



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
“SALVADOR ZUBIRÁN”**

**EL SILENCIAMIENTO DE PTP1B DISMINUYE LA
EXPRESIÓN DE HER2, LA PROLIFERACIÓN Y
LA MIGRACIÓN DE CULTIVOS PRIMARIOS DE
CÁNCER DE MAMA**

TESIS DE POSGRADO PARA OBTENER EL TÍTULO DE
ESPECIALISTA EN:

ONCOLOGÍA MÉDICA

PRESENTA:

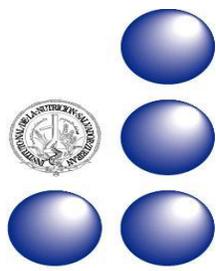
DRA. KARLA ALEJANDRA LÓPEZ ZELADA

TUTOR

DR. EUCARIO LEÓN RODRÍGUEZ

ASESORES DE TESIS

**DRA. MARÍA DE JESÚS IBARRA SÁNCHEZ
DR. JOSÉ ESPARZA LÓPEZ**



INCMNSZ

México, D.F.

Agosto 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AUTORIZACIÓN DE TESIS

DR. EUCARIO LEÓN RODRÍGUEZ

Profesor Titular del Curso de Especialización en Oncología Médica
Tutor de Tesis
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”

DRA. MARÍA DE JESÚS IBARRASÁNCHEZ

Investigador en Ciencias Medicas
Co-Tutora de Tesis
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”

DR. JOSÉ ESPARZA LÓPEZ

Investigador en Ciencias Medicas
Co-Tutor de Tesis
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”

DR. SERGIO PONCE DE LEÓN ROSALES

Director de Enseñanza
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”

DEDICATORIA

A mi hija: Emma Isabella por ser la razón de mi existencia, por ser la fuerza que me impulsa a ser mejor cada día, porque todo esto es solo por ti y para ti. Porque te amo con todo mi corazón y todas mis fuerzas y porque dedicaré mi vida entera a alcanzar tus sueños.

A mi madre, la mujer más maravillosa, excepcional y luchadora, porque gracias a tu ejemplo y perseverancia inagotable ahora concluyo este capítulo de mi vida. Gracias por creer siempre en mí y por todo tu apoyo incondicional. Te amo madre linda, sin ti este sueño nunca se hubiera realizado.

A mi padre, el ejemplo más grande de un ser trabajador y responsable, de la persona más recta e impecable; el hombre que más amo en la vida y que siempre me dio el mejor ejemplo a seguir, gracias por la oportunidad que me brindaste para estar aquí y alcanzar mi sueño.

A mi hermano Marco Tulio por su paciencia inagotable y sobre todo por el apoyo incondicional que siempre me brindaste, porque nunca viste este sueño como una locura sino como una oportunidad que no debía dejar pasar.

A mi hermana Lucrecia y a mi sobrino Santiago por enseñarme que todo sueño es posible alcanzar, por recordarme que el que persevera alcanza y que Dios tiene un camino diferente para cada hijo suyo.

A Dios por ser la luz de mi vida, por enseñarme cada día que detrás de todo suceso, se esconde un plan perfecto y por darme la fuerza para seguir. Porque cuando estuve sola y triste siempre estuviste a mi lado recordándome que Tú nunca me abandonarías.

AGRADECIMIENTOS

A Dra. Mary y Dr. José, porque además ser mis maestros en este proyecto se convirtieron en amigos que me brindaron la oportunidad de descubrir un mundo que nunca imagine.

A Dr. León por creer en mí desde el primer momento, porque a pesar de mis adversidades me brindó la oportunidad de realizar este sueño y por ser un maestro excepcional. Le estaré eternamente agradecida.

A mis amigos Julio, Osvaldo, Sharon, Maite, Andrea y Paty gracias por abrirme las puertas de su corazón y regalarme su amistad desde el primer día que llegue a este hermoso país; gracias por ser la mano amiga que me dio fortaleza, apoyo y cariño en todo momento y demostrarme que nuestra amistad perdurará sin importar el tiempo ni la distancia. Siempre los llevaré en el corazón. Nunca olviden que los quiero mucho.

A la Dirección de Intercambio Académico de la Secretaría de Relaciones Exteriores de la Ciudad de México por brindarme el apoyo para alcanzar esta meta.

Este trabajo se realizó en la Unidad de Bioquímica de Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”. Se contó con el apoyo económico del protocolo del CONACYT 102825.

índice

Introducción	7
1.1 Epidemiología.....	7
1.2 Marcadores pronósticos en cáncer de mama.....	9
1.3 Receptores tipo factores de crecimiento: Her2.....	10
1.4 Fosforilación de proteínas en residuos de tirosina.....	12
1.5 Proteínas fosfatasa de tirosina	13
1.6 PTP1B	14
1.7 Degradación de los receptores de factores de crecimiento: Cblb.....	17
Planteamiento del Problema	21
Justificación.....	22
Hipótesis.....	22
Objetivo General.....	23
Objetivos Específicos	23
Materiales y Métodos.....	24
7.1 Cultivo de células de cáncer de mama.....	24
7.2 Purificación de plásmidos	24
7.3 Transfección de sh-RNAs.....	25
7.4 Ensayo de Western Blot.....	26
7.5 Proliferación celular	26
7.6 Migración celular	27
Resultados	28
8.1 Caracterización de cultivos primarios.....	28
8.2 Silenciamiento de PTP1B en los cultivos primarios: MBCD3 Y MBCD23	28
8.3 Efecto del silenciamiento de PTP1B sobre la expresión de Her2	29
8.4 Efecto del silenciamiento de PTP1B sobre la ligasa de ubiquitina, Cblb.....	32
8.5 Efecto del silenciamiento de PTP1B sobre la proliferación celular.....	33
8.6 Efecto del silenciamiento de PTP1B sobre la migración celular	35
Discusión.....	36
Bibliografía.....	41

INTRODUCCIÓN

1.1 EPIDEMIOLOGÍA

El cáncer de mama es la neoplasia más frecuente en mujeres tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. A nivel mundial, se presentaron para el año 2008, 1.38 millones de casos nuevos (22.9% del total de neoplasias reportadas) y 458 mil muertes (10.9% del total de muertes por cáncer) debidas a cáncer de mama, lo cual la ubica como la segunda causa de muerte por cáncer en el género femenino, después del cáncer de pulmón [1]. Las tasas de incidencia, a nivel mundial, varían desde 19.3 casos por 100 mil mujeres en el Este de África a 89.7 casos por 100 mil mujeres en el Oeste de Europa. Los datos publicados por la Sociedad Americana de Cáncer en el 2013 ubican al cáncer de mama como la neoplasia más común en mujeres, lo cual representa el 29% del total de neoplasias reportadas (**Figura 1**). En Estados Unidos de América (EUA) el cáncer de mama es la segunda causa de muerte por cáncer en la población femenina, lo cual representa el 14% del total de muertes por cáncer, con 39,620 muertes por cáncer en un año [2] (**Figura 2**).

Casos nuevos estimados por cáncer en EUA 2013

CASOS NUEVOS ESTIMADOS

		Hombre	Mujeres			
Próstata	238,590	28%		Mama	232,340	29%
Pulmón y brónquios	118,080	14%		Pulmón y bronquios	110,110	14%
Colon y recto	73,680	9%		Colon y recto	69,140	9%
Vejiga Urinaria	54,610	6%		Útero	49,560	6%
Melanoma	45,060	5%		Tiroides	45,310	6%
Riñón & Pelvis renal	40,430	5%		Linfoma No Hodgkin	32,140	4%
Linfoma No Hodgkin	37,600	4%		Melanoma	31,630	4%
Cavidad Oral y Faringe	29,620	3%		Riñón & Pelvis renal	24,720	3%
Leucemia	27,880	3%		Páncreas	22,480	3%
Páncreas	22,740	3%		Ovario	22,240	3%
Todos los otros sitios	854,790	100%	Todos los otros sitios	805,500	100%	

Figura 1. Casos nuevos estimados por cáncer en EUA para el año 2013 por el SEER.
Fuente: American Cancer Society

Muertes por cáncer estimadas en EUA 2013

MUERTES ESTIMADAS

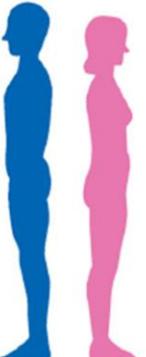
		Hombre	Mujeres			
Pulmón y brónquios	87,260	28%		Pulmón y bronquios	72,220	26%
Próstata	29,720	10%		Mama	39,620	14%
Colon y recto	26,300	9%		Colon y recto	24,530	9%
Páncreas	19,480	6%		Páncreas	18,980	7%
Hígado y Vía Biliar Intra	14,890	5%		Ovario	14,030	5%
Leucemia	13,660	4%		Leucemia	10,060	4%
Esófago	12,220	4%		Linfoma No Hodgkin	8,430	3%
Vejiga Urinaria	10,820	4%		Útero	8,190	3%
Linfoma No Hodgkin	10,590	3%		Hígado, Vía biliar Intra	6,780	2%
Riñón y Pélvis Renal	8,780	3%		Cerebro y SNC	6,150	2%
Todos los otros sitios	306,920	100%	Todos los otros sitios	273,430	100%	

Figura 2. Muertes estimadas por cáncer en EUA para el año 2013 por el SEER.
Fuente: American Cancer Society

En México, los registros epidemiológicos muestran, que el número de nuevos casos reportados de cáncer de mama van en aumento, así como la tasa de mortalidad por esta causa. Actualmente ocupa el primer lugar como causa de muerte por neoplasia maligna en las mujeres mayores de 25 años. En el año 2008 se reportaron 14 mil casos, lo cual representó el 21% del total de neoplasias reportadas en este género. También se reportaron para esa fecha un total de 5 mil muertes por cáncer de mama al año (13% del total de muertes por cáncer) [1]. A pesar de los datos mencionados anteriormente, la tasa de mortalidad ha disminuido en los últimos años gracias al avance en el tamizaje, diagnóstico temprano y tratamiento del cáncer de mama, lo cual ha permitido una mayor supervivencia para estas pacientes.

