



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**ASOCIACIÓN DE Muc4 CON EL RECEPTOR erbB1 EN RELACIÓN A
EVENTOS DE PROLIFERACIÓN Y APOPTOSIS EN
CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS**

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE: MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

C.D. ADRIANA DENISE RÍOS MAGALLANES

TUTORA:

DRA. MARÍA DOLORES JIMÉNEZ FARFÁN

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

MÉXICO, D.F. JUNIO DE 2013.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

ÍNDICE

ABSTRACT	1
1.RESUMEN	2
2. INTRODUCCIÓN	
3. ANTECEDENTES	3
3.1 Generalidades de las mucinas.	4
3.2 Mucinas de membrana.	5
3.2.1 MUC4.	6
3.3 MUC4 y cáncer.	7
3.3.1 MUC4 y proliferación celular.	8
3.3.2 MUC4 y apoptosis.	10
3.4 Receptores erbB.	11
3.4.1 Receptores erbB y cáncer.	13
3.4.2 erbB1 y cáncer.	13
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	14
5. HIPÓTESIS.	15
6. OBJETIVO GENERAL.	15
6.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	15
7. MATERIALES Y METODOS.	16
7.1 Diseño experimental.	16
7.2 Muestras de Carcinoma Oral de Células Escamosas (COCE)	16
7.2.1 Casos.	16
7.2.2 Controles.	16
7.3 Inmunohistoquímica.	17
7.4 Líneas celulares y condiciones de cultivo.	18
7.5 Extracción de proteínas.	18

7.6 Inmunoprecipitación.	19
7.7 Electroforesis y Western Blot.	19
7.7.1 SDS-PAGE.	19
7.7.2 Western Blot.	19
7.8 Inmunocitoquímica.	20
8. RESULTADOS.	21
8.1 Descripción de los casos de Carcinoma Oral de Células Escamosas.	21
8.2 Determinación del patrón de expresión de MUC4 y el receptor erbB1 en Carcinoma Oral de Células Escamosas.	23
8.3 Asociación de MUC4 con el receptor erbB1 en la línea tumoral Cal-27.	25
8.4 Incremento en la expresión de moléculas de proliferación celular en Carcinoma Oral de Células Escamosas	26
8.5 Expresión de moléculas de supervivencia y muerte celular en Carcinoma Oral de Células Escamosas	28
9. DISCUSIÓN	33
10. CONCLUSIONES	37
11. PERSPECTIVAS DE LA INVESTIGACIÓN	37
12. REFERENCIAS	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Funciones de las mucinas de membrana y secretadas.	5
Figura 2. Estructura de las mucinas de membrana.	6
Figura 3. Estructura de MUC4.	7
Figura 4. Participación de MUC4 en la proliferación celular.	9
Figura 5. Participación de MUC4 en la apoptosis.	11
Figura 6. Familia de Receptores erbB.	12
Figura 7. Hematoxilina y eosina de mucosa oral y Carcinoma Oral de Células Escamosas	16
Figura 8. Porcentaje de casos de Carcinoma Oral de Células Escamosas por región anatómica.	22
Figura 9. Frecuencia de Carcinoma Oral de Células Escamosas de acuerdo al grado de diferenciación histológica	22
Figura 10. Inmunohistoquímica de MUC4 y erbB1 en Carcinoma Oral de Células Escamosas.	24
Figura 11. Inmunocitoquímica de MUC4 y erbB1 en la línea celular Cal-27.	25
Figura 12. Asociación de MUC4 y erbB1 por inmunoprecipitación y Western Blot en la línea celular Cal-27	26
Figura 13. Inmunohistoquímica de PCNA en Carcinoma Oral de Células Escamosas.	27
Figura 14. Inmunocitoquímica de ERK2 y p-ERK2 y Western Blot de ERK2 y p-ERK2 y PCNA.	28
Figura 15. Inmunohistoquímica de Bax y Bcl-2 en Carcinoma Oral de Células Escamosas	31
Figura 16. Inmunocitoquímica y Western Blot de Bax y Bcl-2 en la línea celular Cal-27.	32

