

Determinación de proteínas carboniladas y enzima carbonil reductasa en mujeres mexicanas con cáncer de mama: estudio piloto

José Gutiérrez-Salinas^{1*}, Liliana García-Ortiz², Paul Mondragón-Terán³, Sergio Hernández-Rodríguez¹, Sotero Ramírez-García⁴ y Norma Rebeca Núñez-Ramos⁴

¹Laboratorio de Bioquímica y Medicina Experimental, División de Investigación Biomédica, Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, ISSSTE, México, D.F., México; ²División de Medicina Genómica, Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, ISSSTE, México, D.F., México; ³Laboratorio de Medicina Regenerativa e Ingeniería de Tejidos, División de Investigación Biomédica, Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, ISSSTE, México, D.F., México; ⁴Uromédica OSF, México, D.F., México

Resumen

El estrés oxidativo puede promover el desarrollo de cáncer, y las proteínas carboniladas pueden tener una participación en el proceso de carcinogénesis. El propósito del presente estudio fue determinar las concentraciones de proteínas carboniladas y de enzima carbonil reductasa como indicadores de daño tisular causado por la enfermedad en mujeres con cáncer de mama. Se incluyeron 120 mujeres sanas y 123 con el diagnóstico clínico de cáncer de mama. Usando métodos de ELISA, se determinó la concentración de proteínas carboniladas en plasma y la de enzima carbonil reductasa en los leucocitos. Las mujeres con cáncer de mama presentaron un incremento de 3.76 veces en la cantidad de proteínas carboniladas en su plasma, en comparación con el grupo control (5 ± 3.27 vs. 1.33 ± 2.31 nmol carbonilos/mg proteína; $p < 0.05$). Además, se observó un incremento del 60% en la concentración de la enzima carbonil reductasa ($3.27 \pm 0.12.4$ vs. 2.04 ± 0.11 ng/mg proteína; $p < 0.05$). Se encontró una correlación positiva entre ambos parámetros ($r = 0.95$; $p < 0.001$). Los resultados sugieren la existencia de un daño general al organismo provocado por el cáncer, por lo que existe la posibilidad de poder usarse como biomarcador de daño.

PALABRAS CLAVE: Cáncer de mama. Carbonil reductasa. Proteínas carboniladas. Radicales libres. Estrés oxidativo.

Abstract

Oxidative stress could promote the development of cancer and implicate carbonylated proteins in the carcinogenic process. The goal of this study was to assess the concentrations of carbonylated proteins and carbonyl reductase enzyme in women with breast cancer and determine whether these markers were possible indicators of tissue damage caused by the disease. A total of 120 healthy women and 123 women with a diagnosis of breast cancer were included. The concentration of carbonylated proteins in plasma and the concentration of carbonyl reductase enzyme in leukocytes were determined using

Correspondencia:

*José Gutiérrez Salinas
Laboratorio de Bioquímica y Medicina Experimental
División de Investigación Biomédica
Centro Médico Nacional 20 de Noviembre
ISSSTE
San Lorenzo, 502, 2.º piso
Col. del Valle, C.P. 03100, México, D.F., México
E-mail: quauhtlicutli@yahoo.com

Fecha de recepción en versión modificada: 16-07-2015

Fecha de aceptación: 22-07-2015

the ELISA assay. There was a 3.76-fold increase in the amount of carbonylated proteins in the plasma from the patient group compared with healthy control group (5 ± 3.27 vs. 1.33 ± 2.31 nmol carbonyls/mg protein; $p < 0.05$). Additionally, a 60% increase in the carbonyl reductase enzyme was observed in the patient group compared with the healthy control group (3.27 ± 0.124 vs. 2.04 ± 0.11 ng/mg protein; $p < 0.05$). A positive correlation ($r = 0.95$; $p < 0.001$) was found between both measurements. These results suggest the presence of tissue damage produced by cancer; therefore, these parameters could be used to indicate tissue damage in cancer patients. (Gac Med Mex. 2016;152:13-8)

Corresponding author: José Gutiérrez Salinas, quauhtlicutli@yahoo.com

KEY WORDS: Breast cancer. Carbonyl reductase. Carbonyl protein. Free radical. Oxidative stress.