1.2 MARCADORES PRONÓSTICOS EN CÁNCER DE MAMA

Los factores pronósticos de mayor relevancia para el cáncer de mama son: el tamaño tumoral y el estado de los ganglios linfáticos axilares [3]. La supervivencia a 5 años para las pacientes con tumores pequeños y sin metástasis ganglionares varía entre un 85 - 92%, mientras que para las pacientes con metástasis ganglionares, esta supervivencia puede disminuir hasta un 40 - 80% [4] [5, 6]. El estudio morfológico de dicha neoplasia también aporta parámetros pronósticos de relevancia como lo son el grado de diferenciación y su clasificación histológica [5]. Actualmente se sabe que algunos tipos histopatológicos se caracterizan por un comportamiento más agresivo como es el carcinoma ductal y que existen otros tipos histológicos de menor agresividad como el carcinoma coloide, tubular, papilar y medular [5, 7].

En la última década se han investigado más de 100 marcadores pronósticos para cáncer de mama; a pesar de esto, son pocos los marcadores caracterizados y

validados [5]. Entre los distintos marcadores pronósticos se encuentran oncogenes como *her2/neu*, *ciclina D1*, cuya amplificación o sobreexpresión se relaciona con mayor agresividad tumoral y genes supresores como el gen *p53*, cuya alteración se asocia a neoplasias más agresivas [8, 9]. Los marcadores pronósticos y predictivos de uso clínico para el cáncer de mama son: los receptores de estrógenos (ER), los receptores de progesterona (PR) y el receptor Her2. Los estudios publicados sobre los genes *her2/neu* y *p53* les confieren valor pronóstico para el intervalo libre de enfermedad y supervivencia global, así mismo, les confiere valor predictivo indispensable en la terapia neo- y adyuvante. Ambos marcadores se han relacionado con mala respuesta al tratamiento con Tamoxifeno, Inhibidores de Aromatasa y regímenes específicos de quimioterapia [8, 9].

1.3 RECEPTORES TIPO FACTORES DE CRECIMIENTO: HER2

El estudio de las bases moleculares del cáncer ha conducido a la identificación de distintos oncogenes relacionados con los procesos biológicos como la proliferación y diferenciación celular. Las alteraciones descubiertas en estos oncogenes influyen en el comportamiento de algunas neoplasias, uno de los oncogenes más estudiados es *her2/neu/erbB2*. Este oncogén pertenece a la familia de receptores Her/ErbB, que también incluye al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR/Her1/ErbB1), ErbB-3 (Her3) y ErbB-4 (Her4), los cuales pueden formar homo- o heterodímeros [10]. **(Figura 3)**. Esta familia son receptores de factores de crecimiento transmembranales tipo I, que funcionan activando cascadas de señalización intracelular en respuesta a señales extracelulares. Estas proteínas están estructuralmente conformadas por un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular. El dominio

intracelular posee actividad de cinasa de tirosina, después de la unión del ligando a su dominio extracelular, los receptores de la familia Her, sufren dimerización y posteriormente auto-fosforilación de varios residuos de tirosina. Estas tirosinas fosforiladas sirven de anclaje para varias moléculas de señalización que participan en diversos procesos biológicos [11].

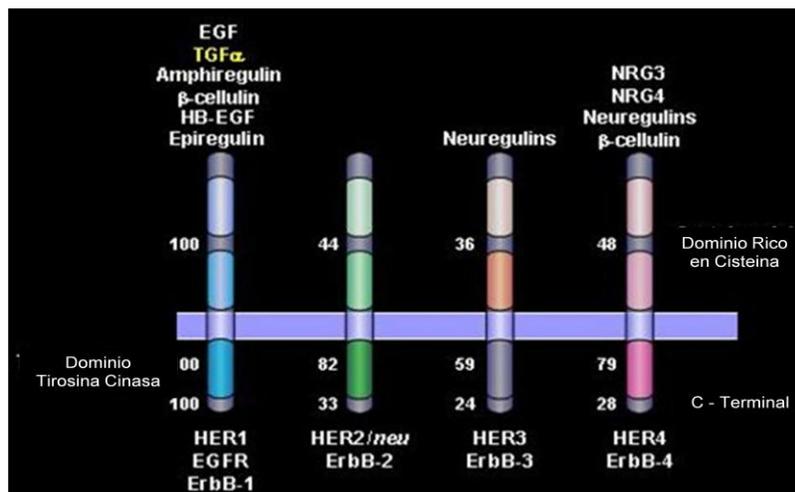


Figura 3. Familia de receptores Her: Receptor del Factor de crecimiento epidérmico (EGFR/ Her1/ ErbB-1), Her2/c-neu (ErbB-2), Her3 (ErbB-3) y Her4 (ErbB-4). Poseen un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular.

Los estudios publicados indican que la sobreexpresión del gen *her2/neu/erbB2* se detecta en un 20-30% de los casos de cáncer de mama [10, 12-14]. Slamon y colaboradores describieron por primera vez, que la amplificación del gen *her2/neu/erbB2* en cáncer de mama se asocia con un menor intervalo libre de enfermedad y menor supervivencia, esto le confiere a dicho gen un papel pronóstico en esta enfermedad [15]. Posteriormente, se publicaron varios estudios en los que se han

confirmado la relación entre la amplificación o la sobreexpresión del gen *her2/neu/erbb2* y un mal pronóstico en cáncer de mama [16]. Se encuentra bien establecida la relación entre la sobreexpresión de *her2/neu/erbb2* y otros factores pronósticos como: tamaño tumoral, alto grado tumoral, receptores hormonales negativos, estadio de la enfermedad, alto índice de proliferación celular [17] y DNA aneuploide o tetraploide [12, 18-20]. Sin embargo, la importancia de este oncogén no se limita a la estratificación de las pacientes en distintas categorías de riesgo, sino también es de vital importancia en la toma de decisiones terapéuticas [21]. Algunos trabajos experimentales revelaron la capacidad de inducir cáncer de mama, en ratas, mediante la activación específica y selectiva de Her2; así como, la posibilidad de inhibir el crecimiento tumoral mediante el tratamiento con anticuerpos específicos anti-Her2 [22, 23]. En base a estos estudios, Her2 se convirtió en un blanco terapéutico prometedor para el cáncer de mama [24, 25]. Estudios posteriores comprobaron que, con la utilización de un anticuerpo diseñado en contra del dominio extracelular del receptor Her2, Trastuzumab, se producía la inhibición de dicho receptor, lo cual permitió que este medicamento fuera el primer agente biológico aprobado para el tratamiento de cáncer de mama con expresión de Her2 [11, 21]. Existen estudios que han comprobado la eficacia y seguridad del Trastuzumab en el tratamiento neoadyuvante, adyuvante y en la enfermedad metastásica de cáncer de mama con expresión de Her2 [12, 21, 24, 26-28].

1.4 FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS EN RESIDUOS DE TIROSINA

La fosforilación de proteínas en residuos de tirosina es una de las modificaciones postraduccionales más importantes que las células utilizan para regular las respuestas

celulares. La regulación del estado de las fosfo-proteínas es importante para efectos biológicos como la proliferación, diferenciación, migración y muerte celular. Dicho proceso también representa un punto de control para la integración de señales extracelulares y su posterior conversión en respuestas celulares [29, 30].

Los niveles de fosforilación de proteínas en residuos de tirosina se encuentran controlados por la acción coordinada de dos tipos de enzimas llamadas: proteínas cinasas de tirosina (PTK, del *inglés* *protein tyrosine kinase*) y las proteínas fosfatasas de tirosina (PTP, del *inglés* *protein tyrosine phosphatase*) [30]. Las PTK's son las encargadas de añadir un grupo fosfato sobre residuos de tirosina de proteínas, dicho proceso produce un cambio estructural y promueve la interacción entre proteínas de las diferentes cascadas de señalización celular. A su vez, la acción de las PTK's es regulada por la acción de las PTP's, dichas proteínas se encargan de quitar un grupo fosfato de un residuo de tirosina de una proteína. Cuando se produce una alteración entre el balance normal de la actividad de las PTK's y PTP's se provoca una fosforilación aberrante de residuos de tirosina, lo cual ha sido relacionado con la etiología de varias enfermedades entre las cuales se encuentra el cáncer [29, 31-34].

1.5 PROTEÍNAS FOSFATASAS DE TIROSINA

El genoma humano codifica 107 PTP's, que conforman a la superfamilia de las fosfatasas. Esta superfamilia es estructuralmente diversa, que tiene efectos tanto estimulatorios como inhibitorios [32, 35-38]. Las PTP's se dividen en dos tipos: receptores y no receptores. Las PTP's tipo receptor contienen variables dominios extracelulares, un dominio único transmembrana y un dominio intracelular con actividad catalítica. Este dominio catalítico contiene aproximadamente 280 aminoácidos y

presentan un residuo de cisteína conservado que es necesario para la actividad catalítica. La defosforilación de los sustratos ocurre con alto grado de especificidad, a través de un mecanismo de dos pasos que consiste en la formación de un intermediario que se forma a través de un enlace covalente de fosfato-PTP que subsecuentemente se hidroliza [35, 39]. La función principal de las PTP's es revertir la acción de fosforilación de las PTK's. Sin embargo, las PTP's también pueden potenciar acciones de las PTK's; de este modo se aumentan las señales mitogénicas conduciendo a transformación y proliferación celular [40]. Algunos miembros de la superfamilia de las fosfatasas son productos de genes supresores tumorales, entre los que se encuentran principalmente PTEN [41, 42].

1.6 PTP-1B

Las primeras fosfatasas del tipo no receptor identificadas fueron PTP1B (PTPN1) y TC-PTP (PTPN2) [43]. PTP1B es una proteína que fue purificada de una librería de placenta humana, se localizada en el cromosoma 20 específicamente en la región q13.1-q13.2 [36, 38, 44, 45]. Esta enzima está formada por 435 aminoácidos con un peso de 50 kDa, contiene un dominio catalítico de 37 kDa hacia su extremo N-terminal, que está flanqueado por dos dominios ricos en prolina y un dominio en el C-terminal que le permite el anclaje de la enzima a la cara citoplasmática del retículo endoplásmico [44, 46]. **(Figura 4)** La actividad catalítica de esta enzima está controlada por su localización en la superficie del retículo endoplásmico, ya que esto restringe su acceso a ciertos sustratos [47-49]. También existen otros mecanismos que regulan la actividad de PTP1B, como son: la oxidación, fosforilación, sumoilación y la proteólisis [50-52].

