

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

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

**Modulación de la expresión de Her2 y PDGFR β , y regulación de la proliferación
y migración celular mediada por PTP1B en cultivos primarios de cáncer de
mama**

**T E S I S DE POSGRADO
PARA OBTENER EL DIPLOMA DE
SUB-ESPECIALISTA EN ONCOLOGÍA MÉDICA**

P R E S E N T A:

Dr. Osvaldo Hernández Flores

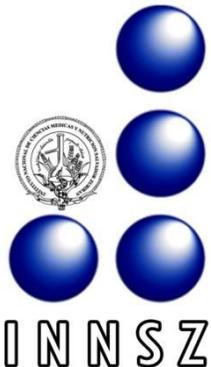
TUTOR:

Dr. Eucario León Rodríguez.

ASESORES DE TESIS:

Dra. María de Jesús Ibarra Sánchez
Dr. José Esparza López

México, Distrito Federal, Agosto de 2012.





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:

Dr. Eucario León Rodríguez
Coordinador y profesor titular de Oncología Médica
Tutor de Tesis

Dra. María de Jesús Ibarra Sánchez
Investigadora en Ciencias Médicas
Cotutora de Tesis

Dr. Luis F. Uscanga Domínguez
Director de Enseñanza

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

DEDICATORIAS

A mi madre por todo el amor, la comprensión y el apoyo constante; por enseñarme que por más grandes que sean los obstáculos basta la voluntad y la convicción para conseguirlos.

A mi padre, que aunque breve el camino recorrido a mí lado, dejo en mí vida la inspiración necesaria para continuar con la conquista de mis sueños.

A mi hermano Oscar Adrián Hernández Flores, mi mejor amigo y compañero incomparable. Por ser la mejor herencia que mis padres me han dejado.

A la familia Flores Castillo, por todo el cariño y el apoyo recibido mí vida durante toda.

A Diana Bravo, por ser motivo de felicidad en mi vida y un gran apoyo durante los últimos meses de realización de este proyecto.

A todos mis maestros que durante 14 años han guiado mi camino en medicina. Al Dr. Eucario León por su confianza y la oportunidad de pertenecer a esa gran elite que representa la Oncología en el INCMNSZ. A la Dra. María de Jesús Ibarra y al Dr. José Esparza por su enseñanza, paciencia y apoyo para hacer de esté proyecto de investigación una experiencia inigualable.

AGRADECIMIENTOS

A Mary y Pepe, grandes maestros y guías durante el desarrollo de este proyecto.

A la UNAM, el HJM y el INCMNSZ, mis instituciones educativas a quienes agradezco enormemente la formación brindada durante este largo camino.

A Karlita, Julio y Sharon, grandes y entrañables amigos. Compañeros de los pases de visita, consulta, investigación.... pero, lo más importante, amigos para toda la vida.

A Roberto De la Peña y David Huitzil, por todos los conocimientos aportados, y por enseñarme que el ser un gran médico, conlleva en sí mismo el ser una gran persona.

A mis principales motivos de mí deber médico, a mis pacientes. Por brindarme la mayor recompensa que puedo recibir con cada agradecimiento y con sus bendiciones. Por mostrarme que pese a la adversidad, siempre existen motivos para brindar una sonrisa. Por su ejemplo de lucha, a Dolores Bustamante, Oscar Luna, Manuel León, Teresa Moncada y Lizbeth Ruz.

“Y si sentís que os quema el alma de saber; si os creéis capaces de consagrar la vida a un estudio que no se acaba nunca y a una ciencia que no se alcanzará jamás; si sentís en los labios algo como la sed de realizarnos a vosotros mismos haciendo el bien a los demás; si queréis sentir, de vez en cuando, bajo vuestra indumentaria de médicos, la picadura de un áspero sayal que os recuerde que la vida no es solo deber sino es amor, y si a cambio de todo eso que dais, de vuestro esfuerzo y sacrificio, os basta con las satisfacciones más hondas del espíritu, entonces..... ¡Vosotros sí seréis médicos!”

Dr. Ignacio Chávez

ÍNDICE

Página

Introducción.....	8
1. Cáncer de mama.	
a. Epidemiología.....	8
b. Marcadores pronósticos.....	10
2. Receptor Her2.....	11
3. Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y sus receptores (PDGFR).....	13
4. Fosforilación de proteínas en residuos de tirosina	14
5. Familia de proteínas fosfatasa de tirosina.....	15
6. PTP 1B.....	16
Planteamiento del Problema.....	19
Justificación.....	19
Objetivos generales.....	20
Objetivos específicos.....	20
Hipótesis.....	20
Material y Métodos.....	21
Resultados.....	25
1. Generación de cultivos de cáncer de mama que sobreexpresen PTP1B WT de manera estable.	
a. Curvas de zeocina.....	25
b. Sobreexpresión de PTP1B en líneas celulares y cultivos primarios de cáncer de mama.....	26
2. Efecto de la sobreexpresión de PTP1B sobre la modulación de la expresión de factores de crecimiento (Her2 y PDGFR β).....	27
3. Efecto de la expresión de PTP1B sobre la proliferación celular.	29
4. Efecto de la expresión de PTP1B sobre la migración.....	30
5. Regulación negativa de la ligasa de ubiquitina, Cblb.....	33
Discusión y Conclusiones.....	34
Bibliografía.....	38

REGULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN E INVASIVIDAD CELULAR MEDIADA POR PTP-1B EN CULTIVOS PRIMARIOS DE CÁNCER DE MAMA.

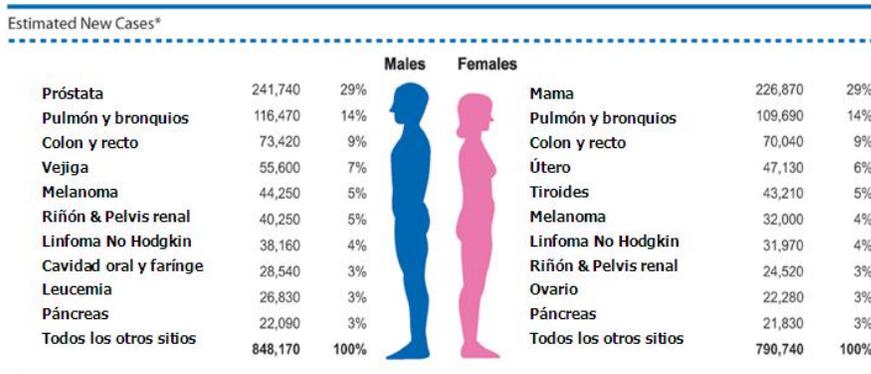
Introducción

Cáncer de mama: Epidemiología

El cáncer es un problema importante de salud pública en México y en el mundo. A nivel mundial, el cáncer de mama es el más frecuente entre mujeres con un estimado de 1.38 millones de casos nuevos diagnosticados en el 2008 (22.9% de todos los canceres), con 458 mil muertes en la población femenina, que lo ubica en el segundo lugar como causa de muerte (10.9% de todos los canceres), después del cáncer de pulmón¹. Los datos publicados en el 2012 por la Sociedad Americana de Cáncer, ubican en el 2012 al cáncer de mama como el más frecuente en mujeres, representando el 29% del total de los cánceres en este género (**Figura 1**)².



Figura 1. Casos de Cáncer estimados en EUA por el SEER, 2012. Fuente: American Cancer Society



En Estados Unidos de América (EUA) el cáncer de mama se ubica en primer lugar como causa de muerte por cáncer en la población femenina, representando el 26% del total de las muertes por cáncer, con 72,500 muertes por cáncer en un año (**Figura 2**)². Actualmente, es el tipo de cáncer más común en el género femenino, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo con cerca de 690 000 nuevos casos estimados en cada región (relación de población 1:4). Las tasas de incidencia varían desde 19.3 por 100 000 mujeres en el Este de África a 89.7 por 100 000 mujeres en el oeste de Europa¹. La tasa de mortalidad ha cambiado en los últimos años como consecuencia de una supervivencia mayor de cáncer de mama por el avance en el tamizaje y su tratamiento. Sin embargo, a pesar de esto, continúa siendo la causa más frecuente de muerte por cáncer en mujeres. En México, el panorama no es distinto a lo observado a nivel mundial, ya que el cáncer de mama se ubica en el primer lugar de incidencia en la población femenina, con un total de alrededor de 14 mil casos en el 2008, representando el 22% de todos los cánceres en este género. También representa la primera causa de muerte por cáncer en el sexo femenino, con 5 mil muertes al año¹.



Figura 2. Muertes por cáncer estimadas en EUA por el SEER, 2012. Fuente: American Cancer Society

Estimated Deaths					
	Males		Females		
Próstata	87,750	29%		Mama	72,590 26%
Pulmón y bronquios	28,170	9%		Pulmón y bronquios	39,510 14%
Colon y recto	26,470	9%		Colon y recto	25,220 9%
Vejiga	18,850	6%		Útero	18,540 7%
Melanoma	13,980	5%		Tiroides	15,500 6%
Riñón & Pelvis renal	13,500	4%		Melanoma	10,040 4%
Linfoma No Hodgkin	12,040	4%		Linfoma No Hodgkin	8,620 3%
Cavidad oral y faringe	10,510	3%		Riñón & Pelvis renal	8,010 3%
Leucemia	10,320	3%		Ovario	6,570 2%
Páncreas	8,650	3%		Páncreas	5,980 2%
Todos los otros sitios	301,820	100%		Todos los otros sitios	275,370 100%

2012 American Cancer Society

Marcadores pronósticos en Cáncer de Mama

Entre los factores de pronóstico clásicos para el cáncer de mama, los de mayor importancia son: el tamaño tumoral y el estado de los ganglios linfáticos axilares. La supervivencia a 10 años varía desde un 80% en tumores sin metástasis ganglionares hasta un 20-40% en tumores con actividad ganglionar positiva³. El estudio morfológico de la neoplasia también nos aporta parámetros pronósticos de gran relevancia como lo son el grado de diferenciación y su clasificación histológica, es bien conocido que algunos tipos histopatológicos se caracterizan por un comportamiento más agresivo como es el carcinoma ductal. Existen otros tipos histológicos de menor agresividad que son el carcinoma coloide, tubular, papilar y medular. En la última década se han investigado más de 100 nuevos marcadores de pronóstico; sin embargo, son pocos los que pueden considerarse suficientemente caracterizados y/o validados⁴⁻⁶. Entre los distintos marcadores pronósticos se encuentran oncogenes cuya amplificación o sobreexpresión se relaciona con mayor agresividad tumoral (*her2/neu*, *ciclina D1*) y genes supresores como el gen *p53*, con funciones críticas en el control del ciclo celular, cuyas alteraciones se asocian también a neoplasias más agresivas. Los marcadores pronósticos y de utilidad terapéutica para el cáncer de mama son: los receptores de estrógenos (ER) y progesterona (PR), y el receptor Her2. La gran mayoría de estudios disponibles sobre los genes *her2/neu* y *p53* les atribuye valor pronóstico sobre el intervalo libre de enfermedad, la supervivencia global y valor predictivo esencial en la terapia adyuvante. Ambos marcadores se han relacionado con mala respuesta al tratamiento con tamoxifeno y regímenes específicos de quimioterapia^{7,8}.