Introducción

El cáncer de mama es uno de los problemas de salud más importantes en nuestro país y ocupa los primeros lugares de morbilidad entre las mujeres económicamente activas a nivel mundial. Los factores reproductivos, como la edad de la menarca, la paridad, la edad del primer embarazo, la lactancia y la edad de la menopausia, son considerados factores de riesgo¹. La transformación maligna de las células se produce durante la división celular y se transfiere al resto de células durante su reproducción. Dichas transformaciones pueden transferirse al resto de células durante la mitosis, la cual se ve incrementada por factores internos o externos, como los niveles de estrógenos y los factores de crecimiento, así como por la presencia de estrés oxidativo inducido por el medio ambiente²⁻⁴.

Las especies reactivas derivadas del oxígeno normalmente se producen durante los procesos metabólicos de la célula, principalmente durante la respiración en las mitocondrias, además de poder ser inducidas por factores externos como las radiaciones y tóxicos ambientales⁴⁻⁷. El desbalance entre la generación de radicales libres y los sistemas antioxidantes del organismo puede producir daño oxidativo a diversos macromoléculas de la célula, como los lípidos, los carbohidratos, las proteínas y los ácidos nucleicos. Se piensa que el daño a los ácidos nucleicos inducido por los radicales libres puede ser un factor importante en el desarrollo de cáncer⁴⁻⁷.

Se ha podido asociar la detección y cuantificación de diversos marcadores biológicos de estrés oxidativo con un incremento en el riesgo de desarrollar algún tipo de cáncer y con su evolución. Dentro de esos marcadores se incluye la detección de proteínas carboniladas, las cuales son el producto directo de la acción de los radicales libres sobre las proteínas⁴⁻⁸. Por todo ello, el objetivo del presente trabajo fue

determinar la presencia de proteínas carboniladas y de la enzima carbonil reductasa en mujeres con cáncer de mama como indicador de daño y progresión de la enfermedad.

Material y métodos

Se incluyeron 123 mujeres (de 26 a 80 años) con el diagnóstico clínico de cáncer de mama primario que acudieron a un hospital privado, en donde, previo consentimiento informado, se les realizó la historia clínica completa y análisis generales de laboratorio y gabinete, que fueron integrados a su expediente. Como requisito de selección, se eligieron pacientes que en el momento de realizar el estudio no recibieran ningún tipo de tratamiento, ya fuera quimioterapia, quirúrgico o radioterapia. Como grupo control, se seleccionaron mujeres sanas ($n = 120$), pareadas por edad con los casos y que, según los datos clínicos de laboratorio y gabinete, no presentaban ningún tipo de cáncer.

Tanto al grupo de pacientes como al de los controles se les tomó una muestra de sangre por venopunción usando un sistema Vacutainer con anticoagulante ácido etilendiamino-tetra-acético (EDTA). La muestra fue centrifugada a 2,500 rpm por 15 min. Se aisló el plasma, el cual fue inmediatamente congelado y almacenado hasta su uso posterior. Los leucocitos fueron recolectados y lavados tres veces con solución salina isotónica fría (pH 7), usando centrifugación a 5,000 rpm por 10 min cada vez. Se usaron los leucocitos para determinar la concentración de la enzima carbonil reductasa.

Para determinar la presencia de las proteínas carboniladas en el plasma tanto de las pacientes como del grupo control, se utilizó un kit comercial de reactivos (Thommpson, Co, EE.UU.); siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante, se hizo la lectura a 540 nm en un espectrofotómetro (Genesis-20, Spectronic Inc., EE.UU.). El método de detección de las proteínas carboniladas se basó en el procedimiento descrito por Michelis, et al.⁸, el cual hace reaccionar

Tabla 1. Características clínicas generales de las mujeres que presentaron cáncer de mama (pacientes) y las mujeres sanas (controles) incluidas en el estudio