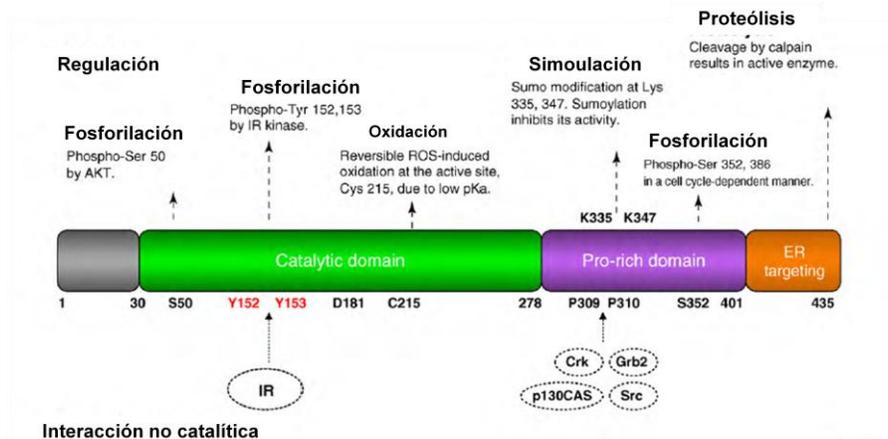


Figura 4. Estructura de la fosfatasa PTP1B.

Varios estudios han demostrado que PTP1B juega un papel importante en la señalización de las vías metabólicas y que puede ser un posible blanco terapéutico para la diabetes mellitus, la obesidad y otros desórdenes metabólicos asociados, ya que esta proteína participa en la regulación negativa de la señalización de los receptores de la insulina y la leptina [43, 53-55]. Elchebly y colaboradores demostraron que la delección del gen de *ptpn1* en ratones causa hipersensibilidad a la insulina y que además esto está asociado con un incremento de la fosforilación de tirosina del receptor de insulina y sus sustratos primarios [53]. PTP1B puede inhibir la señalización de otras PTK's como los receptores de PDGF y HGF, mientras que la sobreexpresión de PTP1B en fibroblastos inhibe la transformación por oncogenes que incrementan la fosforilación de tirosinas incluyendo Her2, Src, Bcr-Acl, Crk y Ras [50, 56]. Esta enzima también es importante para la activación de las GTPasas de Rac y Ras, enzimas que están asociadas con incremento de la proliferación y motilidad celular. Además PTP1B

pueden activar a Src mediante defosforilación de la tirosina 527 (Y527) [37, 49, 52, 57, 58]. También se ha demostrado que la ganancia o amplificación de la región del cromosoma 20q13, sitio en el cual está localizada PTP1B, está asociada con pobre pronóstico en cáncer de mama. La sobreexpresión de algunas fosfatasa como la PRL-3, se han asociado con una menor supervivencia libre de progresión en cáncer de mama ganglios positivos, lo cual juega un papel pronóstico en este tipo de pacientes [59, 60]. Sin embargo, estos datos contradicen lo que inicialmente se propuso con respecto a las propiedades anti-oncogénicas de estas fosfatasa, a través de la regulación negativa de la actividad de las PTK's.

Datos recientemente reportados han demostrado que estas fosfatasa se encuentran involucradas en la regulación positiva de algunas vías de señalización en cáncer. PTP1B es un regulador positivo de la señalización de Ras, lo cual se demostró en fibroblastos deficientes de PTP1B [61, 62]. Estudios recientes han demostrado que PTP1B participa en la vía de Her2 en la iniciación de la tumorigénesis en cáncer de mama. La inhibición de la expresión de PTP1B se asoció con la disminución de la fosforilación de Erk, sugiriendo de esta forma su participación en la génesis de tumores mamarios [61, 63, 64]. Julien y colaboradores en el año 2007 demostraron, en modelos murinos que sobreexpresan Her2, que la delección del gen de *ptpn1* producía un retraso en el desarrollo de tumores mamarios y resistencia para el desarrollo de metástasis pulmonares [63]. Estos resultados también fueron observados por Bentires-Alj y Neel, quienes demostraron que la deficiencia homocigota de PTP1B, en modelos murinos, retrasa o impide el desarrollo de tumores mamarios, principalmente aquellos asociados a Her2 [64]. Por otro lado, Soysal y colaboradores, evaluaron recientemente la

expresión de PTP1B en tejido de pacientes con cáncer de mama, analizaron un total de 1402 muestras y demostraron que el 49% de las pacientes presentaban expresión positiva de PTP1B. Así mismo, correlacionaron esta expresión de PTP1B con algunos factores de mal pronóstico ya establecidos como Her2 y los receptores de estrógenos entre otros. En el caso de Her2, encontraron que existe una tendencia a tener mayor expresión de PTP1B en pacientes Her2 positivo (53% de expresión de PTP1B en pacientes Her2 positivo); sin embargo, esta tendencia no fue estadísticamente significativa. Por otro lado, la expresión de PTP1B está asociada de manera significativa con la expresión de receptores de estrógenos (50.7% de expresión de PTP1B en pacientes con receptores de estrógenos positivos), esta expresión positiva de PTP1B también está asociada con los subtipos moleculares luminal B Her2 positivo y Basaloide (53.9% expresión de PTP1B en luminal B Her2 positivo y 37.9% expresión de PTP1B en el subtipo Basaloide). Así mismo, la expresión de PTP1B es un factor pronóstico independiente de supervivencia en las pacientes con cáncer de mama [65].

1.7 DEGRADACION DE LOS RECEPTORES DE FACTORES DE CRECIMIENTO:CBLB

Cbl (del inglés Casitas B-lineage Lymphoma) son una familia de proteínas que funcionan como adaptadores moleculares en la regulación de las cascadas de señalización dependientes de PTK's. Esta familia incluye tres proteínas: c-Cbl, Cbl-b, y Cbl – c; Cbl-b es una proteína ligasa de ubiquitina, formada por 982 aminoácidos y con un peso molecular de 109.48 kD, esta proteína está implicada en la señalización celular y la ubiquitinización de proteínas [66] .

La ubiquitinización de proteínas es un proceso enzimático de modificación proteica post-traducciona, que consiste en la unión de una enzima de ubiquitina con un sustrato

específico, por lo general un receptor de tirosina cinasa, con la finalidad de retirar a este receptor de la membrana plasmática, promover su internalización en vesículas endocíticas y luego conducirlo hacia el lisosoma para su degradación [66, 67] (**Figura 5**)

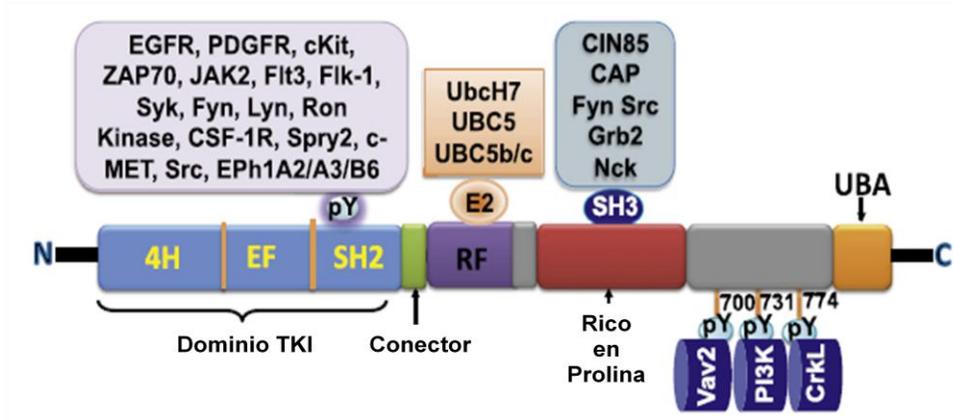


FIGURA 5. Esquema de la función básica de las proteínas de la familia-Cbl como ligasas de ubiquitina sobre los componentes de las vías de señalización de tirosina cinasa, a los cuales se encuentra unida a través del dominio de unión a TKI.

Los receptores dependientes de PTK's invariablemente se someten a la internalización inducida por un ligando a través de la vía endocítica[67]. El rápido traslado de los receptores activados de la superficie de la célula en compartimentos endocíticos ha surgido como un mecanismo fundamental para controlar la señalización río abajo de estos receptores de superficie celular. Estudios realizados durante el último cuarto de siglo han demostrado que una consecuencia importante de la internalización de estos receptores activados es su traslado hacia los lisosomas donde son degradados. Esto proporciona un mecanismo de terminación de señal que parece ser esencial para la regulación de salidas de señalización de receptores dependientes de PTK's activados

bajo ciertas condiciones fisiológicas [68]. Este mecanismo de degradación de proteínas esta principalmente descrito en los receptores de factores de crecimiento: PDGFR, Her1 y EGFR entre otros [66, 67]. A pesar que ya se encuentra establecido que las proteínas de la familia Cbl interactúan con receptores dependientes de PTK's, de una manera dependiente de la fosfotirosina, aun queda por establecer el papel de las PTP's en la regulación de la familia Cblb y si esta regulación depende también de la regulación negativa de las PTK's [66].

Estudios recientes en nuestro laboratorio demostraron que la sobreexpresión de PTP1B en cantidades crecientes se correlaciona con un aumento progresivo de la expresión de Her2 y esto es independiente de la transcripción y amplificación del gen *her2/neu/erbB2*. Por lo tanto, PTP1B regula positivamente la expresión de Her2 en cultivos primarios de cáncer de mama. El posible mecanismo propuesto para explicar el incremento de Her2 es la disminución de los niveles de la ligasa de ubiquitina Cblb, mediada por la sobreexpresión de PTP1B. Sugiriendo un menor recambio del receptor Her2 con su consecuente acumulación. Por otra parte, se demostró que la sobreexpresión de PTP1B contribuye a una mayor agresividad tumoral, en términos de mayor proliferación y migración celular. A pesar de esto el mecanismo de regulación de PTP1B sobre Her2 aún no está bien establecido [69]. Tomando en cuenta los datos antes mencionados, buscamos demostrar que el silenciamiento de PTP1B produce el efecto contrario a su sobreexpresión en cuanto a la regulación de Her2. Si se comprueba dicho efecto, PTP1B tendría una utilidad importante como factor pronóstico y predictivo en pacientes con cáncer de mama. Por esta razón el objetivo principal de este estudio es evaluar el papel del silenciamiento de PTP1B sobre la expresión de

Her2 y las implicaciones que éste mecanismo puede tener sobre procesos biológicos como proliferación celular en cultivos primarios de cáncer de mama.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En modelos murinos, PTP1B se ha asociado a la progresión de la enfermedad y desarrollo de metástasis [63, 64]. Recientemente, se analizaron muestras de tejido de pacientes con cáncer de mama, en las que se demostró que en el 49% de las pacientes expresan PTP1B, sugiriéndola como un factor predictor independiente de supervivencia y que está significativamente asociada a los subtipos moleculares intrínsecos: Luminal B Her2 positivo y Basaloide [65].