Receptor Her2

El interés por el estudio de las bases moleculares del cáncer ha llevado a la identificación de distintos oncogenes relacionados con los procesos biológicos como la proliferación y diferenciación celular. Alteraciones en estos oncogenes influyen en el comportamiento agresivo de algunas neoplasias malignas. Uno de los más estudiados es el oncogén *her2/neu*, miembro de la familia de receptores Her, que además incluyen al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR/Her1/ErbB1), ErbB-3 (Her3) y ErbB-4 (Her4). Las proteínas de la familia Her son receptores de factores de crecimiento transmembranales tipo I que funcionan para activar cascadas de señalización intracelulares en respuesta a señales extracelulares. Su estructura consiste de un dominio extracelular, un dominio transmembranal y un dominio intracelular con actividad de cinasa de tirosina (**Figura 3**)^{29,30}. Después de la unión del ligando a su dominio extracelular, la proteína Her2 sufre dimerización y transfosforilación de su dominio intracelular. Estos residuos de tirosina fosforilados sirven de anclaje a numerosas moléculas de señalización intracelulares que conduce a la activación de una gran cantidad de vías río abajo que conducen a diversos efectos biológicos. La dimerización de los receptores de la familia Her conduce a la auto-fosforilación de varios residuos de tirosina, esta auto-fosforilación provoca la activación de cascadas de señalización de otras proteínas mediante su unión en los dominios SH2 a la fosfotirosina. Estas proteínas de señalización inician cascadas de transducción de varias señales, principalmente la MAPK, AKT y las vías de JNK, que conducen a la síntesis de ADN y a la proliferación celular. Estas proteínas modulan fenotipos tales como la migración celular, la adhesión y proliferación^{31,32}.

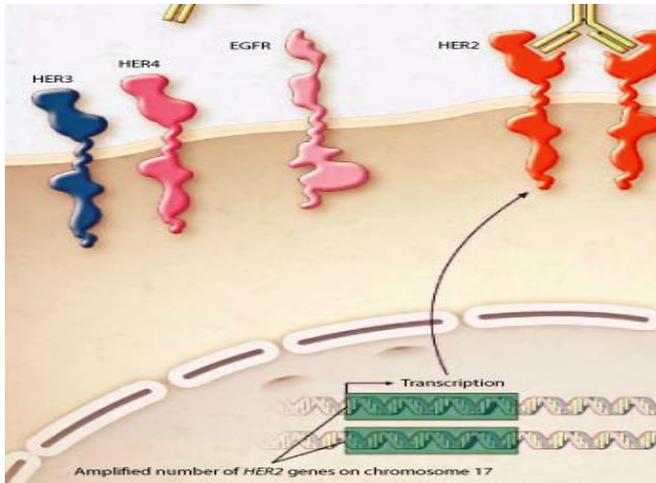


Figura 3. Familia de receptores Her, donde se incluyen: el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR/Her1/ ErbB1), ErbB-2 (Her2), ErbB-3 (Her3) y ErbB-4 (Her4). Su estructura consiste de un dominio extracelular, un dominio transmembranal y un dominio intracelular.

El papel pronóstico de Her2 en cáncer de mama fue descrito por Slamon y colaboradores en 1987. Este autor describió que la amplificación del gen *her2/neu* en carcinoma de mama se asociaba con un menor intervalo libre de enfermedad y menor supervivencia⁹. A partir de los trabajos de Slamon y colaboradores se han publicado numerosos artículos en los que se confirma la relación significativa entre amplificación del gen o sobreexpresión del producto codificado y mal pronóstico en cáncer de mama^{10,11}. Se ha establecido también relación entre sobreexpresión de *her2/neu* y otros factores pronósticos como: receptores hormonales negativos^{12,13}, tamaño tumoral^{13,14}, estadio¹⁰, alto grado tumoral^{15,16}, alta actividad proliferativa^{16,17} y DNA aneuploide o tetraploide^{16,18}. Aunque los resultados varían significativamente en los diversos estudios publicados, la sobreexpresión del gen se detecta en un 20-30% de casos de carcinoma de mama^{10,19,20}. Trabajos experimentales revelaron la capacidad de inducir carcinoma de mama en ratas mediante la activación específica y selectiva de Her2, así como la posibilidad de inhibir el crecimiento tumoral mediante tratamiento con anticuerpos específicos anti-Her2^{21,22}, en base a estos estudios el Her2 se convirtió en un atractivo blanco terapéutico. Su inhibición con el trastuzumab, anticuerpo diseñado en contra del dominio extracelular del receptor Her2, permitió que este fuera el

primer agente biológico aprobado para el tratamiento de cáncer de mama. En varios estudios la amplificación o sobreexpresión de Her2 ha mostrado ser un marcador independiente de respuesta al tratamiento con trastuzumab. Estos estudios han probado la eficacia y seguridad del trastuzumab en el tratamiento neoadyuvante, adyuvante y en la enfermedad metastásica de cáncer de mama, por lo que actualmente diversas guías de práctica clínica apoyan su uso rutinario²³⁻²⁸. La importancia de este oncogén no se limita, por tanto, a la posibilidad de estratificar a las pacientes en distintos grupos de riesgo, sino que es relevante en la toma de decisiones terapéuticas. En base a esto se debe considerar, desarrollar en un futuro nuevas estrategias terapéuticas encaminadas a contrarrestar la amplificación de Her2.

Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y sus receptores (PDGFR)

El factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) es un dímero formado por 2 cadenas polipeptídicas unidas por puentes disulfuro³³. El PDGF es el producto de cuatro diferentes genes que son ensamblados en cinco isoformas distintas conocidas como: AA, AB, BB, CC y DD³⁴. Dependiendo del tipo de dímero de que se trate se va a presentar una actividad biológica diferente. El PDGF participa en la progresión del cáncer a través de la señalización inducida por sus receptores (PDGFR α y PDGFR β), estos modulan la proliferación y la diferenciación de diversas células tumorales. Los receptores son estimulados selectivamente por los diferentes dímeros³⁵.

Los receptores de PDGF se encuentran asociados a la activación de varias vías de señalización como Ras-MAPK, PI3K-AKT/PKB y PKC. Estas vías conllevan a la

modulación de procesos biológicos como la proliferación, diferenciación, supervivencia y migración celular³⁶⁻³⁸.

De los dos receptores PDGF, el PDGFR β se ha asociado más con el cáncer de mama, ya que se expresa hasta en un 70% de los casos, tanto en las células cancerosas, como en las células endoteliales asociadas al tumor³⁹. Además, su expresión se correlaciona con factores clínicos de mal pronóstico como: ganglios positivos, expresión de Her2 y un comportamiento más invasivo del tumor⁴⁰. Paulsson caracterizó la expresión de PDGFR β en el estroma de diversos tumores, incluyendo cáncer de mama. Observó una expresión de este receptor en el estroma adyacente al tumor, sugiriendo una estimulación paracrina del tejido estromal⁴¹. Además, la expresión de PDGFR β en el estroma de pacientes premenopáusicas con cáncer de mama se correlacionó con un mal pronóstico⁴². Estos datos confirman la importancia de la expresión de PDGFR β como factor pronóstico en cáncer de mama.

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 respuestas celulares. La regulación de este proceso es crucial para varios efectos biológicos que incluyen la proliferación, diferenciación, migración y muerte celular. Además, representa un punto de control para la integración de señales extracelulares y su conversión en respuestas celulares. Los niveles de fosforilación de proteínas en residuos de tirosina se encuentran estrechamente controlados por una acción coordinada de dos tipos de enzimas llamadas proteínas tirosinas cinasas (PTK, del inglés *protein tyrosine kinase*) y las proteínas fosfatasas de tirosina (PTP, del inglés *protein tyrosine phosphatase*)⁴³. Las PTK's de

encargan de añadir un grupo fosfato sobre residuos de tirosina de proteínas sustrato causando un cambio estructural y promoviendo las interacciones entre proteínas en las cascadas de señalización celular. La acción de las PTK's es regulada por la acción de las PTP's, las cuales se encargan de remover un grupo fosfato de un residuo de tirosina de una proteína sustrato. La alteración del balance normal entre la actividad de las PTK's y PTP's resulta en una fosforilación aberrante de residuos de tirosina, la cual ha sido ligada a la etiología de varias enfermedades, incluyendo el cáncer⁴⁴⁻⁴⁷.

Proteínas fosfatasas de tirosina

Las PTP's constituyen una gran familia estructuralmente diversa, altamente regulada y que puede tener efectos estimulatorios o inhibitorios⁴⁸. En el genoma humano se han identificado un total de 107 PTP's, las cuales están divididas en receptores y no receptores⁴⁹. El dominio catalítico de las PTP's contiene aproximadamente 280 aminoácidos y presentan un residuo de cisteína conservado que es requerido para la actividad catalítica. La defosforilación de los sustratos ocurre a través de un mecanismo de 2 pasos que consiste en la formación de un intermediario que se forma a través de un enlace covalente de fosfato-PTP que subsecuentemente se hidroliza⁴⁸.

La función principal de las PTP's es revertir la acción de fosforilación de las PTK's. Algunos de los miembros de la familia de las PTP's son productos de genes supresores tumorales; el ejemplo clásico es la PTEN, que fue la primera fosfatasa que demostró ser un gen supresor tumoral. Se han reportado mutaciones que inactivan la fosfatasa de PTEN en varios tipos de neoplasias, las cuales incluyen sistema nervioso central, mama y próstata⁵⁰. Además, las PTP's pueden potenciar acciones de las PTK's; este modo de sinergia aumenta las señales mitogénicas conduciendo a transformación y proliferación celular³³⁻³⁸.

PTP-1B

La PTP1B (PTPN1) y la TC-PTP (PTPN2) fueron las primeras PTP's del tipo no receptor identificadas⁵¹. La PTP1B fue purificada de la placenta humana, tiene un peso de 50kD, contiene un dominio catalítico de 37kD hacia su extremo N-terminal (residuos 1-300) seguido de una región reguladora de cerca de 80 a 100 residuos, y un dominio de localización en la membrana (residuos 400-435) que ancla la enzima a la cara citoplasmática del retículo endoplásmico (**Figura 4**)^{52,53}. Su actividad catalítica es estrechamente controlada por su localización en la superficie del retículo endoplásmico, que puede restringir su acceso a los substratos. Además, existen otros cuatro mecanismos que operan en tándem para regular la actividad de PTP1B, que son la oxidación, la fosforilación, sumoilación y proteólisis⁵⁴.