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Líneas celulares y condiciones de cultivo.	18
Tabla II. Frecuencia de casos por localización anatómica de Carcinoma Oral de Células Escamosas.	21

ABREVIATURAS

- OMS:** Organización Mundial de la Salud.
- PCNA:** *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (Antígeno Nuclear de Proliferación Celular).
- EGF:** *Epidermal Growth Factor* (Factor de Crecimiento Epidérmico).
- ErbB1/EGFR:** *Epidermal Growth Factor Receptor* (Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico).
- Erk2:** *Extracellular Signal-Regulated Kinase-2* (Cinasa Regulada por Señales Extracelulares -2).
- MAPK:** *Mitogen Activated Protein Kinase* (Proteína Cinasa Activada por Mitógenos).
- TGF α :** *Transforming Growth Factor α* Factor de Crecimiento transformante α .
- PI3K:** *Phosphatidylinositol 3-Kinase* (Fosfatidilinositol 3-Cinasa).
- VNTR:** *Variable number of tandem repeat* (número variable de repeticiones en tándem).

ABSTRACT

Head and neck cancer is among of the most common cancers in humans and the incidence and mortality rates have not changed substantially in recent decades. Particularly, Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) comprises 90% of cancers in oral cavity. Participation erbB1 receptor tyrosine kinase has been amply demonstrated in OSCC, interacting with processes proliferation, differentiation, adhesion, and cell motility. However, there is not any analysis of the expression and distribution of MUC4 in this neoplasm. MUC4 is a high molecular weight glycoprotein expressed on many epithelial and important for maintaining homeostasis. MUC4 has been identified in human carcinomas favoring tumor growth, survival and metastasis. The aim of this study was to determine the expression and association of MUC4 with erbB1 receptor in OSCC and its relation to the expression of molecules of proliferation and cell death. Fifty three fixed tissues of OSCC with three degrees of differentiation and Cal-27 cells were used. By immunohistochemistry MUC4, erbB1, PCNA, Bax and Bcl-2 expression on fixed tissue was analyzed. By immunoprecipitation MUC4/erbB1 association was determined. We investigated the expression and cellular localization of MUC4, erbB1, ERK2 and p-ERK2 by immunocytochemistry. Also the expression of ERK2, p-ERK2, PCNA, Bax and Bcl-2 was determined by Western blot. The results demonstrate a significant expression of MUC4 and erbB1. This expression was found associated with cell differentiation, principally higher in poorly differentiated tumors. We found a relationship between the expression of PCNA, Bcl-2 and Bax in OSCC samples and degree of histological differentiation. We could corroborate in Cal-27 cells the association of MUC4 and erbB1 as those obtained from OSCC tissues. Also we observed an increase in the expression of proliferation molecules (p-ERK and PCNA). These results provide new information about the simultaneous participation of two molecules important in the biological course of epithelial neoplasms. MUC4 expression in OSCC had not been reported so far, and the association of MUC4 with the receptor tyrosine kinase erbB1. Results suggest the likely involvement of this duo in proliferation and cell death events.