Los estudios realizados previamente en nuestro laboratorio, demostraron que PTP1B modula de forma positiva la expresión de Her2 en células tumorales de mama y que dicho efecto puede contribuir a una mayor agresividad tumoral. A pesar de esto el mecanismo que ejerce PTP1B sobre Her2 aun no está bien establecido; tomando en cuenta los datos obtenidos previamente en nuestro laboratorio intentamos demostrar que el silenciamiento de PTP1B produce una regulación negativa de Her2. Por lo tanto PTP1B tendría una importante utilidad como factor pronóstico y predictivo en pacientes con cáncer de mama.

JUSTIFICACION

A pesar de los avances diagnósticos y terapéuticos, el cáncer de mama continúa siendo la neoplasia más frecuente en mujeres y la segunda causa de muerte por cáncer en este género. El interés por el estudio de las bases moleculares del cáncer ha llevado al desarrollo de varios marcadores moleculares. Sin embargo, hasta la fecha solo algunos de estos marcadores están validados para su aplicación en la práctica clínica como factores pronósticos y predictivos, el más estudiado en cáncer de mama es el receptor Her2.

La PTP1B es una fosfatasa de tipo no receptor, la cual se ha visto implicada en la regulación positiva de algunas vías de señalización en cáncer, entre ellas la vía de Her2, junto a la cual participa en la iniciación de la tumorigénesis en cáncer de mama. A pesar de todos estos datos, el mecanismo por el cual PTP1B regula la expresión de Her2 aún no está bien establecido, así como su efecto sobre procesos biológicos como la proliferación y migración celular.

HIPOTESIS

El silenciamiento de PTP1B disminuye la expresión de Her2, a través de la acumulación de la ligasa de ubiquitina Cblb y esto conlleva a una disminución en la proliferación y migración celular en cultivo primarios de cáncer de mama.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del silenciamiento de PTP1B sobre la expresión de Her2 y las implicaciones que el silenciamiento tiene sobre procesos biológicos como proliferación y migración celular en cultivos primarios de cáncer de mama.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Evaluar la expresión de PTP1B en cultivos primarios de cáncer de mama
2. Generar células de cáncer de mama deficientes en PTP1B utilizando shRNA
3. Evaluar el efecto del silenciamiento de PTP1B sobre la expresión de Her2
4. evaluar el efecto del silenciamiento de PTP1B sobre la expresión de Cblb
5. Evaluar el efecto del silenciamiento de PTP1B sobre la proliferación celular
6. Evaluar el efecto del silenciamiento de PTP1B sobre la migración celular

MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 CULTIVO DE CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA

Los cultivos celulares MBCD3 y MBCD23 fueron generados en el laboratorio a partir de biopsias derivada de una mastectomía radical (Protocolo aprobado por el comité de ética del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, referencia 159). Las células fueron sembradas en RPMI (Gibco, Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, California, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) más antibióticos y antimicóticos a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂.

7.2 PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS

Los plásmidos utilizados fueron pGFP-V-RS control (sh scramble) y 4 diferentes pGFP-V-RS shRNA para PTP1B con las siguientes secuencias: ACGAGGACCATGCACTGAGTTACTGGAAG, TACCTCTGCTACAGGTTCTGTTCAA, CCTTCTGTCTGGCTGATACCTGCCTCTTG, GCGCTTCTCCTACCTGGCTGTGATCG AA) Se purificaron por Maxiprep con el kit QIAGEN de acuerdo al protocolo del fabricante. Brevemente, 500 ml de cultivo de bacterias se centrifugó a 6000 RPM por 15 min, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las bacterias en 10 ml de Buffer P1. Se adicionó 10 ml de Buffer P2, se agitó por inversión y se dejó incubar por 5 min a temperatura ambiente. Se adicionó 10 ml de buffer P3 y se incubó por 20 min a 4°C. Se centrifugó a 10000 RPM por 30 min a 4 °C. Se removió el sobrenadante y posteriormente la columna Qiagentip se equilibró con buffer QBT. El sobrenadante se colocó en la columna QIAGEN para permitir la entrada a la resina por flujo de gravedad. Se lavó con buffer QC. Posteriormente se eluyó el DNA con buffer QF. Se precipitó el DNA con isopropanol, se mezcló y se centrifugó inmediatamente a 10000

RPM durante 30 min a 4°C. Se decantó el sobrenadante. El pellet se lavó de DNA con 5 ml de etanol al 70% y se centrifugó a 10000 RPM por 10 min. Se decantó nuevamente el sobrenadante y se secó al aire libre por 5-10 min, se re-disolvió el DNA en un volumen de agua libre de DNAsas y finalmente se cuantificó el DNA por medio de espectrofotometría (DU-65, Beckman Coulter, Pasadena, California, USA).

7.3 TRANSFECCION DE SH-RNAs

Las células MBCD3 y MBCD23 positivas para PTP1B, se transfectaron mediante el protocolo de LipofectAMINE Plus Reagent. Las células se sembraron en placas de 6 pozos a una densidad de 10,000 cel/cm². Una hora antes de la transfección se cambió el medio a las células, utilizando medio libre de antibiótico y SFB. Se colocó 1 ó 2 µg totales de DNA de los plásmidos pGFP-V-RS sh control o los cuatro pGFP-V-RS shRNAs para PTP1B con el Plus Reagent en un tubo eppendorf, se diluyó en medio libre de suero y antibióticos. Se dejó dicha mezcla durante 15 min incubando a temperatura ambiente. Se realizó una mezcla de 4 µl de lipofectamina y 96 µl de medio libre de antibiótico y se colocó en un tubo eppendorf. Se mezcló el contenido de ambos tubos y se incubó por 15 min a temperatura ambiente. Al finalizar dicho procedimiento se colocó en cada plato de cultivo y se incubó por 48 h. Para expresión estable de los shRNAs se seleccionó con 5 µg/ml de puromicina.

7.4 ENSAYO DE WESTERN BLOT

Las células fueron sembradas en cajas de petri (Corning, NY, USA) en medio RPMI libre de rojo fenol con 10% de SFB. Se dejó que las células tuvieran una confluencia de entre 80-90% y se realizaron 3 lavados con PBS. Las células se lisaron en buffer de lisis, el cual contiene 50 mM Hepes (pH 7.4), 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% Nonidato P-40, 10 mM NaF, 50 mM β -Glicerofosfato de sodio, 1 mM vanadato de sodio y mezcla de inhibidores de proteasa (Complete, EDTA free, Roche). Fueron sometidos 20 μ g de proteína total a electroforesis en un gel de policramida al 9 %. Las proteínas se transfirieron a una membrana Immobilon-P PVDF (Millipore Corp, Billerica MA). La membrana se bloqueó durante 1 h con leche descremada al 5% en PBS-Tween. La membrana se incubó con los anticuerpos primarios: anti- PTP1B, anti- Her2, anti-Cblb, anti-tubulina (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente se incubó con los anticuerpos secundarios: anti-conejo-HRP (PTP1B y Her2) y anti-ratón-HRP (Cblb y tubulina) por 60 min. La señal fue visualizada mediante reacción de quimioluminiscencia con ECL-Plus (Amersham TH ECL Plus Western Blotting Detection System), y se expuso en una película radiográfica (Kodak).

7.5 PROLIFERACIÓN CELULAR

Los ensayos de proliferación celular, se realizaron con 3,000 células/cm² en placas de 48 pozos (Corning, NY, USA) en medio RPMI suplementado con 10% de SFB. Se cultivaron durante 6 días a 37°C con una atmósfera de CO₂ al 5%. Al día 0, 2, 4 y 6 las células se fijaron con glutaraldehído al 1.1% durante 20 min y se dejaron en PBS durante 20 min. Al completarse los 6 días se procedió a teñir las placas con cristal violeta durante 20 min. Las placas se lavaron con agua para retirar el exceso del

colorante. El colorante se solubilizó en 400 µl de ácido acético al 10% durante 20 min. La absorbancia se midió a 595 nm en un lector de microplaca (Opsys MR, Dynex Technologies, Chantilly, VA, USA). Los resultados se expresaron como el incremento de la densidad óptica con respecto al día cero.

7.6 MIGRACIÓN CELULAR

La migración celular se evaluó utilizando cámaras de Boyden de 8µM (Corning, NY, USA). Se depositaron 200,000 células en 300 µL de RPMI con SFB al 10% en los pozos superiores de las cámaras de Boyden. En el compartimiento inferior se colocó medio RPMI con SFB al 10%. Las células se incubaron durante 8 horas a 37 °C en atmósfera húmeda y CO₂ al 5%. Al finalizar el período de incubación se removieron las células de la parte superior que no migraron, las células que sí migraron se fijaron con una solución de glutaraldehído al 1.1% en PBS durante 20 min y se tiñeron con una solución de cristal violeta al 0.5% por 20 min. Se realizó la valoración de las cámaras en microscopio y posteriormente el cristal violeta se disolvió con 0.3 mL de solución de ácido acético 10%. La absorbancia se midió a 595 nm en un lector de microplaca (Opsys MR, Dynex Technologies, Chantilly, VA, USA). Los resultados se presentan como el índice de migración de las células con silenciamiento de PTP1B con respecto al control de células que si expresan PTP1B.

