Asesor externo

Resumen

A nivel mundial, el cáncer de mama es el tumor más frecuente y la causa de muerte más común en mujeres que fallecen por neoplasia maligna. La α -1 glicoproteína ácida (AGP-1); proteína de fase aguda; es sintetizada principalmente por el hígado, sin embargo, otros órganos como el corazón, estómago y pulmones también la sintetizan. El estudio de esta proteína se ha enfocado en neoplasias de cabeza y cuello, tumores intestinales y laringe; es menos frecuente en cáncer de mama por lo que puede constituir un biomarcador en distintos procesos neoplásicos. **Objetivo:** caracterizar líneas celulares humanas de cáncer de mama en relación con la expresión y secreción de AGP-1. **Metodología:** Se estandarizó el método de RT-PCR (punto final) para identificación de mRNA de AGP-1 e identifico de la glicoproteína AGP-1 mediante inmunohistoquímica e inmunocitoquímica en tejido tumoral y en células tumorales respectivamente. **Resultados:** la línea celular de cáncer de mama MCF-7 no presento banda correspondiente al amplicón para AGP-1. En el análisis por inmunohistoquímica de cortes histológicos de biopsias de tumores de mama se encontró positividad hacia el anticuerpo anti-AGP-1 en el 100% de las muestras, en el citoplasma de las células neoplásicas del tejido. Adicionalmente estudiamos la línea celular cáncer de pulmón denominada INER-37. En experimentos de RT-PCR esta línea celular fue positiva para la expresión de mRNA de AGP-1, aunque encontramos segmentos de amplificación mayores a los esperado; lo que hace suponer una alteración en el gene de AGP-1. **Conclusión:** No se identificó el mRNA para AGP-1 en las líneas celulares de cáncer de mama analizadas por RT-PCR. Sin embargo, se identificó la glicoproteína mediante inmunohistoquímica en tejidos humanos obtenidos por biopsia.

1. Introducción

El cáncer de mama es el tipo más común diagnosticado en mujeres en todo el mundo. Se estima que cada año se diagnostican cerca de 1.67 millones de mujeres con cáncer de mama y 522,000 pacientes fallecen por esta enfermedad. El control y la supervivencia varían de acuerdo con la población y la región donde esta neoplasia se presenta. A pesar de que la incidencia global continúa incrementando, los datos de mortalidad por cáncer de mama muestran una disminución, en parte como resultado del diagnóstico precoz mediante cribado mamográfico, mejores técnicas quirúrgicas con atención a los márgenes, mejoras en los tratamientos de radioterapia y mejores terapias adyuvantes.

La AGP-1 es una glicoproteína sintetizada principalmente por los hepatocitos, es una proteína de fase aguda y su concentración aumenta como resultado de un proceso de infección o inflamación. Durante los últimos años se le han asignado varias propiedades biológicas, entre las que destacan su capacidad para modular la respuesta quimiotáctica, agregación plaquetaria y la activación de neutrófilos. Por este motivo AGP-1 ha sido objeto de estudio en diversos tipos de cánceres tales como colon, cabeza y cuello, hígado y pulmón. En pacientes con cáncer de mama, el aumento en los niveles de AGP-1 en plasma parece correlacionar con la progresión tumoral, ya que estos retornan a la normalidad posterior a tratamiento con tamoxifeno.

Debido a los hallazgos sobre la relación de esta proteína con diversos carcinomas, en el presente proyecto se pretende caracterizar líneas celulares de cáncer de mama en relación con la expresión y secreción de AGP-1. Por lo que se realizara la estandarización del método de RT-PCR (punto final) para identificación de mRNA de AGP-1 en células tumorales y la Identificación de la glicoproteína AGP-1 mediante inmunohistoquímica e inmunocitoquímica.

2. Marco teórico

2.1 Cáncer

El término cáncer engloba a un conjunto de enfermedades relacionadas y puede aparecer en cualquier parte del cuerpo. Se trata de una masa de tejido que será benigno si no invade ni destruye otros órganos, mientras que si las células que se dividen descontroladamente y además mutan, entonces puede adquirir la capacidad de invadir tejidos y órganos alrededor o trasladarse a través de los vasos sanguíneos o al sistema

linfático y proliferar en otras partes del organismo, lo que se denomina metástasis y en este caso el tumor será maligno y estaremos ante un cáncer [1].

El cáncer de cada persona tiene una combinación única de cambios genéticos y en cada uno de estos tipos puede tener características completamente diferentes al resto de los otros tipos de cáncer, pudiendo considerarse como enfermedades independientes, con sus causas, su evolución y su tratamiento específico.

El cáncer es la principal causa de muerte a nivel mundial; en 2015 se calcula que provocó 8.8 millones de defunciones, y se identifican cinco tipos de cáncer responsables del mayor número de fallecimientos: cáncer pulmonar, cáncer hepático, cáncer colorrectal, cáncer gástrico y de mama [2]. De acuerdo con el informe proporcionado por GLOBOCAN sobre de la situación mundial del cáncer en el mundo, ésta enfermedad probablemente aumentará a 27,5 millones de nuevos casos y será la causa de muerte de 16,3 millones personas en el 2040 [3].

2.2 Cáncer de mama

El cáncer de mama se origina cuando las células en el seno comienzan a crecer en forma descontrolada. Estas células normalmente forman un tumor que a menudo se puede observar en una radiografía o se puede palpar como una protuberancia. El cáncer de mama ocurre casi exclusivamente en las mujeres, pero los hombres también lo pueden padecer.