1. RESUMEN.

El cáncer de cabeza y cuello se encuentra entre las diez neoplasias más frecuentes en el humano y la incidencia y mortalidad no han variado sustancialmente en las últimas décadas. Particularmente, el Carcinoma Oral de Células Escamosas (COCE) representa el 90% de las neoplasias malignas en cavidad bucal. La participación del receptor tirosina cinasa erbB1 ha sido ampliamente demostrada en COCE, relacionándose con procesos de proliferación, diferenciación, adhesión y motilidad celular. Sin embargo, no existe un análisis de la expresión y distribución de MUC4 en este tipo de neoplasia. MUC4 es una glicoproteína de alto peso molecular expresada por diversos epitelios e importante para mantener la homeostasis. MUC4 ha sido identificada en carcinomas humanos favoreciendo el crecimiento tumoral, la sobrevivencia y la metástasis. Nuestro objetivo fue determinar la expresión y asociación de MUC4 con el receptor erbB1 en COCE y su relación con la expresión de moléculas de proliferación y muerte celular. Se utilizaron 53 casos de tejido fijado de COCE en sus tres grados de diferenciación y células Cal-27. En los casos del tejido fijado se analizó mediante IHQ la expresión de MUC4, erbB1, PCNA, Bax y Bcl-2. En la línea celular Cal-27 se analizó la asociación de MUC4/erbB1 por WB y, se determinó la expresión y localización celular de MUC4, erbB1, ERK2 y p-ERK2 mediante ICQ. Asimismo, se determinó la expresión de ERK2, p-ERK2, PCNA, Bax y Bcl-2 mediante WB. Los resultados obtenidos de los casos de COCE nos demuestran una importante expresión de MUC4 y erbB1. Dicha expresión se encontró relacionada con la diferenciación celular, siendo mayor en los tumores pobremente diferenciados. Se encontró una relación entre la expresión de PCNA, Bcl-2 y Bax en muestras de COCE y el grado de diferenciación histológica. En las células Cal-27 se corroboró la expresión y asociación de MUC4 y erbB1 observada previamente en los casos de COCE. También se observó un incremento en la expresión de las moléculas de proliferación p-ERK y PCNA. Los resultados proporcionan información nueva acerca de la participación simultánea de dos moléculas importantes en el curso biológico de los carcinomas. La expresión de MUC4 en el COCE no había sido reportada hasta el momento, así como la asociación de esta mucina con el receptor tirosina cinasa erbB1. Los resultados sugieren la probable participación de esta dupla en procesos los de proliferación y muerte celular.

2. INTRODUCCIÓN

Los términos mucoso, mucinoso o mucina se refieren a la capa viscosa que recubre los epitelios de los órganos huecos del tracto digestivo, respiratorio y genitourinario. Esta capa proporciona lubricación, hidratación y protección frente a agresiones tanto exógenas como endógenas. Las mucinas son el principal componente de esta capa y constituyen un grupo heterogéneo de moléculas glicoproteicas, filamentosas y de alto peso molecular. Su estructura se compone de un centro proteico al que se hallan unidas numerosas cadenas de carbohidratos que conforman más de la mitad de su masa.

Con el tiempo se ha transformado la concepción de las mucinas que las consideraba como un simple componente de una barrera defensiva. Numerosos estudios en el campo de la Genética, la Biología Molecular y de la Inmunología han involucrado a las mucinas en eventos de renovación y diferenciación epitelial, modulación de la adhesión celular, señalización celular, así como la protección contra patógenos específicos y, por otra parte, en procesos patológicos como la fibrosis quística, asma y cáncer.

La familia de mucinas (MUC) se divide en dos grandes grupos: *mucinas secretadas* y *mucinas de membrana*. MUC4 es una de las mucinas de membrana mejor caracterizadas. Su expresión anormal ha sido reportada en carcinoma mamario, pancreático, colorectal, y pulmonar, entre otros. Esta mucina posee tres dominios EGF que le permiten actuar como ligando de erbB2; la formación de este complejo permite la activación de vías de señalización relacionadas con procesos de proliferación, diferenciación, apoptosis, inmunosupresión, adhesión y consecuentemente, con la invasión tumoral y metástasis.

El establecimiento de la asociación de MUC4 con el receptor del factor de crecimiento epidérmico tipo 1 (ErbB1) y su participación en eventos de proliferación y apoptosis en el Carcinoma Oral de Células Escamosas en sus tres grados de diferenciación contribuye a una mejor comprensión de su conducta biológica y posible utilización como marcadores de diagnóstico y progresión de las lesiones neoplásicas desarrolladas en cabeza y cuello.