RESULTADOS

8.1 CARACTERIZACION DE CULTIVOS PRIMARIOS

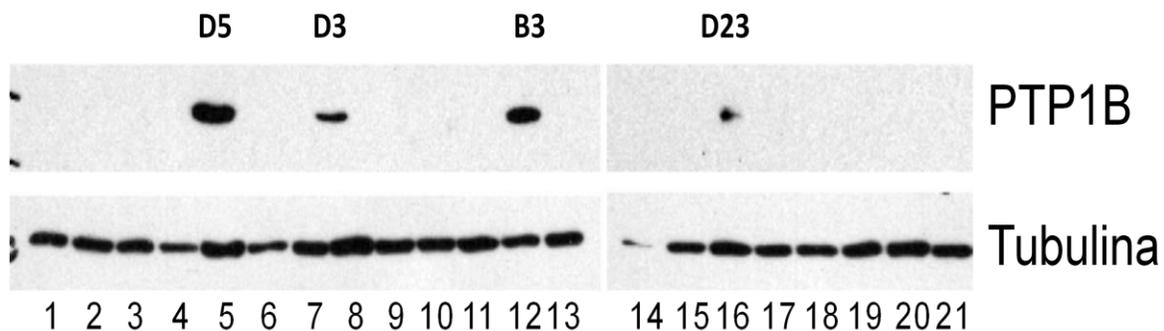
Los resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que PTP1B parece estar implicado en la expresión de Her2 en cultivos primarios de cáncer de mama. De manera inicial, para determinar si PTP1B se expresa de forma endógena en cultivos primarios de cáncer de mama, se procedió a evaluar los niveles de expresión de PTP1B en un grupo de 18 cultivos primarios que previamente fueron establecidos en nuestro laboratorio, y 3 líneas celulares. La expresión de PTP1B fue evaluada mediante la realización de un Western Blot usando un anticuerpo anti-PTP1B. Se encontró que PTP1B se encuentra expresado en los cultivos celulares MBCD5, MBCD3, MBCD5-B3 y MBCD23, las tres líneas celulares no mostraron niveles detectables de PTP1B **(Figura 6)**.

8.2 SILENCIAMIENTO DE PTP1B EN LOS CULTIVOS PRIMARIOS: MBCD3 Y MBCD23

Una vez que se determinó cuales cultivos expresaban PTP1B, se seleccionaron los cultivos MBCD3 y MBCD23 para a realizar el silenciamiento de PTP1B mediante shRNAs. Se transfectaron los plásmidos pGFP-V-RS sh control o pGFP-V-RS shRNA PTP1B con 1 ó 2 μg totales de DNA **(Figura 7)**. La figura muestra una micrografía tomada a través del microscopio de epifluorescencia, en donde se observan células con la expresión de proteína verde fluorescente (GFP) que corresponden a las células que presentan el silenciamiento de PTP1B. Estos ensayos de transfección de plásmidos se hicieron tanto de forma transitoria como estable, para los cultivos estables se seleccionó con puromicina por 15 días.

8.3 EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE PTP1B SOBRE LA EXPRESIÓN DE HER2

Recientemente, en nuestro laboratorio se demostró que la sobre expresión de PTP1B modula de forma positiva los niveles de Her2. Se encontró que a mayor expresión de PTP1B se induce un incremento en los niveles de Her2 en cultivos primarios de cáncer de mama. Para confirmar estos hallazgos sobre la participación específica de PTP1B en la regulación del receptor Her2, evaluamos si el silenciamiento de PTP1B causaba el efecto contrario a la sobreexpresión, es decir una disminución de la expresión de Her2. Para esto se realizó el silenciamiento de PTP1B mediante shRNAs, se evaluó la expresión de PTP1B y Her2 por medio de Western Blot en los cultivos primarios: MBCD3 y MBCD23. Se encontró que el silenciamiento de PTP1B se asocia a una disminución en los niveles de expresión de Her2. Estos resultados sugieren que el silenciamiento de PTP1B se asocia con la modulación negativa del receptor Her2 **(Figura 8)**.



Nombre Cultivos Primarios	Nombre Cultivos Primarios
1. T47D	11. MBCD11
2. MBCD25	12. MBCD18
3. MBCD17	13. MBCD5-B3
4. MBCDF	14. MBCD14
5. MBCD5	15. MBCD20
6. MCF-7	16. MBCD23
7. MBCD1	17. MBCD24
8. MBCD3	18. MBCD27
9. MBCD4	19. MBCDL1
10. MBCD10	20. MBCDI1
	21. BT474

Figura 6. Western Blot de la expresión de los niveles de PTP1B en los diferentes cultivos primarios de cáncer de mama. Se separaron 20 μ g de proteína total, mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 9 % (SDS-PAGE). Se realizó Western Blot anti-PTP1B. La membrana se limpió y se hizo Western Blot anti-tubulina como control de carga.

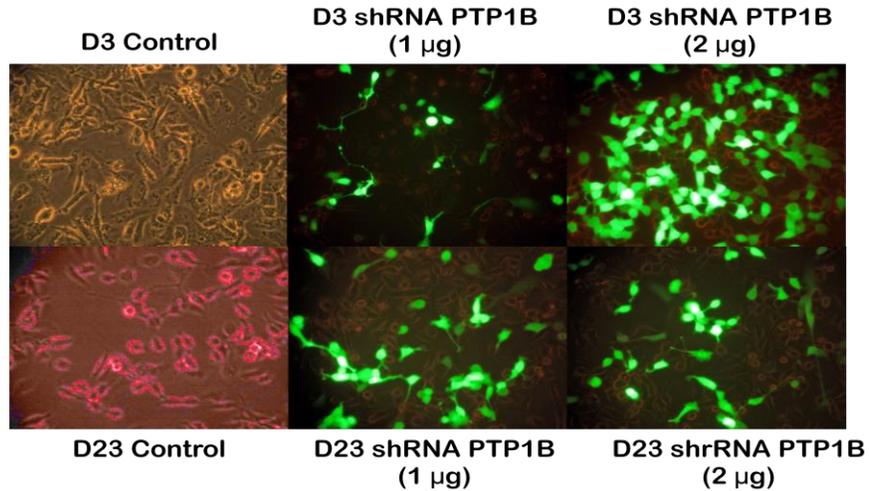


Figura 7. Transfección de células D3 con los plásmidos pGFP-V-RS sh control y pGFP-V-RS shRNA PTP1B con 1 o 2 µg totales de DNA. Foto tomada en microscopio de epifluorescencia 24 h post-transfección.

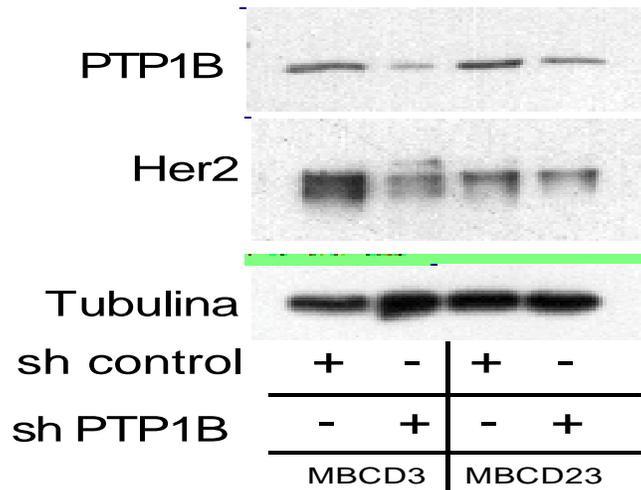


Figura 8. El silenciamiento de PTP1B se asocia con disminución en los niveles de expresión de Her2. Western Blot de cultivos primarios de cáncer de mama (MBCD3 y MBCD23) transfectados con el plásmido pGFP-V-RS sh control y pGFP-V-RS PTP1B shRNA. Se separaron 20 µg de proteína total, mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 9% (SDS-PAGE). Se realizó Western Blot anti-PTP1B, anti-Her2 y anti-tubulina.

8.4 EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE PTP1B SOBRE LA LIGASA DE BIQUITINA, CBLB

La señalización de los receptores de factores de crecimiento se encuentra regulada de forma negativa por medio de la ubiquitinación, proceso por el cual estos receptores son internalizados vía endocítica y posteriormente conducidos hacia los lisosomas para su degradación. Este proceso está mediado por las ligasas de ubiquitina de la familia Cbl. Tomando en cuenta que en nuestro laboratorio se había propuesto que la disminución de la ligasa de ubiquitina, Cblb, como el mecanismo por el cual PTP1B regula Her2, decidimos evaluar si esto produce un incremento en la expresión de Cblb en las células silenciadas para PTP1B. Encontramos que el silenciamiento de PTP1B sí se asocia a una elevación de los niveles de expresión de Cblb en los cultivos MBCD3 sh1B y MBCD23 sh1B, lo que sugiere que la disminución de Her2 puede deberse a un aumento de la degradación endocítica mediada por Cblb (**Figura 9**).

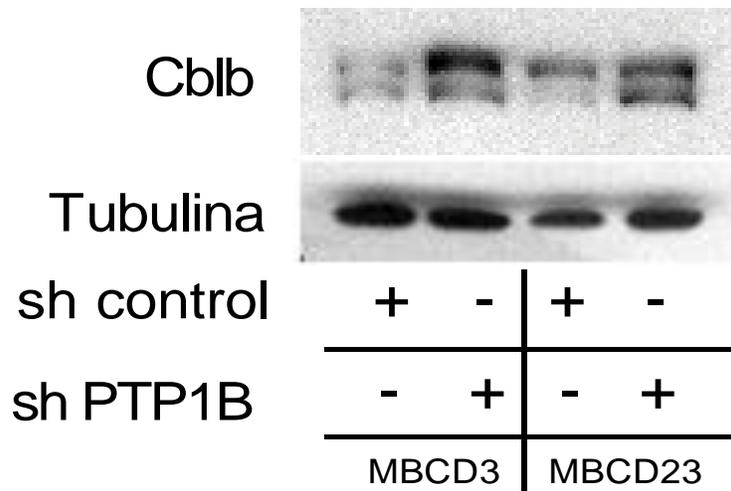


Figura 9. El silenciamiento de PTP1B se asocia con aumento de la expresión de Cblb. Western Blot de cultivos primarios de cáncer de mama (MBCD3 y MBCD23) transfectados con el plásmido pGFP-V-RS sh control y pGFP-V-RS PTP1B shRNA. Se separaron 20 µg de proteína total, mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida al 9 % (SDS-PAGE). Se realizó Western Blot anti-Cblb y anti-tubulina.