El cáncer de mama es el segundo cáncer más comúnmente diagnosticado (11,6% del total de casos) y la principal causa de muerte por cáncer (18,4% del total de muertes) [3]. Este es el cáncer más común en mujeres, con aproximadamente 2.088.849 nuevos casos previstos anualmente en todo el mundo, lo que representa casi 1 de cada 4 pacientes con cáncer entre las mujeres [4]. Curiosamente, más del 60% de los casos nuevos en todo el mundo y la incidencia de cáncer de mama han aumentado más rápidamente en países como África, Asia, América Central y América del Sur, con el 70% de las muertes por cáncer en estas

El control y la supervivencia varían de acuerdo con la población y la región donde esta neoplasia se presenta. En países pobres y en vías de desarrollo la supervivencia a 5 años es de 30% a 45%, en contraste con países plenamente desarrollados, donde es de 80%. Estos resultados dependen mucho del acceso a la detección oportuna de cáncer (DOC) y

a un tratamiento “óptimo” [2]. De igual manera, las tasas de incidencia varían considerablemente entre regiones y países del mundo. Existe un gran número de estudios epidemiológicos que señalan las causas posibles que provocan la diversidad en el patrón de ocurrencia del cáncer de mama. Entre éstas destacan los factores reproductivos como la edad de la menarquía, de la menopausia y del primer parto, así como el tiempo de lactancia; también son importantes la exposición a terapia hormonal sustitutiva, la obesidad posmenopáusica, la ingesta de alcohol y el acceso a DOC. Asimismo, la mutación de los genes BRCA1 y BRCA2 representa un factor importante para el riesgo de desarrollar esta enfermedad, aunque su impacto en la población general es menor [1].

En México, el cáncer de mama ha presentado un incremento tanto en las tasas de incidencia como en la mortalidad; esta última es consecuencia al diagnóstico tardío y la poca eficacia del programa de DOC. Las últimas estimaciones del IARC (*International Agency for Research on Cancer*) indican que en el año 2013 en nuestro país hubo 23,687 nuevos casos y fallecieron 5,902 pacientes [6]. A partir de 2007, el Seguro Popular incorporó el cáncer de mama al programa denominado de gastos catastróficos, el cual garantizaba la atención gratuita de la enfermedad con tratamientos óptimos en todos los estadios. Sin embargo, con la desaparición de este programa, la expectativa de sobrevivencia de mujeres que padecen esta enfermedad se verá sumamente disminuida.

2.3 Clasificación del cáncer de mama

Los tumores de mama pueden ser clasificados de maneras [1]:

1) Según el grado de invasión

In situ	Se localiza dentro de los conductos galactóforos que conducen leche hasta el pezón.
Infiltrante	Rompe el conducto galactóforo e invade la grasa de la mama que rodea el conducto. Es el tipo más común de cáncer de mama, alrededor del 80% de todos los casos de cáncer de mama son carcinomas ductales invasivos.

2) Según el lugar donde se origina el tumor y el aspecto de las células que lo forman

Lobular	Se origina en las glándulas que fabrican leche.
Ductal:	Presencia de células anormales en el revestimiento de un conducto de la mama.
Medular:	Se denomina medular porque el tumor es una masa suave y pulposa que se parece a una parte del cerebro conocida como bulbo raquídeo o medula.
Coloide:	Un tipo de carcinoma ductal infiltrante, el tumor se forma a partir de células anómalas que flotan en las acumulaciones de mucina, uno de los principales componente de la sustancia viscosa y escurridiza conocida como moco.
Tubular:	El tumor generalmente es pequeño y está formado por células con forma de tubo que son de bajo grado, es decir, que tienen apariencia similar a las células normales sanas y suelen crecer lentamente.
Inflamatorio:	Las células cancerosas bloquean los vasos linfáticos de la piel produciendo una inflamación de la mama.

3) Según las características biológicas y genéticas de las células: el estado de los receptores hormonales y presencia del receptor HER2 [7]

	ER	PR	HER2	Ki67
Luminal A	Positivo	Positivo	Negativo	< 20%
Luminal B	Positivo	(+/-) Positivo	(+/-) Positivo	>20%
HER2 positivo	Negativo	Negativo	Positivo	
Triple negativo	Negativo	Negativo	Negativo	

ER, recertor de estrógeno; PR, receptor de progesterona.

2.4 Etapas del cáncer de mama

Después del diagnóstico de cáncer de mama, los médicos tratarán de averiguar si se ha propagado y de ser así, a qué distancia. Este proceso se llama estadificación. La etapa o estadio describe cuánto hay en el cuerpo, y ayuda a determinar qué tan grave, así como la mejor manera de tratarlo [8]. Los médicos también utilizan la etapa de un cáncer cuando hablan sobre las estadísticas de supervivencia.

El sistema de estadificación que se emplea con más frecuencia es el sistema TNM del *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), que se basa en siete piezas clave de información:

- La extensión del tumor (**T**)
- La propagación a los ganglios linfáticos adyacentes (**N**)
- La propagación (metástasis) a sitios distantes (**M**)
- Estado del receptor de estrógeno (**ER**)
- Estado del receptor de progesterona (**PR**)
- Estado de HER2/NEU (**HER2**)
- Grado histológico del cáncer (**G**)

Los números y las letras después de la T, N y M proporcionan más detalles sobre cada uno de estos factores. Los números más altos significan que el cáncer está más avanzado. Una vez que se han determinado las categorías T, N y M, así como el estado de ER, PR, HER2 y el grado histológico del cáncer, esta información se combina en un proceso llamado agrupación por etapas para asignar una etapa general.

2.5 Tratamiento para cáncer de mama

En la atención de esta enfermedad, participan médicos oncólogos especialistas en diferentes áreas del tratamiento contra el cáncer, como cirugía u oncología médica, trabajando en conjunto para desarrollar un plan de tratamiento integral para la paciente que combine distintos tipos de procedimientos [9].

La biología y el comportamiento del cáncer de mama influyen en el plan de tratamiento. Las opciones y recomendaciones de tratamiento son muy personalizadas y dependen de varios factores, entre ellos:

- El subtipo de tumor, que incluye el estado de los receptores de hormonas (ER, PR) y el estado del HER2.
- El estadio del tumor (TNM).
- La edad de la paciente, el estado de salud general y la menopausia.
- La presencia de mutaciones conocidas en los genes heredados del cáncer de mama, como *BRCA1* o *BRCA2*.