3. ANTECEDENTES

3.1 Generalidades de las mucinas.

Las mucinas son un grupo de glicoproteínas generalmente de alto peso molecular (200-2000 kDa) (Hatrupp y Gendler, 2008), aunque se han reportado mucinas citoplasmáticas de 30 a 45 kDa (Zhang *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006). Las mucinas son expresadas usualmente en células endoteliales y se asocian a procesos de lubricación, hidratación epitelial y protección al servir como barrera contra agentes patogénicos y tóxicos (**Figura 1**). Estas moléculas se caracterizan por estar altamente O-glicosiladas al presentar un dominio VNTR de repetición en tándem con número variado de sitios ricos en serina, treonina y prolina, conocidos como dominios mucínicos. Los grupos hidroxilo de treonina y serina proporcionan los sitios para la O-glicosilación. Los oligosacáridos de estas glicoproteínas proporcionan entre 50-90% de la masa molecular de la proteína madura, dependiendo del tipo de mucina y del patrón de las glicosiltransferasas expresadas en la célula de origen (Freire, 2005). En la actualidad se han identificado alrededor de 20 mucinas humanas (Theodoropoulos y Carraway, 2007). Las mucinas se pueden clasificar en dos grupos según su localización. Las secretadas, que carecen de un dominio transmembranal y se ubican en los espacios extracelulares y las de membrana que se caracterizan por la presencia de un dominio transmembranal, una región C terminal ubicada a nivel citoplasmático que se asocia con elementos del citoesqueleto y con proteínas adaptadoras que participan en la transducción de señales y un dominio extracelular donde se ubican los dominios VNTR (Hollingsworth y Swanson, 2004).

Hasta el momento se han descrito 15 genes que codifican a las mucinas cuyo patrón de expresión es específico a nivel tisular y celular. Algunas mucinas, como MUC1 y MUC4 están presentes en múltiples tejidos, mientras que otras tienen una localización más limitada, como MUC2 expresada predominantemente en el intestino (Fowler *et al.*, 2001; Moniaux *et al.*, 2001). La expresión de algunas mucinas está muy bien regulada desde etapas tempranas del desarrollo embrionario (Reid *et al.*, 1998; López *et al.*, 2001). Esta expresión llega a reducirse o perderse en etapas adultas, como en el caso de MUC4 que se expresa en la piel embrionaria antes de la cornificación (Zhang *et al.*, 2006).

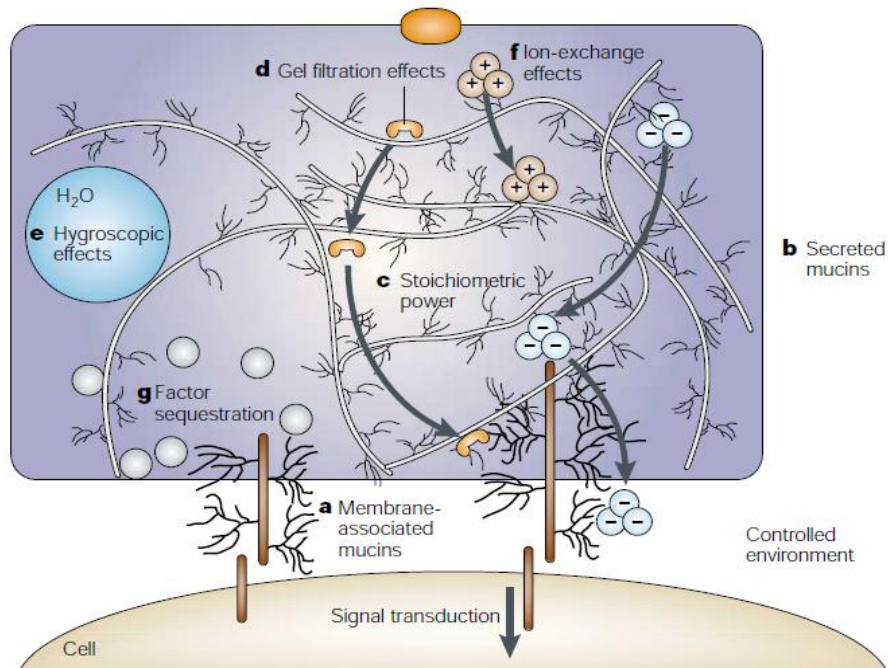


Figura 1. Funciones de las mucinas de membrana y secretadas. a) Las mucinas de membrana funcionan como sensores moleculares de la superficie celular, ya que informan sobre la situación del medio extracelular, así como también del estado morfológico o de diferenciación de la célula que desencadenan la activación y transducción de señales. b) Las mucinas secretadas forman una capa viscosa sobre la superficie epitelial desempeñando diferentes funciones entre las que destacan secuestro de moléculas, barrera de protección, entre otras. (Tomada de Hollingsworth y Swanson 2004).