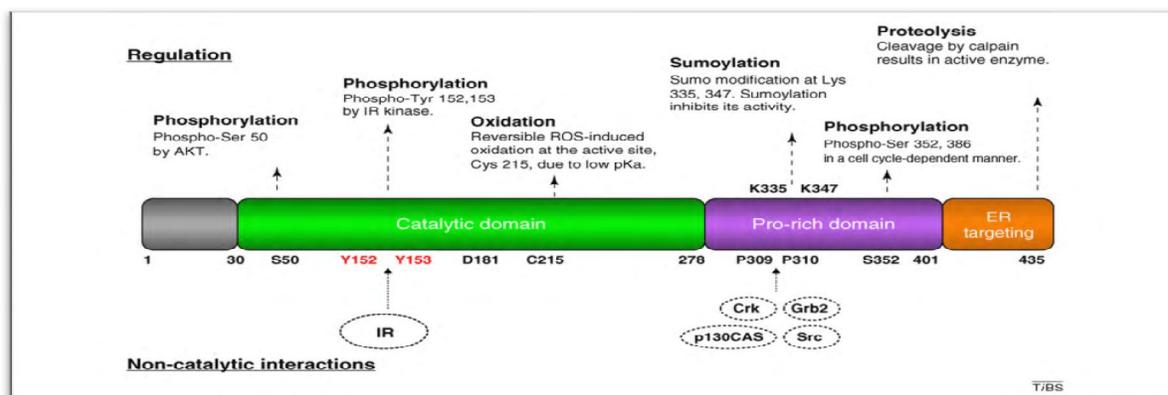


Figura 4. Estructura de la PTP1B. Constituida por 5 dominios; la región catalítica y reguladora se encuentra anclada al retículo endoplásmico, lo que confiere especificidad a esta fosfatasa.

Diversos estudios han demostrado que PTP1B juega un papel clave en la señalización de vías metabólicas y es un blanco terapéutico prometedor para la diabetes mellitus y la obesidad, ya que esta proteína participa en la regulación negativa en la señalización de los receptores de la insulina y la leptina. La delección del gen de *ptpn1* en ratones causa hipersensibilidad a la insulina y está asociada con un incremento marcado de la

fosforilación de tirosina del receptor de insulina y sus blancos⁵⁵⁻⁵⁷. La PTP1B también puede inhibir la señalización de otros RTK's tales como los receptores de PDGF y HGF⁵⁸⁻⁶¹, 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 Ras⁶²⁻⁶⁴. También es requerida para la activación de las GTPasas de Rac y Ras (enzimas asociadas con incremento de proliferación y motilidad celular). Además, también puede activar a Src mediante defosforilación de la tirosina 527 (Y527), localizado hacia el extremo carboxilo terminal de la cinasa⁶⁵⁻⁶⁷.

La PTP1B se encuentra localizada dentro de un mapa genético en el cromosoma 20 en la región q13.1-q13.2⁶⁸⁻⁶⁹. Se ha demostrado que la ganancia o amplificación de la región del cromosoma 20q13 está asociada a pobre pronóstico en cáncer de mama⁷⁰; no obstante, no existen datos que evalúen la sobreexpresión de PTP1B en neoplasias malignas como factor condicionante de pobre pronóstico. Las fosfatasa que se han documentado con un papel pronóstico en cáncer, es la fosfatasa PRL-3, que se ha asociado a una menor sobrevida libre de progresión en cáncer de mama ganglios positivos⁷¹. Esto es contrario a lo que inicialmente se pensó que tenían propiedades antioncogénicas a través de la regulación negativa de la actividad oncogénica de las PTK's. Sin embargo, datos recientes han demostrado que estas fosfatasa se encuentran involucradas en la regulación positiva de vías de señalización en cáncer. La PTP1B es un regulador positivo de la señalización Ras, lo cual fue demostrado en fibroblastos deficientes de PTP1B⁷². 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 fue asociada con la disminución de la fosforilación de Erk, sugiriendo que participa en esta vía de señalización en la tumorigénesis de tumores mamarios^{72,73}.

En el año 2007 Julien SG. y colaboradores, demostraron en modelos murinos que la delección de la actividad de PTP1B confería un retraso en el desarrollo de tumores mamarios, así como resistencia al desarrollo de metástasis pulmonares⁷³. Estos mismos datos fueron observados por Bentires 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 Her2⁷⁴. Recientemente, en base a estos datos y tratando de dilucidar el papel de PTP1B sobre la regulación de Her2 en cáncer de mama, en nuestro laboratorio se realizaron estudios que demostraron que la presencia de PTP1B en cantidades crecientes se correlaciona con un aumento progresivo en la expresión de Her2 total, de manera independiente de la transcripción de *her-2/neu*, sugiriendo que PTP1B modula de manera específica la expresión de este receptor, y esté mecanismo de sobreexpresión de Her2 es independiente de la amplificación del gen.

Planteamiento del problema

Recientemente se ha asociado a PTP1B en la progresión y metástasis de líneas celulares de cáncer de mama y modelos murinos. En estudios realizados en nuestro laboratorio se ha demostrado que PTP1B modula la expresión de Her2 en células tumorales de glándula mamaria, aunque el mecanismo que ejerce PTP1B sobre Her2 aún no está bien establecido. Este efecto de PTP1B probablemente puede conferir a las células tumorales una mayor agresividad. De ser así, PTP1B tendría una importante utilidad pronóstica y terapéutica para el desarrollo de blancos moleculares.

Justificación

Pese a los avances en estrategias diagnósticas y terapéuticas, el cáncer de mama continúa siendo la neoplasia maligna más frecuente en el sexo femenino, y el primer lugar de mortalidad por cáncer en este género. A pesar de que se han desarrollado diversos marcadores moleculares, solo algunos han mostrado aplicación clínica como predictores pronósticos y de tratamiento, el marcador más estudiado es el receptor Her2.

Recientemente se ha encontrado una asociación entre la expresión de las PTP's y cáncer; sin embargo, el papel de las PTP's ha sido poco estudiado. Reportes previos han demostrado una regulación positiva de la PTP1B sobre Her2. No obstante, hasta el momento actual desconocemos los efectos que esto implica sobre el desarrollo tumoral, por lo que es relevante determinar el papel de la expresión de PTP1B en procesos biológicos como la proliferación y migración en cultivos celulares de cáncer de mama y así dilucidar los efectos pronósticos que pudiera tener en esta patología.

Objetivo general

Evaluar el efecto de PTP1B en la modulación de la proliferación y migración celular en cultivos primarios de cáncer de mama.

Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de la sobreexpresión de PTP1B sobre la proliferación celular.
2. Evaluar el efecto de la sobreexpresión de PTP1B sobre la migración celular.
3. Evaluar el papel de PTP1B en la modulación de receptores de factores de crecimiento (Her2 y PDGFR β).
4. Evaluar el efecto de la sobreexpresión de PTP1B sobre la ligasa de ubiquitina Cblb.

Hipótesis

PTP1B contribuye a una mayor agresividad (proliferación y migración) celular en cáncer de mama a través de la regulación de receptores de factores de crecimiento.

Material y métodos

Cultivo de células de cáncer de glándula mamaria.

Los cultivos celulares MBCDB3, MBCD3, MBCDF y MBCD25 fueron generados previamente en el laboratorio a partir de explantes derivados de una biopsia obtenida a partir de una mastectomía radical (Protocolo aprobado por el comité de ética del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, referencia 159). Brevemente, el tejido fue cortado en trozos pequeños y sembrados como explantes en RPMI-1640 suplementado al 10% de suero fetal bovino (SFB). Las células se dejaron crecer hasta que llenaron el plato de cultivo. Estas células fueron tripsinizadas y mantenidas como cualquier otra línea celular. La inmortalización se asumió después de mantenerse en crecimiento continuo *in vitro* por más de dos meses.

Purificación de plásmidos.

Los plásmidos utilizados fueron pcDNA4A (vector vacío, sin PTP1B), pcDNA4 myc-PTP1B wt (vector con PTP1B). La purificación por Maxiprep con el kit QIAGEN se realizó de acuerdo al protocolo indicado por el fabricante. 500ml de cultivo de bacteria se centrifugaron a 6000 rpm. Se retiró sobrenadante y se resuspendieron las células en 10 ml de buffer P1. Se adicionó 10 ml de buffer P2 y se agitó por inversión. Posteriormente, se pusieron 10 ml de buffer P3 y se incubó por 5 min a 4°C. Se realizó centrifugación (10000-13000 RPM) por 10 minutos. Se remueve el supernadante. Se equilibró con buffer QBT. El supernadante se coloca en el QIAGEN-tip 20 y permitir la entrada de la resina por flujo de gravedad. Se lava con buffer QC. Posteriormente se eluye el DNA con buffer QF. Se

precipita el DNA con isopropanol se mezcla y se centrifuga inmediatamente a 10000 revoluciones por minuto por 30 minutos. Se decanta el supernadante. Se lavó el pellet de DNA con 1ml de etanol al 70% y se centrifugo a 10000 RPM por 10 minutos. Se decanta y se seca al aire libre por 5-10minutos y se re-disolvió el DNA en un volumen de agua libre de RNAsas. Se realizó la determinación o cuantificación de la cantidad de DNA por medio del nanodrop.

Transfecciones.

Se transfectaron las células MBCDF, MBCD25 mediante el protocolo de lipofectamina plus reagent. Primero se cultivaron placas de 6 pozos con las líneas celulares MBCDF y MBCD25. Una hora antes de la transfección se le cambia el medio a las células libre de antibiótico y suero fetal bovino. Se colocó 1µg de plásmido (pcDNA4A y pcDNA4-myc PTP1B WT) y 6 µl de reagent plus en un tubo eppendorf. Posteriormente, se diluyeron en medio libre de suero y antibióticos. Se dejó dicha mezcla durante 15 min incubando a temperatura ambiente. Después, se realizó una mezcla de 4µl de lipofectamina en 96µl de medio libre de antibióticos y se colocó en un tubo eppendorf. Posteriormente, se mezclaron gentilmente el contenido de ambos tubos y se incubo por 15 min a temperatura ambiente. Al finalizar se colocaron en cada plato de cultivo y se llevaron a una incubadora de CO₂ a 37°C por 24hrs. Terminado este tiempo se adicionó medio RPMI con 10% SFB.

Ensayo de Western Blot.

Las células fueron sembradas en cajas de petri en medio RPMI-1640 libre de rojo fenol con 10% de SFB. Se dejó que las células tuvieran una confluencia del 80-90% y posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS. Las células se lisaron en buffer de lisis que contiene 50mM HEPES (pH 7.4), 1 mM EDTA, 250mM NaCl, 1% de Nonidato P-40, 10mM NaF, 1mM vanadato de sodio y 1X mezcla de inhibidores de proteasa (Complete, EDTA free, Roche). Treinta microgramos de proteína fueron sometidos a una electroforesis en un gel de policramida desnaturalizante y se transfirió a una membrana inmobilon-P PVDF (Millipore Corp Bedford, MA). La membrana se bloqueo 1hr con leche 5% en PBS Tween. Posteriormente se incubó con los anticuerpos primarios anti-myc toda la noche a 4°C. Se incubó con el anticuerpo secundario de ratón por 45 min. La señal fue visualizada por quimioluminiscencia y se expuso a una película radiográfica (Kodak).

Proliferación celular

Se realizaron ensayos de proliferación celular, para lo cual se sembraron 5 000 células/cm² en placas de 24 en medio RPMI – 1640 suplementado con 10% de SFB. Tras la siembra celular, éstas se cultivaron durante 5 días en estufa a 37°C con una atmósfera de CO₂ al 5%. Las células se fijaron con glutaraldehído al 1.1% en PBS, durante 20 minutos los días 0, 1, 3 y 5. Al completarse los 5 días se procedió a la tinción de las placas con cristal violeta durante 20 minutos, posterior a lo cual se realizaron lavados con agua de las placas para retirar el exceso de colorante. Una vez completado, se dejaron solubilizar las células en 400 µl de ácido acético al 10% durante 20 minutos. Por último, la absorbancia de

la solución se midió mediante espectrofotómetro a 595 nm en un lector de microplaca (Biorad 680 Microplate Reader). Los resultados se expresaron como el incremento del número de células a partir del día cero.