8.5 EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE PTP1B SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

Los resultados obtenidos hasta este momento, demuestran que el silenciamiento de PTP1B está asociado a una menor expresión de Her2. Se realizaron ensayos con el fin de evaluar si esta regulación negativa de Her2 tiene algún impacto sobre la proliferación celular. Observamos que existe una disminución de la proliferación celular en las células transfectadas con el plásmido pGFP-V-RS PTP1B shRNA, y que esta disminución de la proliferación celular fue evidente a partir del día 2 para las células MBCD3sh1B y a partir del día 4 para las células MBCD23 sh1B. Es importante mencionar que los efectos proliferativos más sobresalientes se observaron en la línea celular MBCD3, en la cual se encontró una decremento de 28 veces en la proliferación

celular comparada con la línea MBCD3 sh control (**Figura 10**). Estos resultados indican que el silenciamiento de PTP1B induce una menor capacidad de proliferación de las células tumorales de cáncer de mama. Estos resultados demuestran que esta fosfatasa ejerce una regulación negativa de la expresión de Her2.

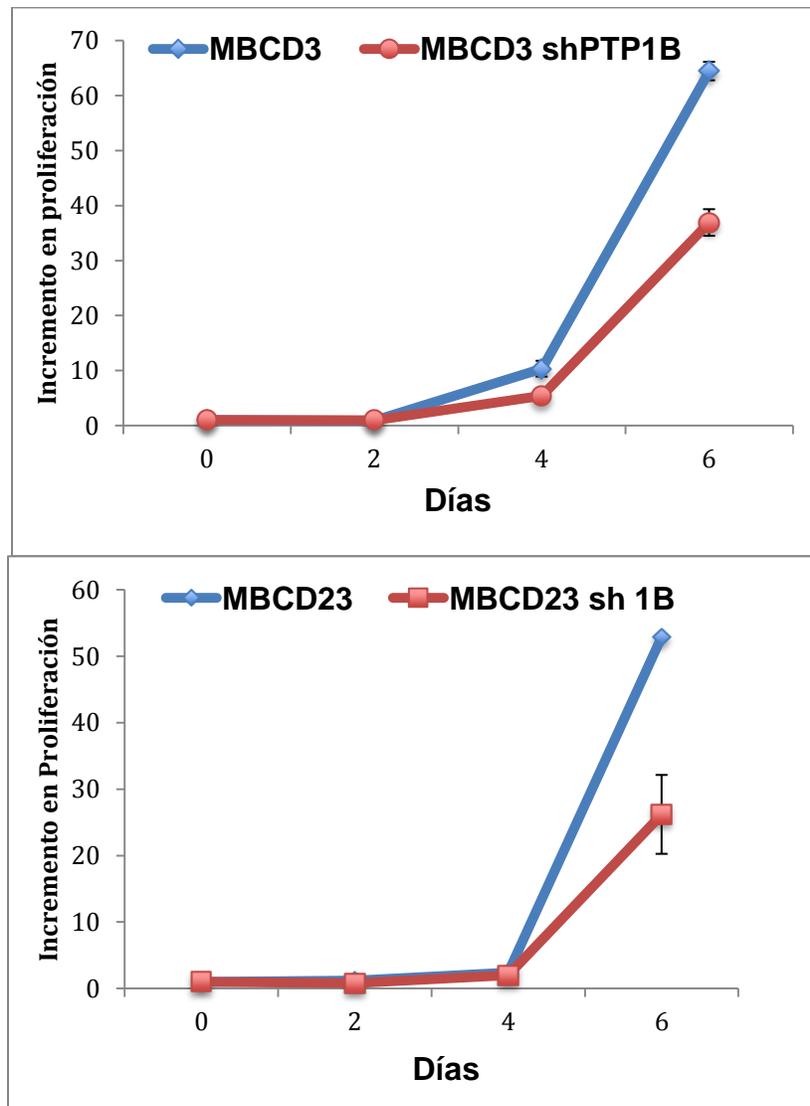


Figura 10. Disminución de la proliferación en las células silenciadas para PTP1B. Se sembraron 3,000 células/cm², sembradas por triplicado. Se evaluó la proliferación a los días 0, 2, 4 y 6 por medio de la técnica de cristal violeta. Los datos representan el incremento en la OD 570 nm contra el día 0.

8.6 EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE PTP1B SOBRE LA MIGRACIÓN CELULAR

Con la finalidad de profundizar en el efecto del silenciamiento de PTP1B en los diferentes procesos biológicos de las células tumorales de cáncer de mama, se realizaron ensayos de migración celular utilizando cámaras de Boyden. Los resultados encontrados previamente en nuestro laboratorio demostraron que la sobreexpresión de PTP1B confiere una mayor capacidad de migración celular. Nosotros decidimos evaluar si el silenciamiento de PTP1B produce el efecto contrario a su sobreexpresión. Los ensayos de migración celular se realizaron utilizando los cultivos primarios MBCD3 sh1B y MBCD3 sh control. Los resultados muestran que las células MBCD3 sh1B tienen una menor capacidad de migración celular en comparación con su línea control, el tratamiento con el inhibidor de PTP1B también induce disminución de la migración celular (**Figura 11**). Las células control se trataron con inhibidor de PTP1B para confirmar con la inhibición farmacológica la especificidad de la migración mediada por PTP1B.

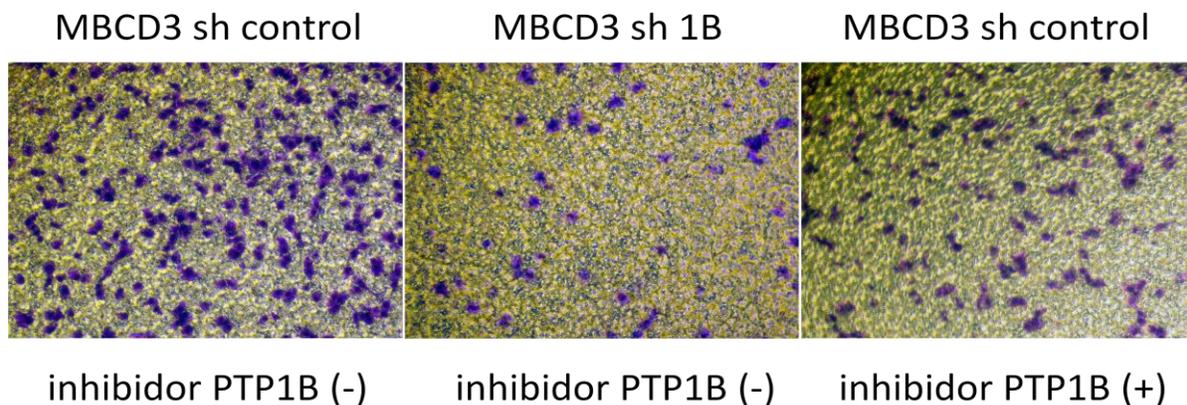


Figura 11. Se sembraron 200,000 células en la cámara de Boyden y se dejaron pasar a través de la membrana por 8 horas. Las células que migraron se tiñeron con cristal violeta y se tomaron fotografías a 10x en un microscopio invertido.

Estos datos confirman que tanto la inhibición farmacológica como el silenciamiento de PTP1B disminuyen la capacidad de migración de las células tumorales de cáncer de mama, lo cual demuestra que PTP1B es un regulador importante de procesos biológicos como la proliferación y migración de células de cáncer de mama y puede ser considerado como un factor pronóstico y predictivo en cáncer de mama.

DISCUSIÓN

En los últimos años PTP1B ha sido asociada en la oncogénesis de varias neoplasias, entre ellas cáncer de ovario, colon, esófago y mama entre otras [55, 61, 70-72]. En modelos murinos que sobreexpresan Her2 se demostró que la delección del gen de *ptpn1* produce un retraso en el desarrollo de tumores mamarios y resistencia para el desarrollo de metástasis pulmonares [63, 64]. En humanos, se ha demostrado que la ganancia o amplificación de la región del cromosoma 20q13, sitio en el cual está localizada PTP1B, está asociada con pobre pronóstico en cáncer de mama [63, 64]. Recientemente, se reportó que en una cohorte de 1402 muestras de tejido de cáncer de mama, que PTP1B se expresó en el 49% de las muestras, se correlacionó esta expresión de PTP1B con algunos factores de mal pronóstico ya establecidos, mostrando una tendencia a tener mayor expresión de PTP1B en pacientes Her2 positivo; así mismo, se demostró que la expresión de PTP1B es un predictor independiente de supervivencia en las pacientes con cáncer de mama [65]. En nuestro laboratorio, estudios previos han demostrado que PTP1B regula de forma positiva la expresión de Her2 con un efecto dosis respuesta. Se encontró que la sobreexpresión de PTP1B provoca incremento en los niveles de expresión de Her2 y que esto se asocia a

mayor capacidad de proliferación y migración celular en cultivos primarios de cáncer de mama [69]. Por nuestra parte confirmamos estos datos mediante el silenciamiento de PTP1B. Los resultados demostraron que el silenciamiento de PTP1B provoca una menor expresión de Her2 en cultivos primarios de cáncer de mama, con lo cual podemos concluir que PTP1B es un regulador de Her2. En las últimas décadas se han descrito varios mecanismos por los cuales los receptores de factores de crecimiento participan en la oncogénesis, estos incluyen, la amplificación del receptor, la translocación cromosómica y mutaciones puntuales. Estos cambios dan lugar a una mayor actividad catalítica de estos receptores [34, 73]. Además, existe evidencia creciente que el escape a los mecanismos de regulación negativa del receptor, es un evento importante en la desregulación de los receptores de factores de crecimiento. Hasta el momento, se desconoce el mecanismo exacto por el cual la sobreexpresión de PTP1B favorece una mayor expresión de Her2. Sin embargo, hemos propuesto que este mecanismo podría ser a través de la defosforilación de algún regulador de la degradación endocítica de Her2, lo cual conduce a una menor degradación y por lo tanto a una mayor expresión de este receptor. Para apoyar esta teoría, se sabe que Her1 tiene una tirosina al final de su dominio intracelular que es fosforilada y sirve de reconocimiento para la ligasa de ubiquitina c-Cbl, la cual induce su internalización dentro de vesículas endocíticas y conduce al receptor Her1 hacia los lisosomas para su degradación [62, 74]. Nosotros planteamos que puede existir un mecanismo similar para Her2, es decir, si PTP1B mantiene defosforilada a la tirosina que sirve de reconocimiento para Cblb, esto conduciría a una menor degradación de Her2 y por lo tanto a su acumulación en la membrana celular. De esta forma se explicaría como la

sobreexpresión de PTP1B aumenta los niveles de Her2. Previamente en nuestro laboratorio se encontró que la sobreexpresión de PTP1B correlaciona con una disminución en los niveles de expresión de Cblb, lo cual sugiere que la sobreexpresión de Her2 puede estar asociada a una disminución de su degradación endocítica mediada por esta ligasa de ubiquitina. Nosotros confirmamos este fenómeno mediante el silenciamiento de PTP1B, encontramos que el silenciamiento de PTP1B si correlaciona con una mayor expresión de los niveles de Cblb, lo cual puede estar asociado a una mayor degradación endocítica de Her2 que se traduce en menores niveles de proteína.