3. La alfa-1 glicoproteína ácida

La alfa-1 glicoproteína ácida (AGP-1), también conocida como orosomucoide, es una glicoproteína sintetizada principalmente por los hepatocitos. Es una proteína de fase aguda y su concentración aumenta hasta cuatro veces respecto a los niveles basales como resultado de un proceso de infección o inflamación [10]. La AGP-1 es principal componente de la fracción de proteínas de seromucoides, con peso molecular de 44kDa, en donde varias cadenas N-glicosídicas contribuyen hasta en un 45% del peso total [11].

Los sitios de N-glicosilación de AGP-1 (Asn-15, -38, -54, -75, -85) pueden portar cualquiera de los glicanos correspondientes a diferentes grados de ramificación (bi, tri y tetraantenaria). Se sabe que los glicanos de AGP-1 son en gran parte responsables de las propiedades farmacocinéticas de la molécula, especialmente la eliminación de AGP-1 [12]

Otros órganos, incluidos el corazón, el estómago y los pulmones, se ha reportado que también sintetizan y secretan AGP-1. El nivel basal de AGP-1 es de aproximadamente 20 μmol en individuos sanos [13].

Las funciones biológicas de la AGP-1 no son completamente conocidas, numerosos estudios *in vitro* e *in vivo* muestran diversas actividades, como la inhibición de la agregación plaquetaria, modulación de la proliferación de linfocitos y el transporte de fármacos [11]. Además, la AGP-1 puede estar involucrada en varios eventos inmunomodulatorios o antiinflamatorios.

En el humano existen dos genes que codifican para AGP (AGP-1 y AGP-2), y ambos se encuentran localizados en el cromosoma 9 [10].

4. Objetivo general

Caracterizar líneas celulares humanas de cáncer de mama en relación a la expresión y secreción de la AGP-1.

4.1 Objetivos secundarios:

- a) Estandarización del método de RT-PCR (punto final y tiempo real) para la identificación y semi-cuantificación de mRNA de AGP-1.
- b) Identificación de la glicoproteína AGP-1 mediante inmunohistoquímica.

- c) Selección de una clona de MCF-7 resistente a Tamoxifeno.
- d) Determinar si existen cambios en la expresión de AGP-1 mediados por citocinas como TNF- α .

5. Hipótesis

Las líneas celulares humanas de cáncer de mama expresan y secretan AGP-1.

6. Justificación

Se ha especulado que AGP-1 desempeña un papel importante en el cáncer, pero su función biológica exacta es todavía confusa. Sin embargo, diversos tipos de cáncer, incluyendo carcinoma hepático, adenocarcinoma gástrico, cáncer epitelial de ovario y cáncer de pulmón, presentan una expresión y secreción aumentada de la proteína AGP-1. En pacientes con cáncer de mama, el aumento en los niveles de AGP-1 en plasma parece correlacionar con la progresión tumoral, ya que estos retornan a la normalidad posterior a tratamiento con tamoxifeno.

Existen pocas evidencias que muestran que las células tumorales de mama secretan AGP-1. El análisis de una base de datos compuesta por 1,602 muestras de biopsias de cáncer de mama reunidos por el *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) (<https://cancergenome.nih.gov/>), muestra que existe actividad transcripcional detectable del gen de AGP-1, principalmente en los tipos ductal y medular. Por otra parte, la base de datos del *The Human protein Atlas* (<https://www.proteinatlas.org/>) muestra por inmunohistoquímica la expresión de la proteína en 43% (14/32) tumores de mama. Adicionalmente, en un estudio piloto realizado en el laboratorio se encontró mediante técnicas de inmunohistoquímica, la presencia de AGP-1 en 7/14 tejidos de cáncer mama. No obstante, los resultados no pudieron ser correctamente evaluados ya que se desconocía la institución que proporcionó los tejidos y los datos clínicos de las pacientes. A pesar de esto, se sugirió que algunos tumores de mama tienen la capacidad de sintetizar AGP-1, aunque desconocemos si ésta expresión tiene alguna relevancia biológica para el mantenimiento o la progresión tumoral.

Así, resulta relevante el conocer los patrones de expresión del gen de AGP1 y su producto en distintas líneas celulares comerciales de cáncer de mama, con el propósito

de contar con un modelo *in vitro*, que pueda ser aprovechado para investigar si AGP-1 puede desempeñar un papel relevante en la progresión del cáncer de mama.

7. Metodología

7.1 Líneas celulares

Cinco líneas celulares de cáncer de mama, obtenidas del reservorio internacional de ATCC, fueron mantenidas bajo condiciones de cultivo *in vitro*. La línea celular INER-37 corresponde a un adenocarcinoma, fue generada en el laboratorio a partir de un derrame pleural de un paciente con cáncer primario de pulmón.

Para su mantenimiento en cultivo *in vitro*, todas las líneas celulares fueron cultivadas en frascos T₂₅ o T₇₅ (Costar) con medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma, Co), suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sodio, a 37 °C en atmósfera húmeda con 5 % de CO₂.

7.2 Purificación de RNA

El RNA total fue extraído utilizando el reactivo de TRIZOL (Invitrogen), utilizando el siguiente protocolo:

1. A partir de un frasco T25 en semi-confluencia, las células fueron despegadas por tratamiento con tripsina y se resuspendieron en 1 ml de **PBS**.
2. Se obtuvo un paquete celular (aprox. 1×10^6 células) por centrifugación
3. Se agregó 1 ml de trizol y homogenizar en vortex
4. Se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente
5. Se agregó 200µL de cloroformo, agitar suavemente por inversión e incubar por 3 min.
6. Se centrifugó a 14,000 rpm /15 min/ 4 °C
7. La fase acuosa fue transferida a otro tubo, y se adicionaron 500µL de isopropanol, para posteriormente incubar RT por 10 min.
8. Se centrifugó a 14,000 rpm /10 min / 4 °C
9. Se procedió a lavar con 1 ml de etanol con dietilpirocarbonato (ETOH_{DEPC}) al 75%, agitar suavemente y centrifugar 14,000 rpm /5 min / 4 °C.