Migración celular

La migración celular se evaluó utilizando cámaras de Boyden de 8 μ M (Corning). Brevemente, se depositaron 20,000 células en 300 μ l de RPMI con 10% de SFB en los pozos superiores de las cámaras de Boyden. En el compartimiento inferior se colocó medio RPMI con 10% de SFB. Las células se incubaron por 8 horas a 37 °C en atmósfera húmeda y CO₂ al 5%. Al final del período de incubación se removieron las células de la parte superior que no migraron, y las que migraron se fijaron con una solución de glutaraldehído al 1.1% en PBS por 10 minutos, se tiñeron con una solución de cristal violeta al 0.5% por 30 minutos. Se realizó 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 de la solución se midió a 595 nm en un lector de microplaca (Biorad 680 Microplate Reader). Los resultados se presentan como el índice de migración de las células con expresión de PTP1B con respecto al control de células que no lo expresan.

Resultados

Generación de cultivos de cáncer de mama que sobreexpresen PTP1B WT de manera estable

Curvas de Zeocina

De manera inicial, se procedió a realizar curvas de zeocina en los cultivos celulares que serían sometidos a la transfección de PTP1B. Esto en base a que el plásmido de transfección contiene un gen de resistencia a la zeocina, lo que permite una adecuada selección de las células para la obtención de transfecciones estables. Para ello se realizaron curvas de las líneas celulares MBCD25 y MBCDF a dosis crecientes de zeocina para determinar la IC_{50} , esta fue de $250\mu\text{g}$ y $200\mu\text{g}$ respectivamente (**Figura 5**).

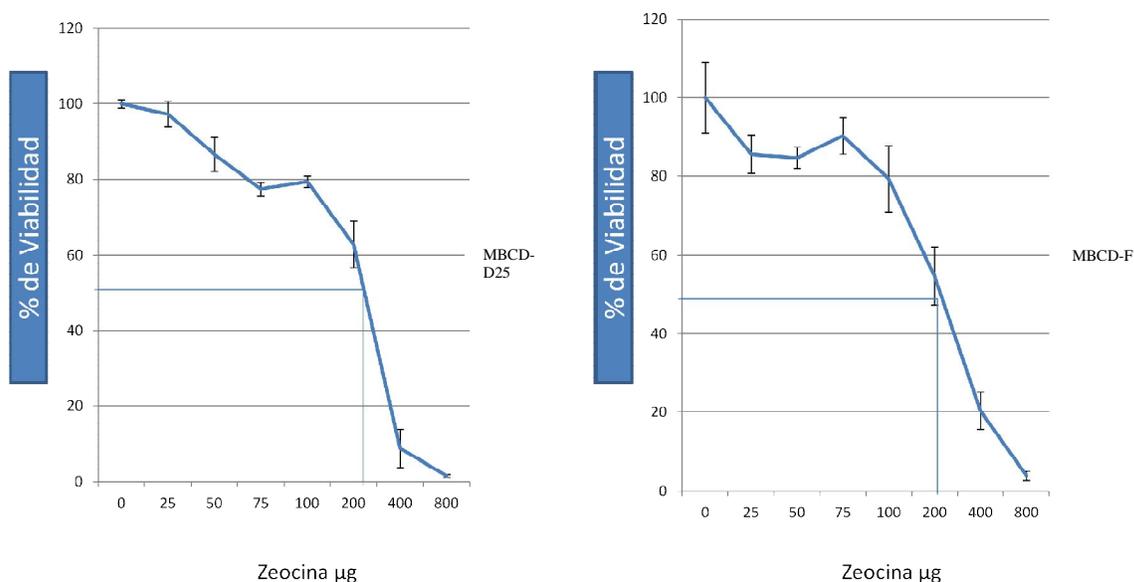


Figura 5. Curvas de zeocina. La IC_{50} para la línea MBCD25 fue de $250\mu\text{g/ml}$ y para la línea MBCDF de $200\mu\text{g/ml}$.

Sobreexpresión de PTP1B en líneas celulares y cultivos primarios de cáncer de mama.

PTP1B es una fosfatasa que está involucrada en la regulación de diversos receptores. En estudios previos en nuestro laboratorio se demostró que la sobreexpresión de PTP1B induce un incremento en los niveles de Her2. Para evaluar la participación de PTP1B en procesos biológicos como la proliferación y migración celular, se realizó la transfección de plásmido pc-DNA4 vacío (EV) y el que contiene el cDNA de myc-PTP1B en su forma silvestre (WT) en cultivos primarios de cáncer de mama (MBCDF y MBCD25). La sobreexpresión de PTP1B fue evaluada mediante Western Blot usando un anticuerpo anti-myc, lo que demuestra que PTP1B está sobreexpresado en estas células (**Figura 6**). Los resultados muestran que los carriles transfectados con el vector vacío (carriles 1 y 3) no hay expresión de myc-PTP1B, mientras que en los carriles donde se expresó PTP1B (carriles 2 y 4) se encontró la expresión de myc-PTP1B.

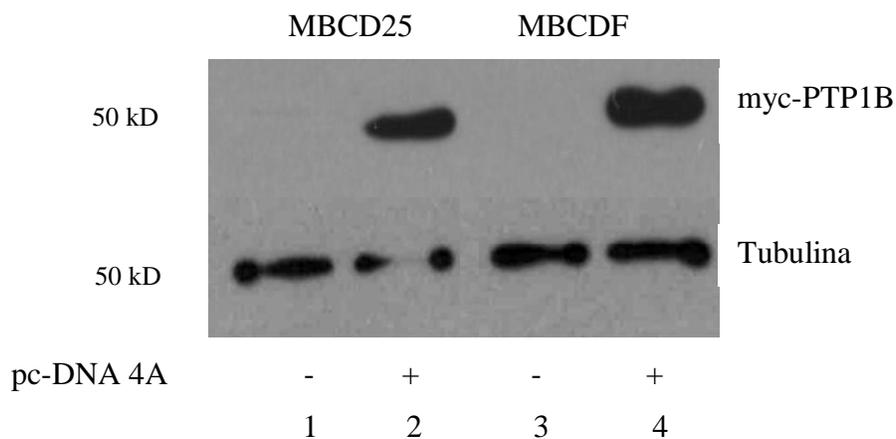


Figura 6. Western Blot de la transfección transitoria y expresión de PTP1B WT en cultivos primarios de cáncer de mama (MBCD25 y MBCDF). Los carriles 2 y 4 demuestran la actividad de myc-PTP1B, posterior a la transfección del plásmido pc-DNA4A. Los carriles 1 y 3 corresponden a los controles transfectados con el vector vacío.

La selección de células estables que expresan PTP1B WT se inició 72 horas posteriores a la transfección con 200µg/ml de zeocina, cantidad previamente establecida mediante curvas de viabilidad (Descritas en el apartado anterior).

Efecto de la sobreexpresión de PTP1B sobre la modulación de la expresión de factores de crecimiento (Her2 y PDGFRβ)

PTP1B está involucrada en la regulación de diversos receptores como el de la insulina y leptina⁵⁵⁻⁵⁷. Además, recientemente se demostró en nuestro laboratorio que PTP1B participa en la modulación positiva de los niveles de Her2 en cultivos primarios de cáncer de mama. Para confirmar estos resultados se evaluó la expresión de Her2 mediante Western Blot, en cultivos primarios transfectados con el plásmido pc-DNA4 vacío (EV) y el que contiene el cDNA de myc-PTP1B en su forma silvestre (WT). Se corroboró que la sobreexpresión de PTP1B se asocia a un incremento en la expresión de Her2, este hallazgo fue más evidente en el cultivo celular MBCDF (**Figura 7**). Estos resultados son similares a los previamente descritos en el laboratorio.

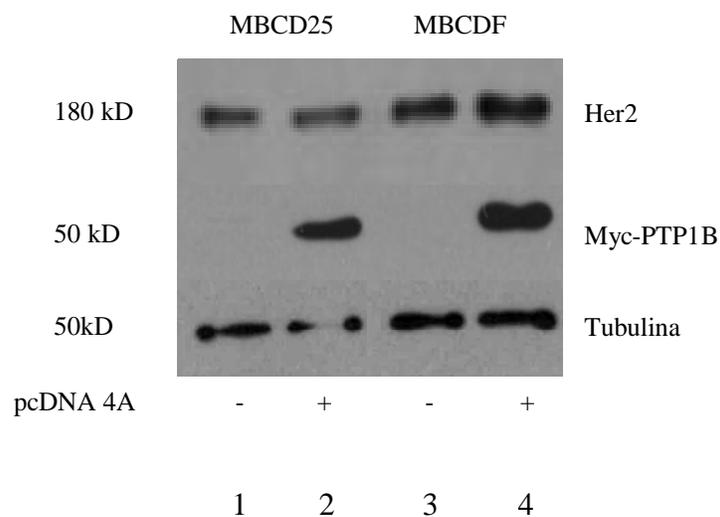


Figura 7. Western Blot de cultivos primarios de cáncer de mama (MBCD25 y MBCDF) transfectados con el plásmido pcDNA4A y pcDNA4-myc PTP1B WT. Incremento de la expresión de Her2 asociado a la transfección de PTP1B WT (carriles 2 y 4), hallazgo más evidente en el carril 4, que corresponde a la línea MBCDF con sobreexpresión de PTP1B WT.

Una vez corroborada la regulación positiva de Her2 por PTP1B, evaluamos si el efecto de esta fosfatasa era exclusivo sobre Her2 o también afecta a otros receptores de factores de crecimiento, como PDGFR β . Se evaluaron los niveles de expresión de PDGFR β en las células transfectadas con PTP1B WT de manera transitoria y también en las células que expresan myc-PTP1B WT de manera estable. Se encontró que la sobreexpresión de PTP1B WT induce un incremento en los niveles de expresión de PDGFR β en las líneas celulares MBCD25 y MBCDF (**Figura 8A**). Posteriormente se analizó si este efecto se mantenía en las células que expresan PTP1B WT de manera estable. Se encontró que la sobreexpresión de PDGFR β mediada por PTP1B se mantenía aún en las células transfectadas de manera estable (**Figura 8B**). Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de PTP1B WT se asocia con una modulación positiva de receptores de factores de crecimiento Her2 y PDGFR β .