Como anteriormente se mencionó, la sobreexpresión de PTP1B induce una mayor capacidad de proliferación y migración celular en cultivos primarios de cáncer de mama [69]. Nuestros resultados concuerdan con lo anterior ya que el silenciamiento de PTP1B disminuye la capacidad proliferativa, lo que muy probablemente está asociado con la disminución de Her2 mediado por la ausencia de PTP1B. [75, 76].

Algunos estudios sugieren que existen diferentes mecanismos a través de los cuales la activación de Her2 confiere a las células de cáncer de mama una mayor capacidad de proliferación y migración celular, entre estos mecanismos se encuentra la activación de c-Jun o la ruptura de la adhesión celular mediado por STAT3 [77, 78], o a través de la activación de otras proteínas intermediarias como metaloproteinasas o integrinas. Se sabe que la simple expresión de Her2 no explica por completo la capacidad invasiva de las células tumorales de mama, pero se cree que este fenotipo invasivo puede estar mediado por la activación y regulación de otras vías de señalización, entre las que se

encuentran: PI3K, c-Src, PKC α , FAK, integrina α 4, y el factor de crecimiento transformante β , entre otras [76, 79-84].

Fathers et al, relacionaron la expresión de las proteínas adaptadoras Crk (del inglés CT10 regulator of kinasa) en la integración de señales celulares que regulan la capacidad de proliferación, migración e invasividad en líneas celulares de cáncer de mama. Estos autores encontraron una asociación entre la expresión de las proteínas adaptadoras Crk y tumores de algo grado, pobremente diferenciados y alta capacidad proliferativa, lo cual confería a estas líneas celulares un fenotipo más agresivo. [85, 86]. La expresión de estas proteínas adaptadoras también se ha demostrado en otras neoplasias entre las cuales se encuentran: ovario, estomago y pulmón entre otros. Existen estudios que han demostrado *in vitro* que las proteínas adaptadoras Crk juegan un papel importante en la motilidad celular; a pesar de esto aún se sabe muy poco del rol de estas Crk en la progresión del cáncer de mama *in vivo*. [85, 87]. Uno de los posibles mecanismos, a través del cual PTP1B, pudiera contribuir a un aumento de la capacidad de migración celular puede ser a través de la defosforilación del dominio de unión p130 cas (Crk – associated substrate), con la consecuente activación de Crk y el inicio de la señalización río abajo de la vía de las integrinas que finalmente provocaría en una mayor capacidad de migración celular. [88] [89, 90]

En los resultados encontrados previamente en nuestro laboratorio, parece que la expresión de PTP1B confiere, al menos en modelos *in vitro*, una mayor agresividad tumoral en cáncer de mama, en términos de mayor capacidad de proliferación celular probablemente mediada a través de la regulación positiva de Her2 y una mayor capacidad de migración celular probablemente mediada a través de la activación de

proteínas adaptadoras Crk, esta mayor migración celular se traduciría en mayor capacidad de desarrollo de metástasis. Por nuestra parte, demostramos que el silenciamiento de PTP1B causa el efecto contrario a su sobreexpresión, es decir regula de forma negativa la expresión de Her2 y confiere una menor capacidad de proliferación y migración celular. Estos resultados coinciden con los datos reportados en modelos murinos en los que se demuestra que la ausencia de PTP1B se asocia con retraso en el desarrollo de tumores mamarios y menor capacidad de desarrollar metástasis pulmonares. En su conjunto, estos datos sugieren fuertemente que PTP1B puede ser un marcador pronóstico y predictivo en cáncer de mama. Esto justifica el desarrollo de inhibidores específicos para esta fosfatasa que puedan disminuir el potencial metastásico de esta enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ferlay, J., et al., *Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008*. Int J Cancer. **127**(12): p. 2893-917.
2. Siegel, R., D. Naishadham, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2013*. CA Cancer J Clin. **63**(1): p. 11-30.
3. Gasparini, G., F. Pozza, and A.L. Harris, *Evaluating the potential usefulness of new prognostic and predictive indicators in node-negative breast cancer patients*. J Natl Cancer Inst, 1993. **85**(15): p. 1206-19.
4. Carter, C.L., C. Allen, and D.E. Henson, *Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases*. Cancer, 1989. **63**(1): p. 181-7.
5. Klijn, J.G., E.M. Berns, and J.A. Foekens, *Prognostic factors and response to therapy in breast cancer*. Cancer Surv, 1993. **18**: p. 165-98.
6. Mitra, I. and K.D. MacRae, *A meta-analysis of reported correlations between prognostic factors in breast cancer: does axillary lymph node metastasis represent biology or chronology?* Eur J Cancer, 1991. **27**(12): p. 1574-83.
7. van de Vijver, M.J., et al., *Neu-protein overexpression in breast cancer. Association with comedo-type ductal carcinoma in situ and limited prognostic value in stage II breast cancer*. N Engl J Med, 1988. **319**(19): p. 1239-45.
8. Lowe, S.W., et al., *p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo*. Science, 1994. **266**(5186): p. 807-10.
9. Elledge, R.M., et al., *Accumulation of p53 protein as a possible predictor of response to adjuvant combination chemotherapy with cyclophosphamide, methotrexate, fluorouracil, and prednisone for breast cancer*. J Natl Cancer Inst, 1995. **87**(16): p. 1254-6.
10. Schechter, A.L., et al., *The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen*. Nature, 1984. **312**(5994): p. 513-6.
11. Yarden, Y. and M.X. Sliwkowski, *Untangling the ErbB signalling network*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(2): p. 127-37.
12. Slamon, D.J., et al., *Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer*. Science, 1989. **244**(4905): p. 707-12.
13. Perren, T.J., *c-erbB-2 oncogene as a prognostic marker in breast cancer*. Br J Cancer, 1991. **63**(3): p. 328-32.
14. Callahan, R. and G. Campbell, *Mutations in human breast cancer: an overview*. J Natl Cancer Inst, 1989. **81**(23): p. 1780-6.
15. Gullick, W.J., et al., *c-erbB-2 protein overexpression in breast cancer is a risk factor in patients with involved and uninvolved lymph nodes*. Br J Cancer, 1991. **63**(3): p. 434-8.

16. Borg, A., et al., *HER-2/neu amplification predicts poor survival in node-positive breast cancer*. Cancer Res, 1990. **50**(14): p. 4332-7.
17. Kallioniemi, O.P., et al., *Association of c-erbB-2 protein over-expression with high rate of cell proliferation, increased risk of visceral metastasis and poor long-term survival in breast cancer*. Int J Cancer, 1991. **49**(5): p. 650-5.
18. Bacus, S.S., et al., *HER-2/neu oncogene expression and DNA ploidy analysis in breast cancer*. Arch Pathol Lab Med, 1990. **114**(2): p. 164-9.
19. Lee, A.K., et al., *DNA ploidy, proliferation, and neu-oncogene protein overexpression in breast carcinoma*. Mod Pathol, 1992. **5**(1): p. 61-7.
20. Slamon, D.J., et al., *Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene*. Science, 1987. **235**(4785): p. 177-82.
21. Slamon, D.E., W, Robert N, et. al. , *Phase III trial comparing AC-T with AC-TH and with TCH in the adjuvant treatment of Her2 positive early breast cancer patients: second interim efficacy analysis*. Res Treat (abst52) 2006.
22. Muller, W.J., et al., *Single-step induction of mammary adenocarcinoma in transgenic mice bearing the activated c-neu oncogene*. Cell, 1988. **54**(1): p. 105-15.
23. Bouchard, L., et al., *Stochastic appearance of mammary tumors in transgenic mice carrying the MMTV/c-neu oncogene*. Cell, 1989. **57**(6): p. 931-6.
24. Romond, E.H., et al., *Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer*. N Engl J Med, 2005. **353**(16): p. 1673-84.
25. Ross, J.S., et al., *Targeted therapy in breast cancer: the HER-2/neu gene and protein*. Mol Cell Proteomics, 2004. **3**(4): p. 379-98.
26. Piccart-Gebhart, M.J., et al., *Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer*. N Engl J Med, 2005. **353**(16): p. 1659-72.
27. Joensuu, H., et al., *Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab for breast cancer*. N Engl J Med, 2006. **354**(8): p. 809-20.
28. Smith, I., et al., *2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomised controlled trial*. Lancet, 2007. **369**(9555): p. 29-36.
29. Hunter, T., *The role of tyrosine phosphorylation in cell growth and disease*. Harvey Lect, 1998. **94**: p. 81-119.
30. Jiang, Z.X. and Z.Y. Zhang, *Targeting PTPs with small molecule inhibitors in cancer treatment*. Cancer Metastasis Rev, 2008. **27**(2): p. 263-72.
31. Zhang, Z.Y., *Protein tyrosine phosphatases: prospects for therapeutics*. Curr Opin Chem Biol, 2001. **5**(4): p. 416-23.