Características	Pacientes (n = 123) promedio ± DS (rango)	Control (n = 120) promedio ± DS (rango)
Edad (años)	52.83 ± 8.98 (26-80)	55.76 ± 0.85 (25-78)
Menarca (años)	12.81 ± 1.34 (10-16)	12.03 ± 0.87 (11-14)
Edad del 1.º nacimiento	22.78 ± 4.99 (15-37)	21.52 ± 3.01 (16-36)
Paridad	3.73 ± 2.46 (0-8)	3.02 ± 1.50 (0-10)
Edad de la menopausia*	44.48 ± 11.54 (41-55)	43.95 ± 4.21 (42-58)
Historia familiar de cáncer de mama (%)	86.96	-
Edad al diagnóstico (años)	49.5 ± 8.78 (26-78)	-
Tiempo de evolución (años)	3.34 ± 3.49 (0-6)	-
Localización, %(n)		
Izquierdo	39.02 (48)	-
Derecho	60.97 (75)	-
Metástasis, %(n)	47.96 (59)	-
Tipo de tumor, %(n)		
Carcinoma ductal infiltrado	86.96 (107)	-
Otros	13.04 (16)	-
HER2+, %(n)	28.45 (35)	-
Grado nuclear, %(n)		
I o II	14.63 (18)	-
III	85.36 (105)	-
Receptor de estrógenos, %(n)		
Positivo	78.05 (96)	-
Negativo	13 (16)	-
Desconocido	8.94 (11)	-

*Cuando corresponda: para las pacientes: n = 107; para los controles: n = 96.

en un ambiente ácido la 2-4-dinitrofenilhidrazina con los grupos carbonilo de las proteínas. El producto derivado es determinado espectrofotométricamente usando una curva patrón incluida en el kit. Por otro lado, la enzima carbonil reductasa fue determinada en un extracto total de leucocitos preparado usando una solución de lisis (Tritón X-100 0.2%, EDTA 5 mM, en solución salina isotónica de fosfatos, pH 7), sometiendo a tres «golpes» de 5 s cada uno con sonicador (Ultra Turrax Inc., EE.UU.). El homogenado se centrifugó a 5,000 g por 15 min y se recuperó el sobrenadante para determinar la concentración de la enzima carbonil reductasa usando un kit comercial de ELISA (USCN, Life Science Inc., EE.UU.), siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. En todos

los casos, la concentración de proteína se determinó siguiendo el método descrito por Lowry, et al.⁹ y usando albúmina de suero bovina como estándar.

Análisis estadístico

Se analizaron los resultados usando una base de datos Excel (Microsoft Corporation) y el programa estadístico GraphPad Prism, versión 4.03 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EE.UU.). Los resultados se analizaron utilizando t de Student no pareada con corrección de Welch y la asociación entre variables por medio del coeficiente de Spearman. Para todos los casos se tomó en cuenta una p < 0.05 como estadísticamente significativa.