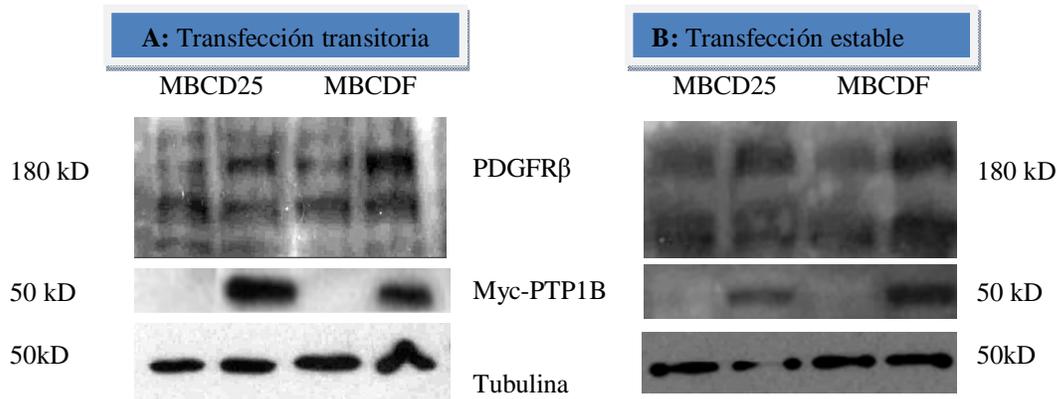


Figura 8. Western Blot de cultivos primarios de cáncer de mama (MBCD25 y MBCDF) transfectados (**A:** Transitorios, **B:** Estables). Se observa un incremento en la expresión de PDGFR β asociado a la presencia de PTP1B WT. Esta regulación positiva de PDGFR β se mantiene en las células con transfección transitoria y estables.

Efecto de la expresión de PTP1B sobre la proliferación celular

Los resultados hasta ahora obtenidos demuestran que la sobreexpresión de PTP1B induce una mayor expresión de Her2 y PDGFR β , para evaluar si esta regulación positiva de estos receptores tiene repercusión sobre efectos biológicos como la proliferación y migración, se realizaron ensayos de proliferación y migración. Primero se realizaron ensayos de proliferación en las células MBCD25 EV, MBCD25 WT, MBCDF EV y MBCDF WT transfectadas de manera estable. Observamos un incremento significativo en la proliferación en las líneas celulares que expresan PTP1B WT, el cual fue evidente al día 3 y 5 de incubación. Es importante hacer notar que los efectos proliferativos más sobresalientes se observaron en la línea celular MBCD25 que sobreexpresa PTP1B (WT), con una diferencia del 80% de incremento comparada con la línea transfectada con el vector vacío (EV). (**Figura 9**). Estos resultados indican que la sobreexpresión de PTP1B induce una mayor proliferación de las células tumorales de cáncer de mama, lo cual demuestra que esta fosfatasa ejerce acciones estimulatorias a nivel de la proliferación celular a través del incremento en los niveles de receptores de factores de crecimiento como Her2 y PDGFR β .

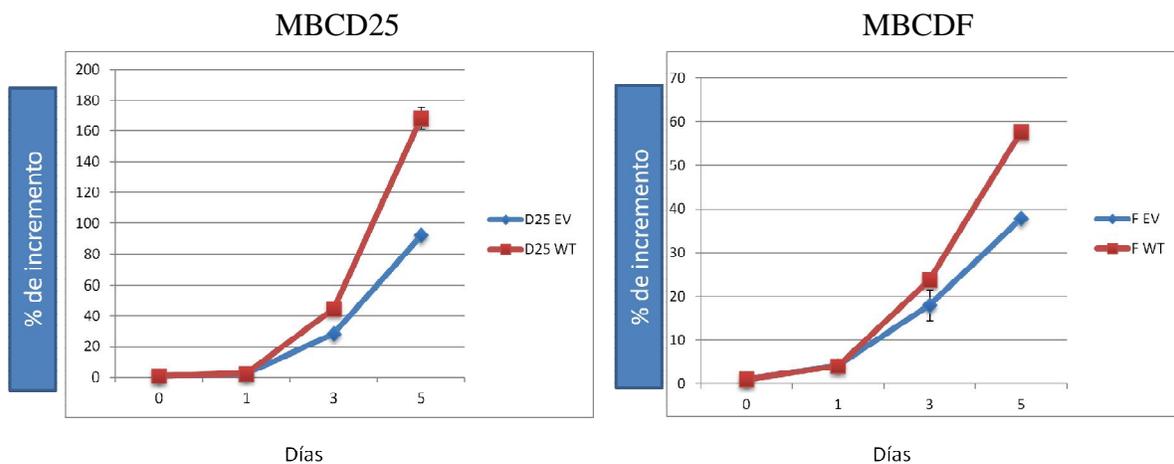


Figura 9. Curvas de proliferación celular. Izquierda: MBCD25 WT con un porcentaje de incremento al día 5 del 170%, comparado con el 90% de la línea con el vector vacío (EV). Derecha: MBCDF WT con una diferencia en el porcentaje de incremento más discreta en comparación con el vector vacío, 58 vs. 38% respectivamente.

Efecto de la expresión de PTP1B sobre la migración celular

Posteriormente, con la finalidad de profundizar en el papel de la expresión de PTP1B en procesos biológicos como la migración celular de células tumorales de cáncer de mama, se realizaron ensayos de motilidad utilizando cámaras de Boyden. Estos se realizaron en cultivos primarios de cáncer de mama que no expresan PTP1B (MBCD25 Y MBCDF), y en el cultivo MBCD3 que expresa PTP1B. Los resultados demuestran que las células MBCD3 migran dos veces más que las células MBCDF y MBCD25 (**Figura 10 A,B**). Estos resultados sugieren que la expresión de endógena de PTP1B confiere una mayor capacidad de migración a las células tumorales.

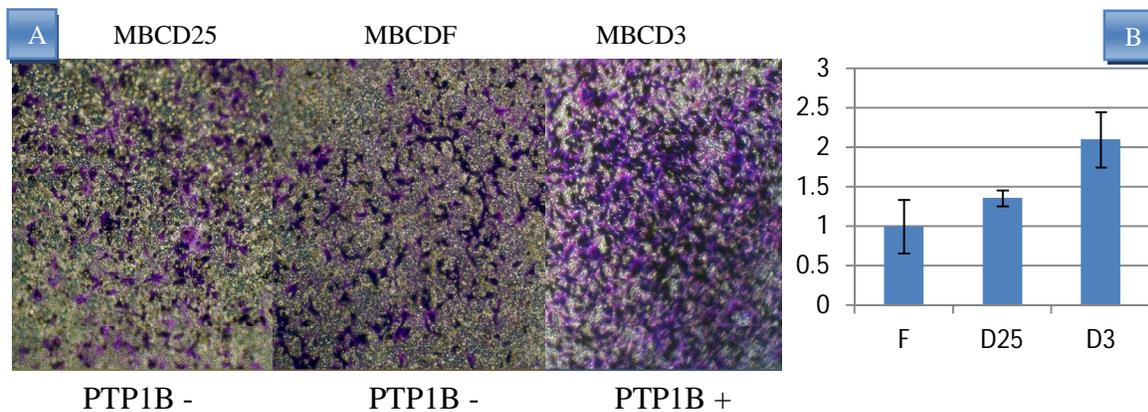


Figura 10. Ensayos de motilidad en placas de Boyden. Cultivos primarios. A: Izquierda y central: Migración de los cultivos primarios que no expresan PTP1B de forma endógena (MBCD25 y MBCDF). Derecha: Migración del cultivo primario MBCD3, el cual expresa PTP1B. B: Cuantificación por espectrofotometría de los cultivos primarios.

Para confirmar si el efecto sobre la migración es específico de PTP1B, evaluamos si la inhibición farmacológica de PTP1B bloqueaba la capacidad migratoria de los cultivos primarios de cáncer de mama. Para ello se realizaron estudios de migración en cámaras de Boyden, con células que expresan de manera endógena PTP1B y células con sobreexpresión de PTP1B WT tratadas con el inhibidor de PTP1B. Se compararon células control sin inhibidor, y células con presencia de inhibidor de PTP1B. La dosis utilizada

para la realización de estos estudios fue de $20\mu\text{M}$ del inhibidor PTP1B, la cual se obtuvo a partir de curvas de viabilidad en nuestro laboratorio, determinándose en esta dosis como la IC_{50} . El tratamiento con el inhibidor de PTP1B en las células MBCD3 que expresan de manera endógena PTP1B, mostró una disminución del 60% de la migración celular (**Figura 11 A,B**).

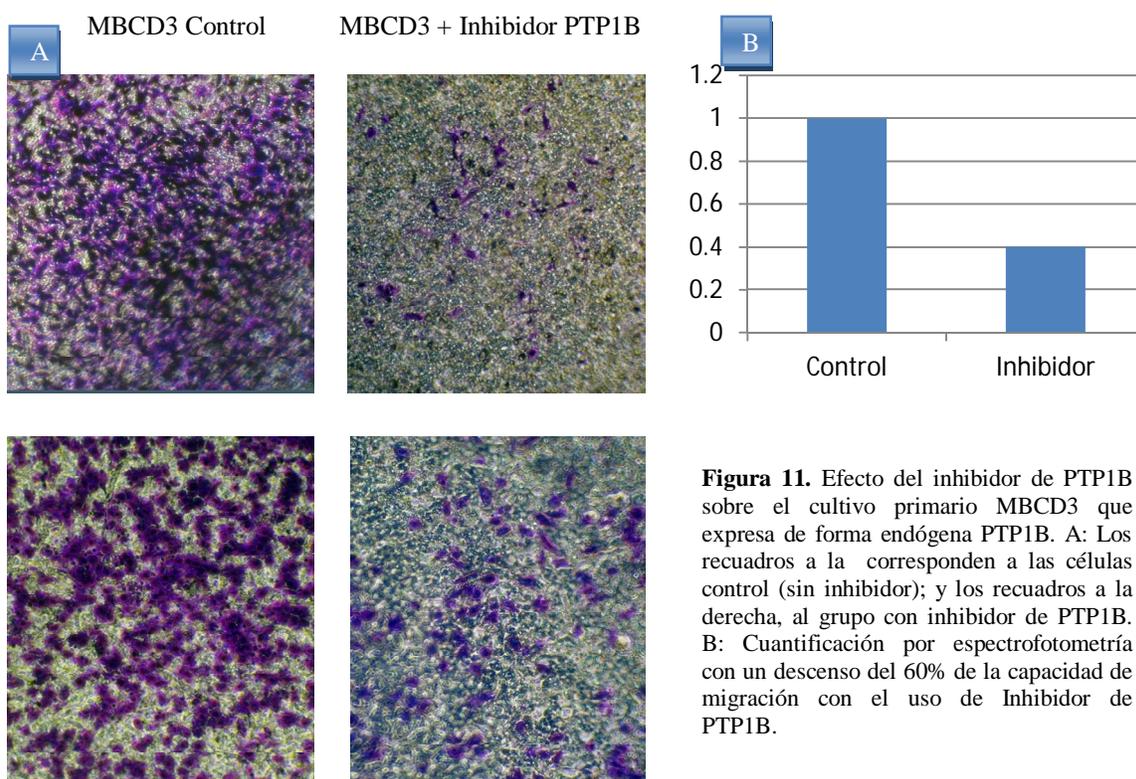


Figura 11. Efecto del inhibidor de PTP1B sobre el cultivo primario MBCD3 que expresa de forma endógena PTP1B. A: Los recuadros a la izquierda corresponden a las células control (sin inhibidor); y los recuadros a la derecha, al grupo con inhibidor de PTP1B. B: Cuantificación por espectrofotometría con un descenso del 60% de la capacidad de migración con el uso de Inhibidor de PTP1B.