10. Se resuspendió en agua con dietil-pirocarbonato (H_2O_{DEPC}) y se almacenó a $-20^{\circ}C$.

7.3 Síntesis cDNA

Para la síntesis de cDNA, se realizó el siguiente procedimiento:

1. A $5\ \mu g$ de RNA total se les hizo reaccionar con $1\ \mu l$ de oligo-dT, $200\ mM$ de dNTPs y $2\ \mu l$ de DTT, $1\ \mu l$ de RT (Superscript II RT- Invitrogen), en un volumen final de $20\ \mu l$.
2. La reacción se llevó a cabo durante $60\ min$ a $42^{\circ}C$ y fue detenida por calentamiento a $70^{\circ}C$ durante $15\ min$.
3. Con el fin de eliminar los híbridos RNA-cDNA, la muestra fue tratada con $2.5\ U/\mu l$ de RNasa-H⁻ durante $30\ min$. a $37^{\circ}C$.

7.4 RT-PCR

- 1) La amplificación por PCR se llevó a cabo con $0.5\ \mu l$ de cDNA, $50\ pM$ de cada cebador, $30\ \mu M$ de dNTPs, $2.5\ U$ de Taq DNA polimerasa, $1.5\ mM$ $MgCl_2$, todo en un volumen final de $25\ \mu l$.
- 2) La reacción de PCR se llevó a cabo por 35 ciclos ($94^{\circ}C$ por $1\ min$, T_m por $2\ min$ y $72^{\circ}C$ por $3\ min$), utilizado un termociclador (Progamed Thermo Controller, model PTC-100, MJ Research, Inc). La T_m óptima de cada reacción de amplificación fue calculada a partir del promedio las T_m de cada cebador, utilizando el programa "primer-blast" (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)
- 3) Los productos amplificados fueron separados por geles de agarosa al 1.2% , visualizados con SYBR Green (Applied Biosystems) y fotografiados.

La secuencia de los oligos empleados en estos experimentos se muestra en la Tabla 2.

Gen	Sentido	Antisentido	Amplicon (pb)	Tm
AGP1-3'	5'-ccttcttttacttcacccccaa-3'	5'-catagacagacagccccagttc-3'	243	58 °C
AGP1-5'	5'-ctcagtatggcgctgcctg-3'	5'-ccttcttttacttcacccccaa-3'	221	63 °C
AGP1-3'/5'	5'-ccttcttttacttcacccccaa-3'	5'-ccttcttttacttcacccccaa-3'	442	58 °C
Actina	5'-agagctacgagctgcctgac-3'	5'-agcactgtgtggcgctacag-3'	184	55 °C
GAPDH	5'-tggggaaggtgaaggcgga-3'	5'-gaaggggtcattgatggcaa-3'	110	58 °C

Tabla 2. Secuencia de oligonucleótidos empleados amplifica en experimentos de RT-PCR distintos fragmentos del gen de AGP-1 y los genes constitutivos de actina y GAPDH.

7.5 Inmunohistoquímica (IHQ) anti-AGP1

Para el desarrollo de la técnica se empleo el kit de “*Vectastain/HRP anti-ratón*” mediante el siguiente protocolo:

1. La estufa se calentó a 55°C y metieron las laminillas durante 30 minutos.
2. Posteriormente se hidrato con pasos desde xilol a agua, pasando por etanol absoluto, etanol 96°, etanol 70°... cada paso es por 10 minutos.
3. Posteriormente, se lavaron con solución salina tamponada con tris-HCl y Tween 20 (TBST) durante 5 minutos en un vaso de coplin.
4. Las laminillas se cambiaron a un vaso de coplin especial para microondas.
5. Se procedió a realizar la “recuperación de el antígeno” en amortiguador de citratos al hervir por 5 minutos en microondas.
6. Se dejó enfriar por 20 minutos sin cambiar de solución.
7. Después se lavó con TBST (20 mM Tris-HCl, 0.1% tween-20 y 150 mM NaCl) por 5 minutos.
8. A continuación, se limpiaron las laminillas con una gasa y delimito al tejido con una crayola. Se colocó en cámara húmeda.

9. Se realizó el bloqueo con peroxidasa endógena. Añadiendo 100µL de peróxido de hidrogeno (H₂O₂) al 30% de grado reactivo y 900µL de agua y extender en toda la muestra. Se dejó incubar 10 minutos.
10. Después se decantó el exceso de solución sacudiendo las laminillas de manera lateral para escurrir soluciones.
11. A continuación, se lavó con TBST por 5 minutos.
12. Se puso suero bloqueador 1 gota/2 mL de TBST por 30 min a por 30 min a 37°C. Y se guardó el restante para la adición del anticuerpo.
13. Posteriormente se decantó e incubo con el anticuerpo primario en la solución TBST + suero bloqueador.
14. Las laminillas se guardaron en “cámaras húmedas” y refrigeración por 24 h.
15. Al siguiente día, se sacaron las “cámaras húmedas” y se dejaron a temperatura ambiente por 20 minutos.
16. Después se lavó dos veces con TBST por 5 minutos cada una.
17. Las laminillas se incubaron con el anticuerpo secundario universal biotinilado por 30 min a 37°C
18. Nuevamente, las laminillas se lavaron dos veces con TBST por 5 minutos.
19. Se incubó con el complejo AB/HRP durante 10 minutos a temperatura ambiente en la cámara húmeda tapada.
20. Se lavaron dos veces con TBST por 5 minutos.
21. Se procedió al revelado con 3,3'-Diaminobenzidina.
22. Finalmente, se hizo una contratinción con hematoxilina de Meyer.