32. Arena, S., S. Benvenuti, and A. Bardelli, *Genetic analysis of the kinome and phosphatome in cancer*. Cell Mol Life Sci, 2005. **62**(18): p. 2092-9.
33. Ventura, J.J. and A.R. Nebreda, *Protein kinases and phosphatases as therapeutic targets in cancer*. Clin Transl Oncol, 2006. **8**(3): p. 153-60.
34. Lamorte, L. and M. Park, *The receptor tyrosine kinases: role in cancer progression*. Surg Oncol Clin N Am, 2001. **10**(2): p. 271-88, viii.
35. Ostman, A., C. Hellberg, and F.D. Bohmer, *Protein-tyrosine phosphatases and cancer*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(4): p. 307-20.
36. Brown-Shimer, S., et al., *Molecular cloning and chromosome mapping of the human gene encoding protein phosphotyrosyl phosphatase 1B*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(13): p. 5148-52.
37. Brown-Shimer, S., et al., *Effect of protein tyrosine phosphatase 1B expression on transformation by the human neu oncogene*. Cancer Res, 1992. **52**(2): p. 478-82.
38. Forsell, P.A., et al., *Genomic characterization of the human and mouse protein tyrosine phosphatase-1B genes*. Gene, 2000. **260**(1-2): p. 145-53.
39. Andersen, J.N., et al., *Structural and evolutionary relationships among protein tyrosine phosphatase domains*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(21): p. 7117-36.
40. Dhillon, A.S., et al., *Regulation of Raf-1 activation and signalling by dephosphorylation*. EMBO J, 2002. **21**(1-2): p. 64-71.
41. Li, J., et al., *PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer*. Science, 1997. **275**(5308): p. 1943-7.
42. Bittinger, S., M. Alexiadis, and P.J. Fuller, *Expression status and mutational analysis of the PTEN and P13K subunit genes in ovarian granulosa cell tumors*. Int J Gynecol Cancer, 2009. **19**(3): p. 339-42.
43. Bourdeau, A., N. Dube, and M.L. Tremblay, *Cytoplasmic protein tyrosine phosphatases, regulation and function: the roles of PTP1B and TC-PTP*. Curr Opin Cell Biol, 2005. **17**(2): p. 203-9.
44. Tonks, N.K., *Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(11): p. 833-46.
45. Tonks, N.K., C.D. Diltz, and E.H. Fischer, *Purification of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta*. J Biol Chem, 1988. **263**(14): p. 6722-30.
46. Frangioni, J.V., et al., *The nontransmembrane tyrosine phosphatase PTP-1B localizes to the endoplasmic reticulum via its 35 amino acid C-terminal sequence*. Cell, 1992. **68**(3): p. 545-60.
47. Liu, F. and J. Chernoff, *Protein tyrosine phosphatase 1B interacts with and is tyrosine phosphorylated by the epidermal growth factor receptor*. Biochem J, 1997. **327** (Pt 1): p. 139-45.

48. Haj, F.G., et al., *Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatase-1B*. J Biol Chem, 2003. **278**(2): p. 739-44.
49. Anderie, I., I. Schulz, and A. Schmid, *Direct interaction between ER membrane-bound PTP1B and its plasma membrane-anchored targets*. Cell Signal, 2007. **19**(3): p. 582-92.
50. Woodford-Thomas, T.A., J.D. Rhodes, and J.E. Dixon, *Expression of a protein tyrosine phosphatase in normal and v-src-transformed mouse 3T3 fibroblasts*. J Cell Biol, 1992. **117**(2): p. 401-14.
51. Lammers, R., et al., *Differential activities of protein tyrosine phosphatases in intact cells*. J Biol Chem, 1993. **268**(30): p. 22456-62.
52. Liang, F., et al., *The role of protein-tyrosine phosphatase 1B in integrin signaling*. J Biol Chem, 2005. **280**(26): p. 24857-63.
53. Elchebly, M., et al., *Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene*. Science, 1999. **283**(5407): p. 1544-8.
54. Klamann, L.D., et al., *Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(15): p. 5479-89.
55. Fan, G., et al., *Protein Tyrosine Phosphatase 1B Antagonized Signaling by IGF-1 Receptor and BRK/PTK6 in Ovarian Cancer Cells*. J Biol Chem.
56. LaMontagne, K.R., Jr., G. Hannon, and N.K. Tonks, *Protein tyrosine phosphatase PTP1B suppresses p210 bcr-abl-induced transformation of rat-1 fibroblasts and promotes differentiation of K562 cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(24): p. 14094-9.
57. Bjorge, J.D., A. Pang, and D.J. Fujita, *Identification of protein-tyrosine phosphatase 1B as the major tyrosine phosphatase activity capable of dephosphorylating and activating c-Src in several human breast cancer cell lines*. J Biol Chem, 2000. **275**(52): p. 41439-46.
58. Liu, F., M.A. Sells, and J. Chernoff, *Protein tyrosine phosphatase 1B negatively regulates integrin signaling*. Curr Biol, 1998. **8**(3): p. 173-6.
59. Tanner, M.M., et al., *Independent amplification and frequent co-amplification of three nonsyntenic regions on the long arm of chromosome 20 in human breast cancer*. Cancer Res, 1996. **56**(15): p. 3441-5.
60. Radke, I., et al., *Expression and prognostic impact of the protein tyrosine phosphatases PRL-1, PRL-2, and PRL-3 in breast cancer*. Br J Cancer, 2006. **95**(3): p. 347-54.
61. Arias-Romero, L.E., et al., *Activation of Src by protein tyrosine phosphatase 1B is required for ErbB2 transformation of human breast epithelial cells*. Cancer Res, 2009. **69**(11): p. 4582-8.
62. Bryant, D.M. and J.L. Stow, *Nuclear translocation of cell-surface receptors: lessons from fibroblast growth factor*. Traffic, 2005. **6**(10): p. 947-54.

63. Julien, S.G., et al., *Protein tyrosine phosphatase 1B deficiency or inhibition delays ErbB2-induced mammary tumorigenesis and protects from lung metastasis*. Nat Genet, 2007. **39**(3): p. 338-46.
64. Bentires-Alj, M. and B.G. Neel, *Protein-tyrosine phosphatase 1B is required for HER2/Neu-induced breast cancer*. Cancer Res, 2007. **67**(6): p. 2420-4.
65. Soysal, S., et al., *PTP1B expression is an independent positive prognostic factor in human breast cancer*. Breast Cancer Res Treat. **137**(2): p. 637-44.
66. Mohapatra, B., et al., *Protein tyrosine kinase regulation by ubiquitination: critical roles of Cbl-family ubiquitin ligases*. Biochim Biophys Acta. **1833**(1): p. 122-39.
67. Polo, S., *Signaling-mediated control of ubiquitin ligases in endocytosis*. BMC Biol. **10**: p. 25.
68. Severe, N., F.X. Dieudonne, and P.J. Marie, *E3 ubiquitin ligase-mediated regulation of bone formation and tumorigenesis*. Cell Death Dis. **4**: p. e463.
69. Osvaldo Hernández-Flores, J.E.-L., Elizabeth Escobar-Arriaga, Eucario León-Rodríguez, María de Jesús Ibarra-Sánchez, *Sobreexpresión de PTP1B induce mayor proliferación celular en cultivos primarios de cáncer de mama*. Gaceta Mexicana de Oncología 2013. **12**(1): p. 4-9.
70. Wiener, J.R., et al., *Overexpression of the tyrosine phosphatase PTP1B is associated with human ovarian carcinomas*. Am J Obstet Gynecol, 1994. **170**(4): p. 1177-83.
71. Warabi, M., et al., *Expression of protein tyrosine phosphatases and its significance in esophageal cancer*. Exp Mol Pathol, 2000. **68**(3): p. 187-95.
72. Zhu, S., J.D. Bjorge, and D.J. Fujita, *PTP1B contributes to the oncogenic properties of colon cancer cells through Src activation*. Cancer Res, 2007. **67**(21): p. 10129-37.
73. Blume-Jensen, P. and T. Hunter, *Oncogenic kinase signalling*. Nature, 2001. **411**(6835): p. 355-65.
74. Baulida, J., et al., *All ErbB receptors other than the epidermal growth factor receptor are endocytosis impaired*. J Biol Chem, 1996. **271**(9): p. 5251-7.
75. Karunagaran, D., et al., *ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer*. EMBO J, 1996. **15**(2): p. 254-64.
76. Woods Ignatoski, K.M., et al., *p38MAPK induces cell surface alpha4 integrin downregulation to facilitate erbB-2-mediated invasion*. Neoplasia, 2003. **5**(2): p. 128-34.
77. Yuan, G., et al., *HER2-dependent MMP-7 expression is mediated by activated STAT3*. Cell Signal, 2008. **20**(7): p. 1284-91.
78. Qian, L., et al., *A novel cis-acting element in Her2 promoter regulated by Stat3 in mammary cancer cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **345**(2): p. 660-8.

79. Ignatoski, K.M., et al., *ERBB-2 overexpression confers PI 3' kinase-dependent invasion capacity on human mammary epithelial cells*. Br J Cancer, 2000. **82**(3): p. 666-74.
80. Woods Ignatoski, K.M., et al., *The role of phosphatidylinositol 3'-kinase and its downstream signals in erbB-2-mediated transformation*. Mol Cancer Res, 2003. **1**(7): p. 551-60.
81. Hermanto, U., C.S. Zong, and L.H. Wang, *ErbB2-overexpressing human mammary carcinoma cells display an increased requirement for the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway in anchorage-independent growth*. Oncogene, 2001. **20**(51): p. 7551-62.
82. Carraway, K.L., 3rd and C. Sweeney, *Co-opted integrin signaling in ErbB2-induced mammary tumor progression*. Cancer Cell, 2006. **10**(2): p. 93-5.
83. Guo, W., et al., *Beta 4 integrin amplifies ErbB2 signaling to promote mammary tumorigenesis*. Cell, 2006. **126**(3): p. 489-502.
84. Gambaletta, D., et al., *Cooperative signaling between alpha(6)beta(4) integrin and ErbB-2 receptor is required to promote phosphatidylinositol 3-kinase-dependent invasion*. J Biol Chem, 2000. **275**(14): p. 10604-10.
85. Fathers, K.E., et al., *CrklI transgene induces atypical mammary gland development and tumorigenesis*. Am J Pathol. **176**(1): p. 446-60.
86. Fathers, K.E., et al., *Crk adaptor proteins act as key signaling integrators for breast tumorigenesis*. Breast Cancer Res. **14**(3): p. R74.
87. Rodrigues, S.P., et al., *Crkl and CrklII function as key signaling integrators for migration and invasion of cancer cells*. Mol Cancer Res, 2005. **3**(4): p. 183-94.
88. Matsuda, M., B.J. Mayer, and H. Hanafusa, *Identification of domains of the v-crkl oncogene product sufficient for association with phosphotyrosine-containing proteins*. Mol Cell Biol, 1991. **11**(3): p. 1607-13.
89. Iwahara, T., et al., *CrklII regulates focal adhesion kinase activation by making a complex with Crk-associated substrate, p130Cas*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(51): p. 17693-8.
90. Matsuda, M., C.T. Reichman, and H. Hanafusa, *Biological and biochemical activity of v-Crk chimeras containing the SH2/SH3 regions of phosphatidylinositol-specific phospholipase C-gamma and Src*. J Virol, 1992. **66**(1): p. 115-21.