Posteriormente, evaluamos si las células de cáncer de mama en las que se transfirió el PTP1B WT, incrementaban la capacidad migratoria. Para lo cual se realizaron ensayos de migración en cámaras de Boyden con las células MBCD25 EV y MBCD25 WT, se observó que la migración celular fue mayor en el cultivo celular transfectado con PTP1B WT, comparado con el cultivo transfectado con el plásmido vacío (EV). Estos datos demuestran que la expresión de PTP1B incrementa la migración celular (**Figura 12**).

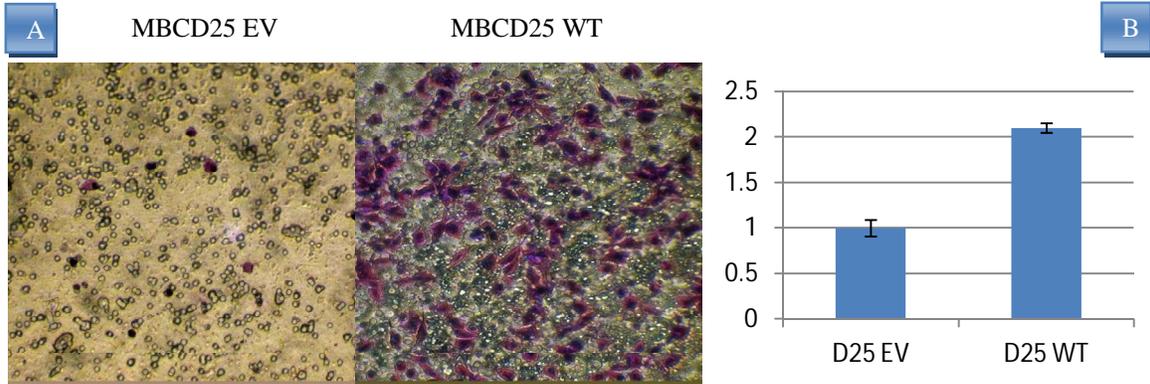


Figura 12. Ensayos de motilidad en placas de Boyden. Células MBCD25 transfectadas. A: a la izquierda células control transfectadas con el vector vacío (EV), y a la derecha células transfectadas con PTP1B WT. B: Cuantificación por espectrofotometría.

Para determinar la especificidad del inhibidor de PTP1B, también se realizaron estudios de migración en las líneas celulares transfectadas con el vector vacío, sin PTP1B. Las células MBCD25 transfectadas que expresan myc-PTP1B, fueron también tratadas con el inhibidor de PTP1B, de la misma manera que las células MBCD3. Se encontró que el efecto del inhibidor se mantiene en las células transfectadas con PTP1B WT, y es casi nulo en ausencia de expresión de PTP1B (**Figura 13**).

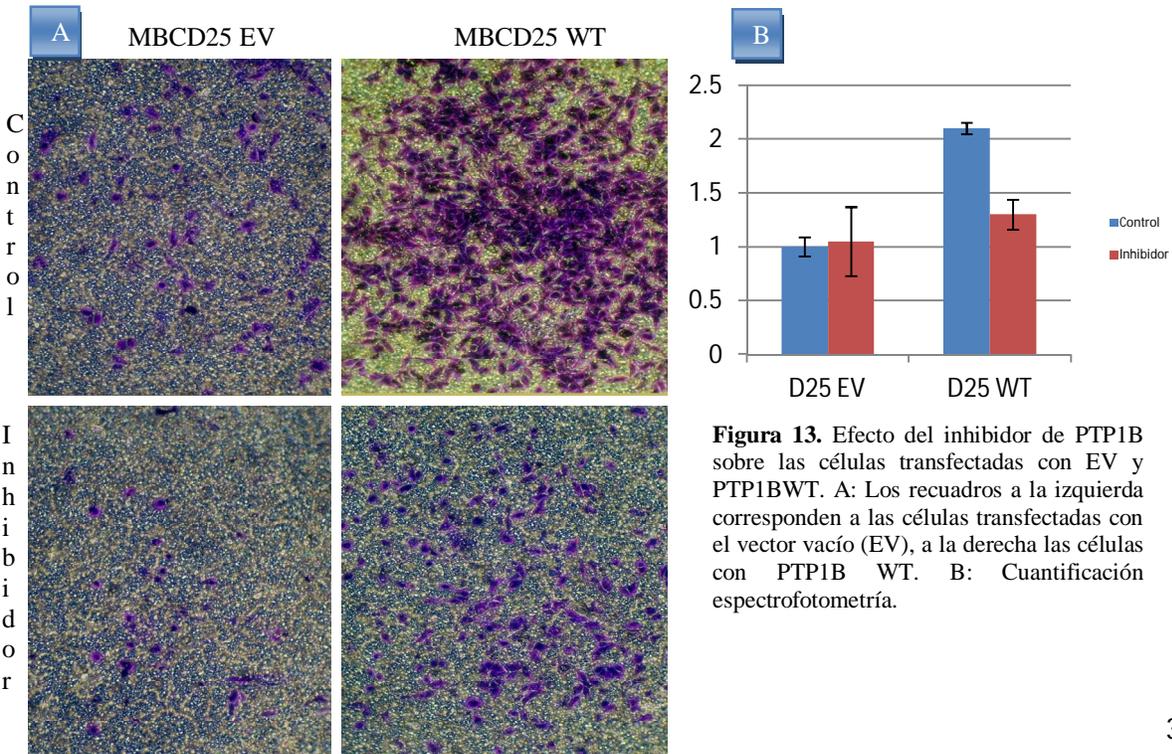


Figura 13. Efecto del inhibidor de PTP1B sobre las células transfectadas con EV y PTP1BWT. A: Los recuadros a la izquierda corresponden a las células transfectadas con el vector vacío (EV), a la derecha las células con PTP1B WT. B: Cuantificación espectrofotométrica.

Regulación negativa de la ligasa de ubiquitina, Cblb

La señalización de los receptores de factores de crecimiento se encuentra regulada negativamente por medio de la internalización y degradación lisosomal que es mediada por ligasas de ubiquitina de la familia Cbl⁷⁵⁻⁸⁰. En base a los resultados obtenidos, tratamos de esclarecer el mecanismo por el que PTP1B condiciona en células tumorales una regulación positiva de los receptores de factores de crecimiento, en este caso Her2 y PDGFR β . Para ello, se realizó un análisis de la expresión de la ligasa de ubiquitina Cblb en las células transfectadas de manera transitoria, mediante Western Blot (**Figura 14**). Los resultados obtenidos demuestran que la sobreexpresión de PTP1B WT se asocia a una disminución en la expresión de Cblb (carriles 2 y 4), lo que nos sugiere que la sobreexpresión de Her2 y PDGFR β puede estar mediada por la inhibición de Cblb que induce una disminución en la endocitosis de estos receptores y un aumento en su expresión.

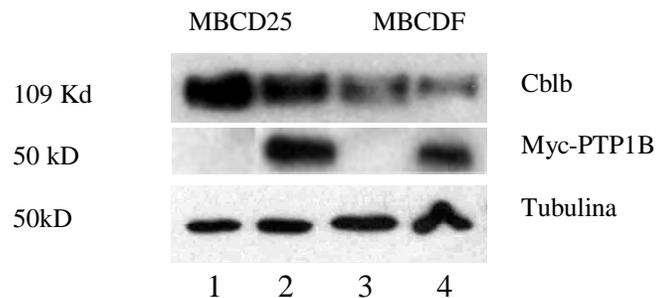


Figura 14. Western Blot de cultivos primarios de cáncer de mama (MBCD25 y MBCDF) transfectados. Se observa una disminución en la expresión de Cblb asociado a la transfección de PTP1B WT (carriles 2 y 4).

Discusión y Conclusiones

La expresión de PTP1B ha sido asociada en la oncogénesis en diversas neoplasias (p.ej. cáncer esofágico, mama, ovario y colon); sin embargo, el mecanismo biológico por el cual PTP1B facilita la progresión del cáncer de mama no se ha esclarecido por completo. Estudios previos en modelos murinos han demostrado que la ausencia de expresión de PTP1B en los tumores mamarios (NDL2/PTP1B^{-/-}) confiere un retraso en el desarrollo tumoral y una frecuencia menor de metástasis pulmonares⁷³⁻⁷⁴. En humanos, no existen estudios que evalúen el papel de PTP1B como factor pronóstico, los datos existentes se dirigen a la amplificación de la región del cromosoma 20q13, donde está situado el gen de *ptpn1*, y se ha encontrado que la amplificación de esta región se asocia a un pobre pronóstico en cáncer de mama⁷⁰. Otros estudios han demostrado que PTP1B activa a c-Src y la vía de ras, defosforilando la tirosina inhibidora (Y527), lo que sugiere un papel oncogénico⁶⁵⁻⁶⁷.

Recientemente, en nuestro laboratorio demostramos que PTP1B regula positivamente la expresión de Her2 en cultivos celulares de cáncer de mama, con un efecto dosis-respuesta; estos datos fueron confirmados en nuestro estudio, evidenciando además que la sobreexpresión de PTP1B también provoca un incremento en los niveles de expresión de PDGFR β , lo que sugiere que PTP1B desempeña un papel en la regulación positiva de los receptores de factores de crecimiento, tanto Her2 y PDGFR β . Como es bien conocido, los receptores de factores de crecimiento controlan una gran variedad de procesos celulares, incluyendo la proliferación celular, diferenciación celular, la migración celular y la supervivencia celular. En este estudio demostramos que PTP1B juega un papel en la regulación positiva de los receptores de Her2 y PDGFR β , favoreciendo en las líneas

celulares una mayor capacidad proliferativa y de migración. En las últimas dos décadas, varios mecanismos que desregulan estos receptores incluyen: la amplificación del receptor, la translocación cromosómica y mutaciones puntuales. Estos cambios dan lugar a la activación ligando-independiente o una mayor actividad catalítica de los receptores de factores de crecimiento^{81,82}. Sin embargo, además de estos mecanismos positivos, hay una creciente evidencia de que el escape a los mecanismos reguladores negativos es un evento importante en la desregulación de los receptores de factores de crecimiento. Hasta el momento se desconocen los factores por los que PTP1B favorece la sobreexpresión de estos receptores (Her2 y PDGFR β); consideramos que PTP1B podría participar de alguna manera defosforilando algún regulador de la degradación endocítica de estos receptores, lo que favorecería una vía de reciclaje y por tanto, un aumento de la expresión de estos. En apoyo a esto, para el receptor Her1 se ha descrito una tirosina al final del dominio intracelular que cuando esta fosforilada sirve de reconocimiento para c-Cbl, la cual induce su internalización y degradación^{83,84}. Un mecanismo similar pudiera existir para Her2 y PDGFR β ; por lo tanto, si PTP1B mantiene defosforilada la tirosina que sirve de reconocimiento para Cblb, se mantendrán acumulados estos receptores en la membrana. Esto explicaría como la sobreexpresión de PTP1B induce mayores niveles de Her2 y PDGFR β . Por esta razón, evaluamos si la sobreexpresión de estos receptores podría estar asociada a un mecanismo similar que Her1, por lo que medimos la expresión de Cblb en las líneas celulares transfectadas, y encontramos que la sobreexpresión de PTP1B induce una disminución en los niveles de Cblb, lo que sugiere que la sobreexpresión de Her2 y PDGFR β puede estar asociada a una disminución en la degradación endocítica mediada por Cblb, favoreciendo una mayor expresión de los receptores.