8. Actividades realizadas

- a) Mantenimiento y propagación *in vitro* de líneas celulares de cáncer de mama.
- b) Amplificación de mRNA mediante técnica de RT-PCR.
- c) Inmunohistoquímica en líneas celulares y tejidos humanos obtenidos por biopsia.
- d) Cuantificación de proteína

9. Resultados

Se cultivaron las líneas celulares de cáncer de mama denominadas MCF-7 y MDA-MB-231. Las células HepG2 correspondientes a un cáncer humano de hígado, se emplearon como control positivo, mientras que línea celular de un adenocarcinoma de pulmón denominada INER-37 fue utilizada como un control de células no relacionadas al cáncer de mama.

Todas las líneas celulares de mama fueron muy homogéneas en tamaño y forma, formando monocapas con células estrechamente unidas. Lo contrario fue observado en los cultivos de las células HepG2, ya que frecuentemente se formaron agregados multicelulares conocidos como esférulas (Figura 1 A). En el caso de INER-37, la línea celular presentó mayor pleomorfismo con células de diferente tamaño, y número de núcleos; aunque en confluencia también llegó a formar verdaderas monocapas (Figura 1D).

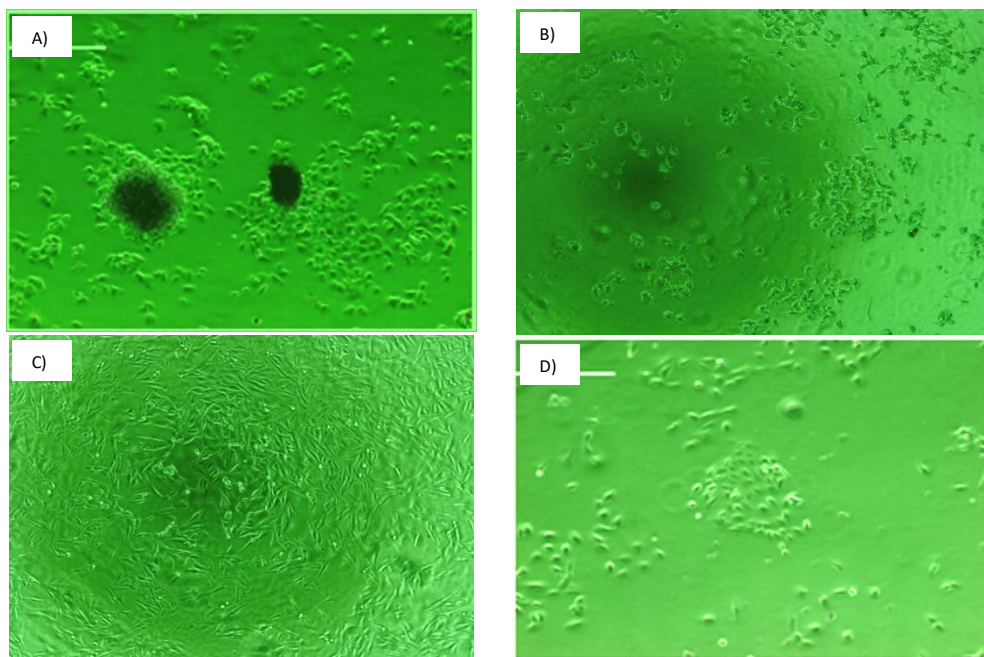


Figura 1. Fotografías del cultivo *in vitro* de líneas celulares. A) HepG2 (Ca. hígado), B) MCF-5 (Ca mama), C) MDA-MB-231 (Ca. mama) ,y D) INER-37 (adenocarcinoma de pulmón).

Con el propósito de analizar la expresión de AGP-1 en las líneas celulares, se trabajó en la estandarización de la técnica de amplificación de cDNA mediante RT-PCR. Una muestra representativa de este tipo de experimentos se presenta en la figura 2. En el carril 1, se observa una banda de amplificación para AGP-1 de 243 pb correspondiente al cDNA de HepG2 (nuestro control positivo), la cual fue del tamaño esperado según la secuencia de RNA. El carril 2, corresponde a una reacción de amplificación de HepG2 pero con la mitad del volumen de reacción de cDNA, y en donde también se observa la banda de amplificación con el tamaño esperado. El carril 3, corresponde al cDNA de INER-37 (tumor de pulmón), en donde aparecen tres bandas de amplificación: una correspondiente al tamaño esperado de 243pb y otras dos de mayor tamaño (aprox. 350 pb y 700 pb), lo que sugiere la presencia de eventos de mutaciones en el fragmento génico analizado

En el caso de la amplificación del cDNA sintetizado a partir de las líneas de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231, no se encontró ninguna banda de amplificación, por lo que se concluyó que estas líneas celulares no expresaron la proteína AGP-1.