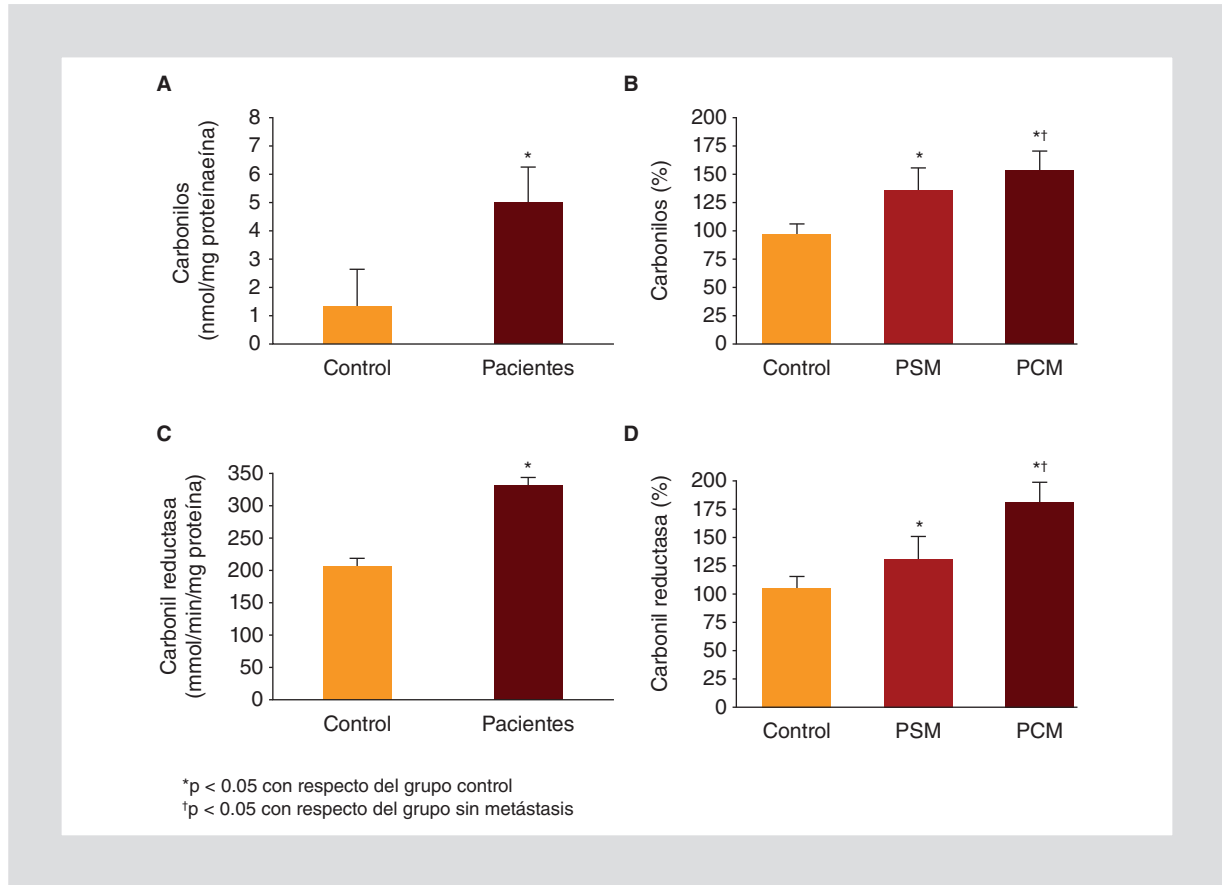


Figura 1. Concentración de proteínas carboniladas (A) y carbonil reductasa (B) en mujeres sanas (controles) y mujeres con cáncer de mama, y porcentaje de proteínas carboniladas (C) y carbonil reductasa (D) en mujeres sanas (control) y en pacientes con cáncer de mama sin metástasis (PSM) o con metástasis (PCM).

Resultados

Se analizaron las muestras de 123 mujeres con un promedio de edad de 52.83 ± 8.96 años (rango: 28-80 años) que presentaron el diagnóstico confirmado de cáncer de mama con un promedio de 3.34 ± 3.49 años de evolución. El 60.97% del total de pacientes presentaron cáncer de mama del lado derecho y el 47.96%, metástasis. Además, el 28.45% de las pacientes presentaron receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano positivo (HER2+) y el 85.36%, un grado nuclear III (Tabla 1).

En comparación con el grupo control, las mujeres con cáncer de mama presentaron un incremento de 3.76 veces de la cantidad de proteínas carboniladas en su plasma (5.00 ± 3.27 vs. 1.33 ± 2.31 nmol carbonilos/mg proteína; $p < 0.05$) (Fig. 1 A). Además, las pacientes con cáncer presentaron un incremento del 60% en la concentración de la enzima carbonil reductasa en comparación con el grupo control (3.27 ± 0.12 vs. 2.04 ± 0.11 ng/mg proteína) (Fig. 1 B).

Por otro lado, las pacientes afectadas de cáncer y que presentaban metástasis tuvieron un 58% de incremento en la concentración de carbonilos, en comparación con el grupo control. Además, las pacientes afectadas con cáncer pero que no presentaban metástasis tuvieron un incremento del 40% con respecto al grupo control en la concentración plasmática de carbonilos (Fig. 1 C).

En cuanto a la actividad de la enzima carbonil reductasa, las pacientes con metástasis mostraron un incremento en la actividad del 73%, al compararlas con el grupo control, contrastando con el grupo con cáncer sin metástasis, el cual presentó un incremento del 25% con respecto al grupo control (Fig. 1 D). Además, tomando en cuenta a todas las pacientes con cáncer, la concentración de carbonilos se correlacionó positivamente con la actividad de la enzima carbonil reductasa ($r = 0.95$; $p < 0.001$), pero no se encontró ninguna correlación o asociación de esta enzima con indicadores tumorales como el grado nuclear, ser HER2+ o la presencia de receptores de estrógenos.