Tratando de definir cuál es el papel biológico de la regulación de los receptores de factores de crecimiento (Her2 y PDGFR β) por PTP1B en cáncer de mama, evaluamos el impacto de la sobreexpresión de PTP1B en cultivos primarios de glándula mamaria, valorando el efecto de PTP1B sobre la proliferación y la migración celular. Los resultados muestran que la sobreexpresión de PTP1B confiere una mayor capacidad proliferativa a las células tumorales, con una diferencia de hasta el 80% en la tasa de incremento. De la misma forma los estudios de migración celular demuestran que la expresión de PTP1B en cultivos celulares de cáncer de mama, tanto de forma endógena como exógena (mediante transfección), confiere a las células una mayor capacidad migratoria en comparación con las líneas celulares carentes de esta fosfatasa. Demostramos que el incremento en la migración se ve disminuido al utilizar un inhibidor de PTP1B, lo que sugiere que es un efecto específico de la sobreexpresión de PTP1B sobre la migración.

El incremento en la proliferación de las células de cáncer de mama inducido por la sobreexpresión de PTP1B, puede deberse a la regulación positiva de los receptores Her2 y PDGFR β promovida por esta fosfatasa, favoreciendo así una señalización prolongada río abajo de estos receptores. Algunos estudios sugieren que el fenotipo proliferativo de Her2 está mediado por c-jun y la ruptura de la adherencia celular mediada por STAT3^{85,86}. No obstante, la sobreexpresión de Her2 y PDGFR β no explica por completo el aumento en la capacidad migratoria de estas células. Este fenotipo invasivo de la sobreexpresión de Her2 y PDGFR β en las células tumorales puede explicarse por diversos mecanismos como la activación de la PI3K⁸⁷, PKC- α , c-Src, así como la quinasa de adhesión focal (FAK)^{87,88}, la regulación a la baja de la integrina $\alpha 4$ ⁸⁹ e inducción de la integrina $\beta 4$ ⁹⁰, y el factor de crecimiento transformante- β ⁹¹. Recientemente, se ha involucrado a las proteínas

adaptadoras de CRK (de sus siglas en inglés *CT10 regulator of kinase*) en la integración de las señales para la migración y la invasión de líneas celulares de cáncer de mama⁹². Numerosos estudios *in vitro* han definido el papel de las proteínas adaptadoras CRK en la motilidad celular⁹²⁻⁹⁴, pero se sabe poco sobre cómo las proteínas CRK contribuir a la progresión del cáncer de mama *in vivo*. De acuerdo a lo anterior, uno de los mecanismos por los cuales PTP1B pudiera contribuir a un aumento en la capacidad de migración de las células sea a través de la defosforilación del dominio de unión p130Cas (Crk-associated substrate), lo que generaría la activación de CRK y el consiguiente inicio de la señalización río debajo de la vía de la integrina^{95,96}. Estos datos nos indican que PTP1B confiere al menos, en modelos *in vitro*, un factor de mal pronóstico en cáncer, ya que su expresión se asocia a una mayor tasa de proliferación probablemente mediada por la sobreexpresión de Her2 y PDGFR β , y una capacidad de migración mayor que puede estar mediada por la activación de proteínas adaptadoras CRK. Esto último, además, nos sugiere que la expresión de PTP1B puede favorecer el desarrollo de metástasis al conferir a las células tumorales una mayor capacidad de migración. Estos datos coinciden con los resultados encontrados en modelos murinos, donde la ausencia de PTP1B se asocia a un periodo libre de desarrollo tumoral mayor y una menor incidencia de metástasis pulmonares. Estos hallazgos sugieren que PTP1B puede ser un marcador pronóstico para el cáncer de mama, lo que justifica la realización de un estudio de la expresión de PTP1B en muestras humanas de cáncer de mama. Por otra parte, los resultados de este trabajo abren la posibilidad al desarrollo de blancos moleculares, ya que se puede considerar el uso de inhibidores de PTP1B como terapia dirigida a bloquear la migración celular y por ende disminuir el potencial metastásico de las células tumorales.

Bibliografía

1. Organización Mundial de la Salud: página de internet <http://Globocan.iarc.fr>
2. Siegel, R. Cancer Statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2012;62:10–2.
3. Carter CL, Allen C, Henson DA : Relation of tumor size, lymph node status and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer* 1989; 63: 181-187.
4. Gasparini G, Pozza F, Harris AL : Evaluating the potential usefulness of new prognostic and predictive indicators in node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 1206-1219.
5. Klijn JG, Berns EM, Foekens JA : Prognostic factors and response to therapy in breast cancer. *Cancer Surv* 1993; 18: 165-198.
6. Foekens, JA. Cell biological prognostic factors in breast cancer: a review. *J Clin Immunoassay* 1991; 14: 1684-1695.
7. Lowe S, Bodis S, McClatchey A et al. p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. *Science* 1994; 266: 807-810.
8. Elledge R, Gray R, Mansour E, Yu Y 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): 1254-1256.
9. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin W, Ullrich A, Mc Guire WC: Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER2/neu oncogene. *Science* 1987; 235: 177-182.
10. Slamon DJ, Godolphin W, Jones L, Holt J, Wong S, Keith D et al.: Studies of the HER-2/neu protooncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989; 244: 707-712.
11. Slamon DJ, Press MF, Godolphin W, Ramos L, Haran P, Shek L et al.: Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast cancer. *Cancer Cells* 1989; 7: 371-384.
12. Heintz NH, Leslie KO, Rogers LA, Howard PL. Amplification of the c-erbB-2 oncogene and prognosis of breast adenocarcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 1990; 114: 160-163.
13. Borg A, Tandon AK, Sigurdsson I, Clark GM, Ferno M, Fuqua SAW et al.: HER-2/neu amplification predicts poor survival in node-positive breast cancer. *Cancer Res* 1990; 50: 4332-4337.
14. Van der Vijver MJ, Peterse JL, Mooi VJ, Wisman P, Lomans J, Dalesio O 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: 1239-1245.
15. Gullick WJ, Love SB, Wright C, Barnes DM, Gusterson B, Harris AL 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: 434-438.
 16. Lee AKC, Wiley B, Loda M, Basari S, Dugan JM, Hamilton W et al.: DNA ploidy, proliferation and Neu-oncogene protein overexpression in breast carcinoma. *Mod Pathol* 1992; 5: 61-67.
 17. Kallioniemi OP, Holli K, Visakorpi T, Koivula T, Helin HH, Isola JJ: Association of c-erbB-2 protein overexpression with high rate of cell proliferation, increased risk of visceral metastasis and poor longterm survival in breast cancer. *Int J Cancer* 1991; 49: 650-655.
 18. Bacus SS, Bacus JW, Slamon DJ, Press MF: HER-2/neu oncogene expression and DNA ploidy analysis in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med* 1990; 114: 164-169.
 19. Perren TJ: C-erbB-2 oncogene as a prognostic marker in breast cancer. *Br J Cancer* 1991; 63: 328-332.
 20. Callahan R, Campbell G: Mutations in human breast cancer: an overview. *J Natl Cancer Inst* 1989; 81: 1780-1786.
 21. Muller WJ, Sinn E, Pattengale PK: Single-step induction of mammary adenocarcinoma in transgenic mice bearing the activated c-neu oncogene. *Cell* 1988; 54: 105-111.
 22. Bouchard L, Lamarre L, Tremblay PJ, Jolicoeur P: Stochastic appearance of mammary tumors in transgenic mice carrying the MMTV/c-neu oncogene. *Cell* 1989; 57: 931-936.
 23. Romond EH, Perez EA, Bryant J, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER-2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353(16):1673.
 24. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER-2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353(16):1659.
 25. Joensuu H, Kellokumpu-Lehtinen PL, Bono P, et al. Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab for breast cancer. *N Engl J Med* 2006;354(8):809.
 26. Slamon D, Eirmann 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* 2006;100(Suppl 1) (abst 52).
 27. Smith I, Procter M, Gelber RD, et al. 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomised controlled trial. *Lancet* 2007;369(9555):29.

28. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001;344:783–792.
29. Schechter AL, Stern DF, Vaidyanathan L et al. The neu oncogene: An erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature* 1984;312: 513–516.
30. Ross JS, Fletcher JA, Bloom KJ et al. Targeted therapy in breast cancer: The HER-2/neu gene and protein. *Mol Cell Proteomics* 2004;3:379 –398.
31. Yarden Y, Sliwkowski MX: Untangling the ErbB signaling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:127-137, 2001.
32. Park JW, Neve RM, Szollosi J, et al: Unraveling the biologic and clinical complexities of HER2. *Clin Breast Cancer* 8:392-401, 2008. Alitalo, K., and Schwab, M. (1986) Oncogene amplification in tumor cells. *Adv. Cancer Res.*, 47: 235-281.
33. Cao R, Bråkenhielm E, Li X, Pietras K. Angiogenesis stimulated by PDGF-CC, a novel member in the PDGF family, involves activation of PDGFR- $\alpha\alpha$ and - $\alpha\beta$ receptors. *The FASEB Journal*; vol. 16 no. 12 1575-1583.
34. Dhillon A.S, Meikle S, Yazici Z, Eulitz M, Kolch W. Regulation of Raf-1 activation and signalling by dephosphorylation. *EMBO J.* 2002 January 15; 21(1-2): 64–71.
35. Karlsson L, Bondjers C, Betsholtz C. Roles for PDGF-A and sonic hedgehog in development of mesenchymal components of the hair follicle. *Development* 126, 2611-2621.
36. Karlsson L, Lindahl P, Heath JK, Betsholtz C. Abnormal gastrointestinal development in PDGF-A and PDGFR-(alpha) deficient mice implicates a novel mesenchymal structure with putative instructive properties in villus morphogenesis. *Development.* 2000 Aug;127(16):3457-66.
37. Heldin C.H, Ernlund A, Rorsman C, Rönstrand L. Dimerization of B-type platelet-derived growth factor receptors occurs after ligand binding and is closely associated with receptor kinase activation. *The Journal of Biological Chemistry.* 1989; 264, 8905-8912.
38. Heldin CH, Eriksson U, Ostman A. New members of the platelet-derived growth factor family of mitogens. *Arch Biochem Biophys.* 2002 Feb 15;398(2):284-90.
39. Coltrera M.D, Wang J, Porter P.L, Gown A.M. Expression of Platelet-derived Growth Factor B-Chain and the Platelet-derived Growth Factor Receptor β Subunit in Human Breast Tissue and Breast Carcinoma. *Cancer Res* June 15, 1995 55; 2703.