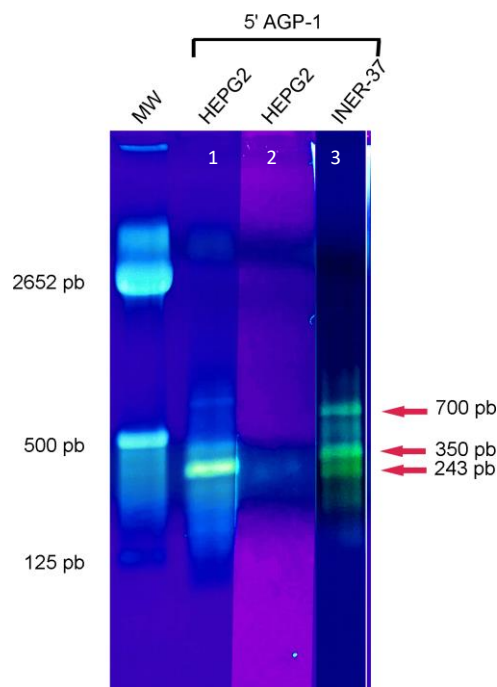
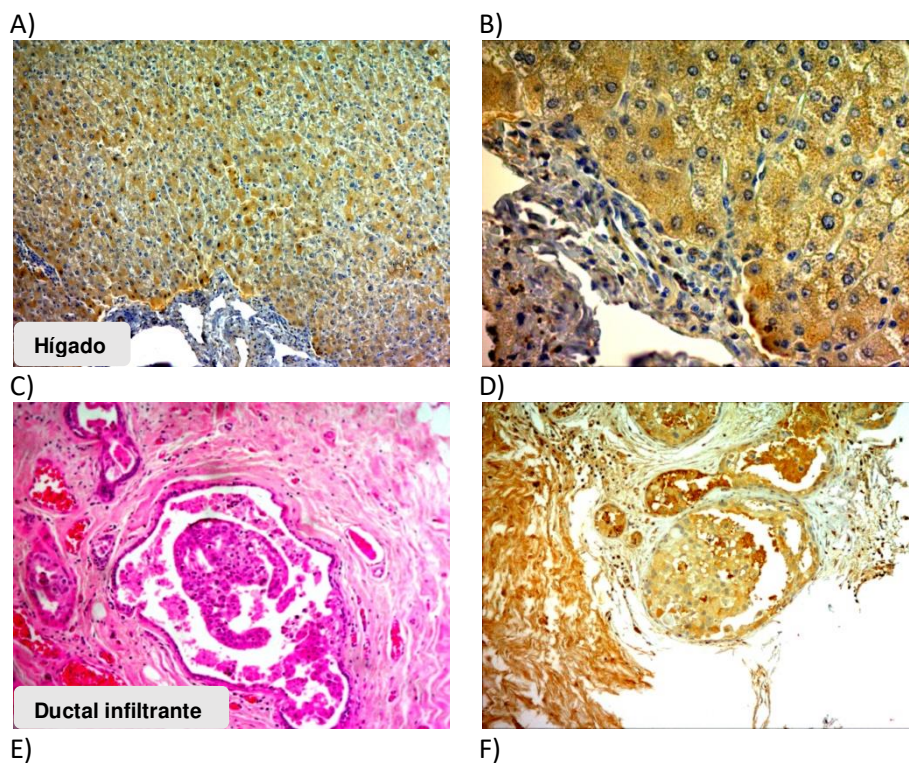


Figura 2. Amplificación de mRNA de AGP-1 por RT-PCR. Línea 1 y 2, HepG2 (0.5 uL y 0.25 uL de cDNA, respectivamente); línea 3, INER-37 (0.5 uL cDNA). La banda de amplificación en la línea 1 corresponde al tamaño previsto de 243 pb para el fragmento de cDNA de AGP-1.

Con el propósito de determinar si los tumores de mama pueden expresar AGP-1, se implementó un protocolo de inmunohistoquímica. Para ello se obtuvieron 10 muestras de biopsias de pacientes con cáncer de mama, las cuales fueron proporcionadas por el departamento de Patología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMMyNSZ). Ocho de ellas fueron clasificadas como ductal infiltrante, 1 como ductal *in situ* y en un caso fue mucinoso (Figura 3G y H).

Para esta estandarización de la técnica, se empleó como control positivo hígado humano sin patología aparente. Como se esperaba, la inmunodetección de AGP-1 en el tejido hepático mostro alta positividad en los hepatocitos, encontrándose ésta primordialmente localizada en la región citoplásmica de las células (Figura 3A y B).

En relación a la tinción con diaminobenzidina para los tejidos de cáncer de mama, se encontró que todas presentaron una positividad citoplasmática para AGP-1, caracterizado por un color café (figura 3B, D, F y H), con lo que pudimos corroborar la presencia de la proteína AGP-1 en este tipo de tumores. Adicionalmente se realizó una tinción con hematoxilina y eosina en laminillas de control, con el propósito de contrastar las estructuras morfológicas de los tejidos y tener la seguridad del tipo histológico al que corresponde cada tipo de muestra (figura 3C,E y G).



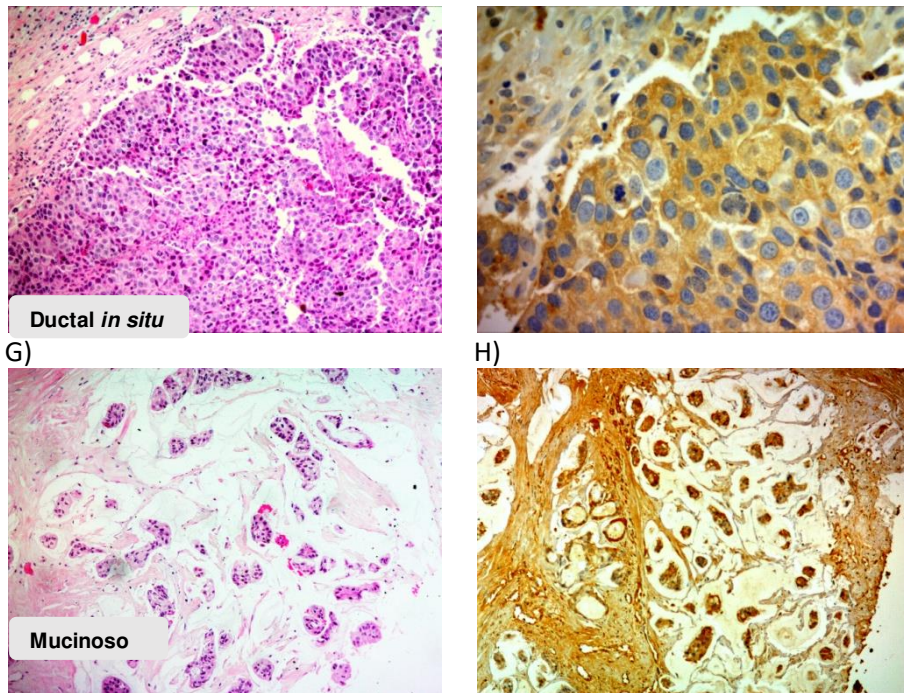


Figura 3. Inmunihiistoquímica para AGP-1. A y B tejidos de hígado humano, empleado como control positivo, observados a 10X y 40X respectivamente. C y D: cáncer de mama ductal infiltrante; E y F cáncer de mama ductal *in situ*; G y H muestra con cáncer de mama mucinoso. C, E y G corresponden a tinción de hematoxilina y eosina y D, F y H, reacción de IHQ de los mismos tejidos.