Discusión

Los estudios moleculares y bioquímicos han puesto de manifiesto que la generación de radicales libres derivados del oxígeno produce cambios estructurales y químicos al interactuar con macromoléculas como el ADN, lípidos, carbohidratos y proteínas que producen alteraciones de la homeostasis celular, como sucede en el cáncer; se ha reportado que una de las alteraciones más comúnmente encontradas por efecto de los radicales libres es el daño al ADN, en donde es frecuente observar una mutación puntual a lo largo de toda esta molécula con un cambio de G por T^{5,6,10,11}. Estudios realizados a nivel mundial han puesto en evidencia que el estrés oxidativo (se produce una gran cantidad de radicales libres) puede generar y promover la síntesis de metabolitos conocidos como biomarcadores, producto de la reacción, o reacciones, entre los radicales libres y las macromoléculas, y que pueden ser detectados en diversos líquidos corporales y extractos de tejidos^{5,6,11-14}. De esta forma, se ha reportado que existe una elevación de diversos biomarcadores en la orina y/o sangre de personas con cáncer de mama, tales como el 15-f2t-iso-prostano, el malondialdehído y la 8-oxo-2-deoxiguanosina. Estos biomarcadores son el producto de la acción de los radicales libres con los lípidos o ácidos nucleicos. Para detectar daño a las proteínas se utiliza como biomarcador la detección de carbonilos presentes en las proteínas. Esta detección se ha realizado como control del estrés oxidativo en sujetos que padecen diversos tipos de cáncer, incluso en mujeres con cáncer de mama (un incremento de su concentración se asocia a un mayor avance de la enfermedad)⁷. Sin embargo, no existen reportes en población mexicana, la cual presenta un mestizaje que le da características genéticas diferentes a las de otros grupos étnicos en donde el cáncer de mama tiene un comportamiento particular, por lo que sus características metabólicas pueden ser distintas¹⁵⁻¹⁷.

Por otro lado, es conocido el hecho de que la expresión de la enzima carbonil reductasa es determinante en el metabolismo de fármacos antitumorales como las antraciclinas, utilizadas para el tratamiento de diversos tipos de cáncer, como las leucemias, los linfomas, los sarcomas y los carcinomas, y fármacos de primera elección en el tratamiento del cáncer de mama. El pronóstico de las pacientes con cáncer de mama depende de la respuesta de las células tumorales a la quimioterapia, por lo que un incremento en el metabolismo de los fármacos por enzimas que aceleren su biotransformación puede contribuir al desarrollo de una resistencia a dicho fármaco¹⁸⁻²⁰. En estudios clínicos en pacientes

con cáncer de mama se ha observado que la aplicación de quimioterapia se asocia a un incremento en la expresión tumoral de la enzima carbonil reductasa, lo que sugiere una activación de dicha enzima por efecto del fármaco²⁰. En el momento en que se realizó nuestro estudio, ninguna de las pacientes con cáncer de mama seleccionadas fue tratada con ningún tipo de quimioterapia o tratamiento alguno, por lo que pensamos que el incremento en la enzima carbonil reductasa observado en nuestras pacientes puede deberse en parte al aumento en la producción de radicales libres que atacan a las proteínas, las cuales son carboniladas por efecto de éstos, y la enzima podría estar actuando para prevenir dicho daño. Esta posibilidad debe ser explorada con mayor detenimiento, ya que es de importancia en el tratamiento con quimioterapia^{3,7}.

El cáncer de mama es el tumor maligno de mayor frecuencia en el mundo y la principal causa de muerte por cáncer entre las mujeres mexicanas^{1,10}. La búsqueda de marcadores tempranos de malignidad y de avance de la enfermedad es una prioridad de salud pública. Estos marcadores que pueden dar indicios del grado de avance de la enfermedad pueden ser muy útiles en el monitoreo continuo de las pacientes. De esta forma, la detección de carbonilos en plasma o suero se ha usado como biomarcador en diversos tipos de cáncer⁷.

En nuestro grupo de estudio, las mujeres con cáncer de mama no solamente presentaron una mayor concentración de carbonilos en la sangre, sino también un incremento importante en la actividad de la enzima carbonil reductasa en los leucocitos. Puesto que esta enzima se encarga de eliminar los grupos carbonilo, principalmente de las proteínas, un incremento en su actividad se asocia con un aumento de la cantidad de carbonilos, los cuales a su vez son el producto del estrés oxidativo en que se encuentran las pacientes con cáncer. Por otro lado, el incremento en la concentración de carbonilos y en la actividad de la enzima carbonil reductasa fue mayor en las mujeres que presentaron metástasis, lo cual podría ser indicativo de un avance importante de la enfermedad y, por tanto, podría constituir un factor pronóstico, ya que ambos parámetros están correlacionados positivamente. Esto es una posibilidad que debe ser estudiada con mayor detenimiento en el futuro.