40. Seymour L, Dajee D, Bezwoda W.R. Tissue platelet derived-growth factor (PDGF) predicts for shortened survival and treatment failure in advanced breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*; Volume 26, Number 3 (1993), 247-252.
41. Paulsson J, Sjöblom T, Micke P, Pontén F. Prognostic Significance of Stromal Platelet-Derived Growth Factor β -Receptor Expression in Human Breast Cancer. *Am J Pathol*. 2009 July; 175(1): 334–341.
42. Bhardwaj B, Klassen J, Cossette N, Sterns E, Tuck A, Deeley R, Sengupta S, Elliott B. Localization of platelet-derived growth factor beta receptor expression in the periepithelial stroma of human breast carcinoma. *Clin Cancer Res* April 1996 2; 773-782.
43. Zhong-Xing Jiang and Zhong-Yin Zhang. Targeting PTPs with small inhibitors in cancer treatment. *Cancer Metastases Rev*. 2008 June; 27(2): 263-272.
44. Hunter T. The Phosphorylation of proteins on tyrosine: its role in cell growth and disease. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci* 1998; 353:583-605.
45. Zhang Z-Y. Protein tyrosine Phosphatases: prospects for therapeutics. *Curr. Opin. Chem. Biol* 2001; 5:416-423.
46. Arena S, Benvenuti S, Bardelli A. Genetic analysis of the kinome and phosphatome in cancer. *Cell. Mol. Life Sci* 2005; 62: 2092-2099.
47. Ventura JJ, Nebreda AR. Protein kinases and phosphatases as therapeutic targets in cancer. *Clin. Transl. Oncol* 2006;8:153-160.
48. Arne Ostman, Carrina Hellberg and Frank D. Bohmer. Proteine-tyrosine phosphatases and cancer. *Nature Rev*. 2006; 6: 307-320.
49. Andersen, J. N. et al. Structural and evolutionary relationships among protein tyrosine phosphatase domains. *Mol. Cell. Biol*. 2001; 21: 7117-7136.
50. Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI et al. PTEN , a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human, brain, breast and prostate cancer. *Science* 1997;275:1943-1947.
51. N.K. Tonks, Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 7 (2006) 833–846.
52. Tonks NK, Diltz CD, Fischer EH. Purification of the major protein tyrosine phosphatases of human placenta. *J. Biol. Chem*. 1988; 263: 6722-6730.
53. Frangioni, J.V. et al. (1992) The nontransmembrane tyrosine phosphatase PTP-1B localizes to the endoplasmic reticulum via its amino acid C-terminal sequence. *Cell* 68, 545–560.

54. Woodford-Thomas, T.A. et al. (1992) Expression of a protein tyrosine phosphatase in normal and v-src-transformed mouse 3T3 fibroblasts. *J. Cell Biol.* 117, 401–414.
55. Bourdeau A, Dube N, Tremblay ML. Cytoplasmic protein tyrosine phosphatases, regulation and function: the roles of PTP1B and TC-PTP. *Curr Opin Cell Biol* 2005;17:203–9.
56. Elchebly M, Payette P, Michaliszyn E, et al. Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science* 1999; 283:1544–8.
57. Klamon LD, Boss O, Peroni, OD, et al. Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B deficient mice. *Mol Cell Biol* 2000;20:5479–89.
58. Liu F, Chernoff J. PTP1B associates with and is tyrosine phosphorylated by epidermal growth factor receptor in cultured cells. *Biochem J* 1997;327:139–45.
59. Haj FG, Markova B, Klamon LD, Bohmer FD, Neel BG. Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatase-1B. *J Biol Chem* 2003;278: 739–44.
60. Lammers R, Bossenmaier B, Cool DE, et al. Differential activities of protein tyrosine phosphatases in intact cells. *J Biol Chem* 1993;268:22456–62.
61. Kakazu A, Sharma G, Bazan HE. Association of protein tyrosine phosphatases (PTPs)-1B with c-Met receptor and modulation of corneal epithelial wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:2927–35.
62. Brown-Shimer S, Johnson KA, Hill DE, Bruskin AM. Effect of protein tyrosine phosphatase 1B expression on transformation by the human neu oncogene. *Cancer Res* 1992;52:478–82.
63. LaMontagne KRJ, Hannon G, Tonks NK. Protein,tyrosine phosphatase PTP1B suppresses p210 bcr-ablinduced transformation of rat-1 fibroblasts and promotes differentiation of K562 cells. *Proc Natl Acad Sci U SA* 1998;95:14094–9.
64. Liu F, Chernoff J. Suppression of oncogene-mediated transformation of rat 3Y1 fibroblasts by protein tyrosine phosphatase 1B requires a functional SH3-ligand. *Mol Cell Biol* 1998;18:250–9.
65. Bjorge JD, Pang A, Fujita DJ. Identification of proteintyrosine 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;275:41439–46.
66. Anderie I, Schulz I, Schmid A. Direct interaction between ER membrane-bound PTP1B and its plasma membrane-anchored targets. *Cell Signal* 2007;19:582–92.

67. Liang F, Lee SY, Liang J, Lawrence DS, Zhang ZY. The role of protein-tyrosine phosphatase 1B in integrin signaling. *J Biol Chem* 2005;280:24857–63.
68. S. Brown-Shimer, KA, Johnson, JB. Lawrence, C Johnson , A Bruskin, NR Green, DE, Hill. Molecular cloning and chromosome mapping of the human gene encoding protein phosphotyrosyl phosphatase 1B, *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 87 (1990) 5148-5152.
69. P.A. Forsell, Y Boie, J Montalibet, S Collins, BP. Kennedy. Genomic characterization of the human and mouse protein tyrosine phosphatase-1B genes, *Gene* 260(2000) 145-153.
70. MM. Tanner, M. Tirkkonen, A. Kallioniemi, J. Isola, 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.* 56 (1996) 3441-3445.
71. I. Radke, M. Götte, C. Kersting, B. Mattsson, L. Kiesel and P Wülfing. Expression and prognostic impact of the protein tyrosine phosphatases PRL-1, PRL-2, and PRL-3 in breast cancer. *British Journal of Cancer* (2006) 95, 347 – 354.
72. L.E. Arias-Romero, S. Saha, O. Villamar-Cruz, S.C. Yip, S.P. Ethier, Z.Y. Zhang, J.Chernoff, Activation of Src by protein tyrosine phosphatase 1B is required for ErbB2 transformation of human breast epithelial cells, *Cancer Res.* 69 (2009) 4582–4588.
73. Julien, S. G. et al. Protein tyrosine phosphatase 1B deficiency or inhibition delays ErbB2-induced mammary tumorigenesis and protects from lung metastasis. *Nature Genet.* 39, 338–46 (2007).
74. M. Bentires-Alj, B.G. Neel, Protein-tyrosine phosphatase 1B is required for HER2/Neu-induced breast cancer, *Cancer Res.* 67 (2007) 2420–2424.
75. Haglund, K., Sigismund, S., Polo, S., Szymkiewicz, I., Di Fiore, P.P., and Dikic, I. (2003). Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. *Nat. Cell Biol.* 5, 461–466.
76. Mosesson, Y., Shtiegman, K., Katz, M., Zwang, Y., Vereb, G., Szollosi, J., and Yarden, Y. (2003). Endocytosis of receptor tyrosine kinases is driven by mono-, not poly-ubiquitylation. *J. Biol. Chem.*, in press.
77. Katzmann, D.J., Odorizzi, G., and Emr, S.D. (2002). Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 893–905.
78. Thien, C.B., and Langdon, W.Y. (2001). Cbl: many adaptations to regulate protein tyrosine kinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 294–307.
79. Levkowitz, G., Waterman, H., Ettenberg, S.A., Katz, M., Tsygankov, A.Y., Alroy, I., Lavi, S., Iwai, K., Reiss, Y., Ciechanover, A., et al. (1999). Ubiquitin ligase activity and

- tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1. *Mol. Cell* 4, 1029–1040.
80. Soubeyran, P., Kowanetz, K., Szymkiewicz, I., Langdon, W.Y., and Dikic, I. (2002). Cbl-CIN85-endophilin complex mediates ligand-induced downregulation of EGF receptors. *Nature* 416, 183–187.
 81. Blume-Jensen P, Hunter T. (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature* 411, 355–365.
 82. Lamorte, L., and Park, M. (2001). The receptor tyrosine kinases: role in cancer progression. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* 10, 271–288.
 83. Bryant, D. M and Stow J. L. Nuclear translocation of cell-surface receptors: lessons from fibroblast growth factor. *Traffic* 2005; 6(10): 947-54.
 84. Baulida J, Kraus MH, Alimandi M, Di Fiore PP, Carpenter G. (1996). All ErbB receptors other than the epidermal growth factor receptor are endocytosis impaired. *J Biol Chem* 271: 5251–5257.
 85. Karunagaran D, Tzahar E, Beerli RR, Chen X, Graus-Porta D, Ratzkin BJ et al. (1996). ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer. *EMBO J* 15: 254–264.
 86. Guogang Yuan, Lu Qian, Ming Shi, Feng Lu, Dan Li, Meiru Hu, Ming Yu, Beifen Shen, Ning Guo. HER2-dependent MMP-7 expression is mediated by activated STAT3. *Cellular Signalling*, Volume 20, Issue 7, July 2008, Pages 1284–1291.
 87. Ignatoski KM, Maehama T, Markwart SM, Dixon JE, Livant DL, Ethier SP. (2000). ERBB-2 overexpression confers PI-3' kinase-dependent invasion capacity on human mammary epithelial cells. *Br J Cancer* 82: 666–674.
 88. Benlimame N, He Q, Jie S, Xiao D, Xu YJ, Loignon M et al. (2005). FAK signaling is critical for ErbB-2/ErbB-3 receptor cooperation for oncogenic transformation and invasion. *J Cell Biol* 171: 505–516.
 89. Woods Ignatoski KM, Grewal NK, Markwart S, Livant DL, Ethier SP. (2003). p38MAPK induces cell surface alpha4 integrin downregulation to facilitate erbB-2-mediated invasion. *Neoplasia* 5: 128–134.
 90. Gambaletta D, Marchetti A, Benedetti L, Mercurio AM, Sacchi A, Falcioni R. (2000). Cooperative signaling between alpha(6)beta(4) integrin and ErbB-2 receptor is required to promote phosphatidylinositol 3-kinase-dependent invasion. *J Biol Chem* 275: 10604–10610.
 91. Seton-Rogers SE, Lu Y, Hines LM, Koundinya M, LaBaer J, Muthuswamy SK et al. (2004). Cooperation of the ErbB2 receptor and transforming growthfactor beta in

- induction of migration and invasion in mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 1257–1262.
92. Kelly E, Fathers KE. Crk adaptor proteins act as key signaling integrators for breast tumorigenesis. *Breast Cancer Research* 2012, 14:R74.
 93. Lamorte L, Rodrigues S, Naujokas M, Park M: Crk synergizes with epidermal growth factor for epithelial invasion and morphogenesis and is required for the met morphogenic program. *J Biol Chem* 2002, 277:37904-37911.
 94. Rodrigues SP, Fathers KE, Chan G, Zuo D, Halwani F, Meterissian S, Park M: CrkI and CrkII function as key signaling integrators for migration and invasion of cancer cells. *Mol Cancer Res* 2005, 3:183-194.
 95. Matsuda M, Mayer BJ, Hanafusa H: Identification of domains of the v-crk oncogene product sufficient for association with phosphotyrosinecontaining proteins. *Mol Cell Biol* 1991, 11:1607-1613.
 96. Iwahara T, Akagi T, Fujitsuka Y, Hanafusa H: CrkII regulates focal adhesion kinase activation by making a complex with Crk-associated substrate, p130Cas. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, 101:17693-17698.