10. Discusión

La AGP-1 es una proteína de fase aguda, sintetizada principalmente por los hepatocitos. El análisis de la expresión de AGP-1 en distintas líneas celulares de cáncer se llevó a cabo mediante RT-PCR de acuerdo a la metodología señalada, empleando la línea HepG2 como control positivo.

Los resultados mostraron que las líneas de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231 no expresan mRNA de AGP-1. Tampoco se encontró expresión de AGP-1 por parte de la línea celular HeLa (cáncer de cérvix). Sin embargo, la línea celular INER-37 (cáncer de pulmón) fue la única línea celular que expresó el mRNA para AGP-1.

En la literatura revisada se ha encontrado reportes que prueban la expresión de mRNA para AGP-1 en células cancerígenas no hepáticas. Por ejemplo, Lee SY *et. al.* reportaron expresión del mRNA de AGP-1 en varias líneas células tumores no hepáticos, tales como células de carcinoma de cuello uterino ME-180 y HeLa, las

células de cáncer de mama MCF-7, células de carcinoma de colon HT-29, células de fibrosarcoma HT-1080, células de linfoma H-9 y células de leucemia HL-60 [15]. En su reporte, no encontraron expresión de AGP-1 en linfocitos, fibroblastos y uterino normal o células epiteliales de la mucosa del colon normal [15]. Estas observaciones coinciden con nuestros resultados de que una línea celular de cáncer de pulmón (INER-37), puede expresar mRNA para AGP-1. Sin embargo, nosotros no encontramos expresión en de AGP-1 en las líneas celulares MCF-7 y células HeLa. En nuestro estudio encontramos que las líneas celulares correspondiente a cáncer de mama no expresaron la proteína, es posible que las líneas celulares dejaron de expresar mRNA por las condiciones de cultivo (gen apagado), pero los tumores in vivo si lo pueden hacer. Adicionalmente, las diferencias entre los resultados también pueden por otras razones tales como: 1) diferencias en las condiciones de cultivo, 2) la autenticación de las líneas celulares y 3) las secuencias de los cebadores utilizadas para la amplificación por RT-PCR.

Respecto a la inmunohistoquímica, en los 10 cortes histológicos de tumores de mama analizados se observó positividad para AGP-1. En este caso, todos los tejidos analizados correspondieron a tumores en etapas avanzadas, lo cual puede ser una diferencia con respecto al análisis de expresión de RNA en las líneas celulares de cáncer de mama. En un estudio previo, se encontró mediante técnicas de inmunohistoquímica, la presencia de AGP-1 en tejido mamario epitelial principalmente de tipo ductal infiltrante [17], por lo que nuestros resultados corroboran los hallazgos encontrados previamente.

Cada vez existen más evidencias de que los tumores no hepáticos sintetizan AGP-1. Así, en un estudio se encontró que los niveles de expresión de mRNA para AGP-1 fue más alto en pacientes con cáncer de laringe respecto a un grupo al grupo sano [16], mientras que otra investigación mostró que el incremento de AGP-1, correlaciona con la progresión del tumor en pacientes con cáncer laríngeo [13]; además, Young Soo et al. reportaron que la regulación al alza de los mRNA de AGP-1 debilita la potencia maligna por un mecanismo intracelular desconocido sin la acción del AGP-1 secretado [16]. Nuestros resultados muestran que algunos tumores de mama tienen a capacidad de sintetizar AGP-1 pero aún desconocemos si existe una asociación directa entre los niveles de expresión de AGP-1 y el grado de avance del cáncer de mama, ya que todos fueron de etapas avanzadas.

Sin embargo, de acuerdo las evidencias anteriores, podemos suponer que la AGP-1 puede ser un biomarcador celular para algunos tipos de cáncer, ya sea de mama o de otro tipo, ya como vimos la AGP-1 es expresada por otros órganos además del hígado.

Para aumentar nuestro conocimiento de este fenómeno, será necesario incrementar el número de muestras y realizar más pruebas que complementen nuestra observación obtenida para así tener el respaldo necesario y proponer a esta proteína como un posible biomarcador para cáncer de mama.

11. Conclusión

No se identificó el mRNA para AGP-1 en las líneas celulares de cáncer de mama analizadas por RT-PCR. Sin embargo, se identificó la glicoproteína mediante inmunohistoquímica en tejidos humanos obtenidos por biopsia.

12. Recomendaciones.

- Realizar el análisis de más tejidos de biopsia y líneas celulares de cáncer de mama para poder realizar una correlación de la cantidad de la glicoproteína y el estado clínico de la enfermedad, y de esta forma proponer a la AGP-1 como un posible marcador tumoral.

13. Bibliografía

1. En National Cancer Institute: <https://www.cancer.gov/types/breast/hp>
2. <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/informacion-estadistica>, revisada el 15 de abril 2019.
3. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. (2018) Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA Cancer J Clin ;68(6):394-424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
4. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics 2020. CA Cancer J Clin. 2020;70(1), 7-30. <https://doi.org/10.3322/caac.21590>