Conclusiones

La correlación positiva entre la concentración plasmática de proteínas carboniladas y la actividad de la enzima carbonil reductasa en los leucocitos indica que

ambos parámetros se encuentran asociados entre sí, por lo que pueden ser utilizados como indicadores del daño a los tejidos en este tipo de pacientes, sobre todo si presentan metástasis; por ello, serían apropiados para llevar a cabo el monitoreo de la progresión de esta enfermedad. Es necesario realizar más estudios al respecto.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

Agradecimientos

El presente trabajo fue realizado con el apoyo parcial del Fondo Sectorial en Salud (CONACyT, Salud-2012-01-181582) otorgado a la Dra. Liliana García-Ortiz y el Apoyo Complementario para la Adquisición de Equipo Científico (N.º 188458-2012 del CONACyT) otorgado al Dr. Paul Mondragón Terán. Los Dres. José Gutiérrez Salinas y Paul Mondragón Terán agradecen el apoyo del Programa de Investigación Científica y Tecnológica del ISSSTE (clave E015).

Bibliografía

1. Torres-Mejía G, Angeles-Llerena A. [Reproductive factors and breast cancer: principal findings in Latin America and the world]. *Salud Pub Mex.* 2009;51 Suppl 2:s165-71.
2. Kuller LH. The etiology of breast cancer from epidemiology to prevention. *Public Health Rev.* 1995;23(2):157-213.
3. Adams S, Green P, Claxton R, et al. Reactive carbonyl formation by oxidative and non-oxidative pathways. *Front Biosci.* 2001;6:A17-24.
4. Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. Antioxidants, Oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot.* 2003;91 Spec No:179-94.
5. Gutiérrez-Salinas J. ¿Qué sabe usted acerca de radicales libres? *Rev Mex Cien Farm.* 2006;37(4):69-73.
6. Gutiérrez-Salinas J. Función de los complementos antioxidantes durante el ejercicio. *Med Int Mex.* 2007;23(3):217-22.
7. Rossner P, Terry MB, Gammon MD. Plasma protein carbonyl levels and breast cancer risk. *J Cell Mol Med.* 2007;11(5):1138-48.
8. Michelis R, Gery R, Sela S, et al. Carbonyl stress induced by intravenous iron during haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant.* 2003;18(5):924-30.
9. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AI, Randal RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-75.
10. Smith C, Carney J, Starke-Reed P, Oliver C, Stadtman ER. Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(23):10540-3.
11. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 2006;160(1):1-40.
12. Calderón-Garcidueñas AL, Parás-Barrientos FU, Cárdenas-Ibarra L, et al. Risk factors of breast cancer in Mexican women. *Salud Publica Mex.* 2000;42(1):26-33.
13. Rossner P, Jr., Gammon MD, Terry MB, et al. Relationship between urinary 15-F2t-isoprostane and 8-oxodeoxyguanosine levels and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15(4):639-44.
14. Ray G, Batra S, Shukla NK, et al. Lipid peroxidation, free radical production and antioxidant status in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2000;59(2):163-70.
15. Li D, Zhang W, Zhu J, et al. Oxidative DNA damage and 8-hydroxy-2-deoxyguanosine DNA glycosylase/apurinic lyase in human breast cancer. *Mol Carcinog.* 2001;31(4):214-23.
16. Elder JP, Castro FG, De Moor C, et al. Differences in cancer risk-related behaviors in Latino and Anglo adults. *Prev Med.* 1991;20(6):751-63.
17. Martínez ME, Gutiérrez-Millan LE, Bondy M, Daneri-Navarro A, Meza-Montero MM, Anduro-Corona I. Comparative study of breast cancer in Mexican and Mexican-American women. *Health.* 2010;2(9):1040-8.
18. Williams KJ, Cowen RL, Stratford IJ. Hypoxia and oxidative stress in breast cancer tumor hypoxia. Therapeutic considerations. *Breast Cancer Res.* 2001;3(5):328-31.
19. Gaudy A, Fetterly GJ, Adjei AA, et al. Investigation of the pharmacogenetic influences of carbonyl reductase on doxorubicin and doxorubicinol in breast cancer patients. *J Clin Oncol.* 2013;31(Suppl 1):2594.
20. Hlaváč V1, Brynychová V, Václavíková R, et al. The role of cytochromes P450 and aldo-keto reductases in prognosis of breast carcinoma patients. *Medicine (Baltimore).* 2014;93(28):1-12.