5. Jesús C, Juan Enrique B, Verónica B, et.al, Consenso Mexicano sobre diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario. *Gaceta Mexicana de Oncología* 216, vol 16, Suppl 1.
6. En Organización Mundial de la Salud:
<https://www.who.int/topics/cancer/breastcancer/es/index2.html>, revisada el 15 de abril de 2019.
7. Anjum F, Razvi N, Masood MA. (2017). Breast cancer therapy: a mini review. *MOJ Drug Des Develop Ther*; 1(2):35–38.
8. Baldassarre G, Belletti B. (2016); Review, Molecular biology of breast tumors and prognosis [versión 1; referees: 3 approved], F1000Research faculty rev: 711
9. Ban K, Godellas C. Epidemiology of breast cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. 2014 Jul;23(3):409-22. doi: 10.1016/j.soc.2014.03.011
10. Luo Z, Lei H, Sun Y, Liu X, Su D. (2015); Mini Review Orosomucoid, an acute response protein with multiple modulating activities; *J Physiol Biochem*; 71:329-340
11. Fournier T, Medjoubi-N N, Porquet D. (2000), Alpha-1-acid glycoprotein: review. *Biochimica et biophysica Acta* 1482: 157-171
12. Smith K, Behan J, Smith G and Magliocco A. Capítulo Alpha Glycoprotein (AGP) as a Potential Biomarker for Breast Cancer
13. Taguchi K, Nishi K, Giam V, Maruyama T, Otagiri M. Chapter 6 Molecular Aspects of Human Alpha-1 Acid Glycoprotein — Structure and Function
14. Zhang Y, Wang Z, Bai X, Xu Y. AGP1 acts as a biomarker for diagnosis of laryngeal cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2018;11(10):4996-500
15. Lee SY, Lim JW, Kim YM, Lee IH, et al (2000) Induction of α 1 Acid Glycoprotein mRNA by Cytokines and Differentiation in Human Colon Carcinoma Cell. *Moll. Cells*, Vol. 11. No. 2, pp. 164-169
16. Lee SY, Lim JW, Kim YM. (2001); Effect of α 1-Acid Glycoprotein Expressed in Cancer Cells on Malignant Characteristics; *Moll. Cells*, Vol. 11. No. 3, pp. 341-345
17. Alfaro, A. (2014), presencia de la glicoproteína α -1 acida en tejido tumoral mamario (tesis de pregrado). Universidad Nacional Autónoma de México.



Unidad Xochimilco

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Licenciatura en Química Farmacéutica Bióloga

Liliana Santos Castro

Matricula: 212033281

Proyecto: análisis de la expresión de la sialoglicoproteína AGP-1 en líneas celulares de tumores de mama y su posible relación con la progresión tumoral.

Instituto nacional de enfermedades respiratorias

"Ismael Cosío Villegas"

1 de octubre 2018 al 1 de abril 2019

M. en C. Alejandro Palma Ramos

Asesor interno 15741

Dr. Raúl Barrera Rodríguez

Asesor externo

Introducción

El cáncer de mama es el tipo más común diagnosticado en mujeres en todo el mundo. Se estima que cada año se diagnostican cerca de 1.67 millones de mujeres con cáncer de mama y 522,000 pacientes fallecen por esta enfermedad. El control y la supervivencia varían de acuerdo con la población y la región donde esta neoplasia se presenta. A pesar de que la incidencia global continúa incrementando, los datos de mortalidad por cáncer de mama muestran una disminución, en parte como resultado del diagnóstico precoz mediante cribado mamográfico, mejores técnicas quirúrgicas con atención a los márgenes, mejoras en los tratamientos de radioterapia y mejores terapias adyuvantes.

La AGP-1 es una glicoproteína sintetizada principalmente por los hepatocitos, es una proteína de fase aguda y su concentración aumenta como resultado de un proceso de infección o inflamación. Durante los últimos años se le han asignado varias propiedades biológicas, entre las que destacan su capacidad para modular la respuesta quimiotáctica, agregación plaquetaria y la activación de neutrófilos. Por este motivo AGP-1 ha sido objeto de estudio en diversos tipos de cánceres tales como colon, cabeza y cuello, hígado y pulmón. En pacientes con cáncer de mama, el aumento en los niveles de AGP-1 en plasma parece correlacionar con la progresión tumoral, ya que estos retornan a la normalidad posterior a tratamiento con tamoxifeno.

Debido a los hallazgos sobre la relación de esta proteína con diversos carcinomas, en el presente proyecto se pretende caracterizar líneas celulares de cáncer de mama en relación con la expresión y secreción de AGP-1. Por lo que se realizara la estandarización del método de RT-PCR (punto final) para identificación de mRNA de AGP-1 en células tumorales y la Identificación de la glicoproteína AGP-1 mediante inmunohistoquímica e inmunocitoquímica.

Objetivo general

Caracterizar líneas celulares humanas de cáncer de mama en relación a la expresión y secreción de la AGP-1.

Objetivos secundarios:

- e) Estandarización del método de RT-PCR (punto final y tiempo real) para la identificación y semi-cuantificación de mRNA de AGP-1.
- f) Identificación de la glicoproteína AGP-1 mediante inmunohistoquímica.

- g) Selección de una clona de MCF-7 resistente a Tamoxifeno.
- h) Determinar si existen cambios en la expresión de AGP-1 mediados por citocinas como TNF- α .

Conclusión

No se identificó el mRNA para AGP-1 en las líneas celulares de cáncer de mama analizadas por RT-PCR. Sin embargo, se identificó la glicoproteína mediante inmunohistoquímica en tejidos humanos obtenidos por biopsia.

Bibliografía

18. En National Cancer Institute: <https://www.cancer.gov/types/breast/hp>
19. <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/informacion-estadistica>, revisada el 15 de abril de 2019.
20. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. (2018) Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA Cancer J ;68(6):394-424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
21. En Organización Mundial de la Salud: <https://www.who.int/topics/cancer/breastcancer/es/index2.html>, revisada el 15 de abril de 2019.
22. Anjum F, Razvi N, Masood MA. (2017). Breast cancer therapy: a mini review. MOJ Drug Des Develop Ther; 1(2):35–38.
23. Baldassarre G, Belletti B. (2016); Review, Molecular biology of breast tumors and prognosis [versión 1; referees: 3 approved], F1000Research faculty rev: 711
24. Fournier T, Medjoubi-N N, Porquet D. (2000), Alpha-1-acid glycoprotein: review. Biochimica et biophysica Acta 1482: 157-171