3.2 Mucinas de membrana.

Las mucinas de membrana se componen generalmente de heterodímeros unidos por enlaces no covalentes. La subunidad mayor es extracelular, compuesta predominantemente de un número variable de repeticiones en tándem (VNTR). La subunidad más pequeña consiste en una región extracelular corta que contiene el dominio SEA (Enterocinasa de Proteína de Esperma y Agrina) o el dominio del factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Duraismy *et al.*, 2006). Este dominio permite la interacción con el receptor erbB2, y de esta manera las mucinas pueden participar en la regulación de diferentes procesos como el crecimiento, la motilidad, la diferenciación y la inflamación. También presenta un dominio transmembrana y una cola citoplasmática (CT) (Singh, *et al.*, 2006) (Figura 2).

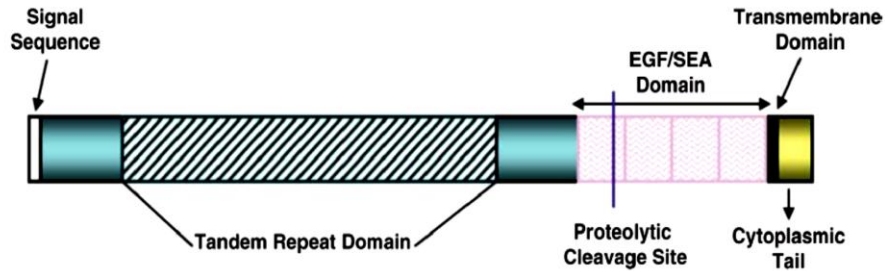


Figura 2 Estructura de las mucinas de membrana. Las mucinas de membrana constan de dos subunidades con base en el sitio de escisión proteolítica. La subunidad mayor es extracelular y la subunidad pequeña consiste en una región extracelular corta con un dominio SEA o EGF, un dominio transmembrana y la cola citoplasmática (Tomado de Bafna *et al.*, 2010).

3.2.1 MUC4.

El gen de MUC4 se localiza en el cromosoma 3 (región p29) y codifica una proteína transmembranal de tipo I de 2169 aminoácidos (Moniaux *et al.*, 1999). MUC4 se expresa en diversos tejidos epiteliales adultos y en células poco diferenciadas de embriones y fetos (Gendler *et al.*, 1995; Moniaux *et al.*, 2004). MUC4 está implicada en el proceso de citodiferenciación epitelial durante el desarrollo embrionario del pulmón, tráquea, esófago, estómago e intestino (Buisine *et al.*, 2001) y su expresión puede estar regulada por el ácido retinoico (Choudhury *et al.*, 2000), factores de crecimiento y citocinas (Andrianifahanana *et al.*, 2005; Chaturvedy *et al.*, 2008).

MUC4 se sintetiza como un polipéptido de cadena simple de 930 kDa, se escinde en un sitio de corte proteolítico GDPH (GlyAspProHis) para generar dos subunidades ligadas por enlaces no covalentes: MUC4 α y MUC4 β . La subunidad MUC4 α es altamente O-glicosilada con un peso aproximado de 850 kDa y la subunidad MUC4 β de aproximadamente 80 kDa que le permite asociarse a la membrana celular (Chaturvedy *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2004). MUC4 α posee cuatro dominios funcionales: un dominio VNTR rico en residuos de serina, treonina y prolina, un dominio NIDO (secuencia homóloga a la proteína nidogen), un dominio AMOP implicado en procesos de adhesión celular (Ciccarelli *et al.*, 2002) y el dominio vWD (secuencia homóloga al factor Von Willebrand), el cual permite la polimerización de mucinas por la formación de enlaces disulfuro entre cadenas. Por otra parte, MUC4 β contiene sitios para la N-glicosilación y tres dominios similares a EGF. Se ha demostrado que a través de estos tres dominios EGF la MUC4 actúa como ligando intramembrana de erbB2 (Komatsu *et al.*, 1999), así como también tiene una secuencia transmembrana y una cola citoplasmática de 22 aminoácidos (Chaturvedy *et al.*, 2008) (**Figura 3**).

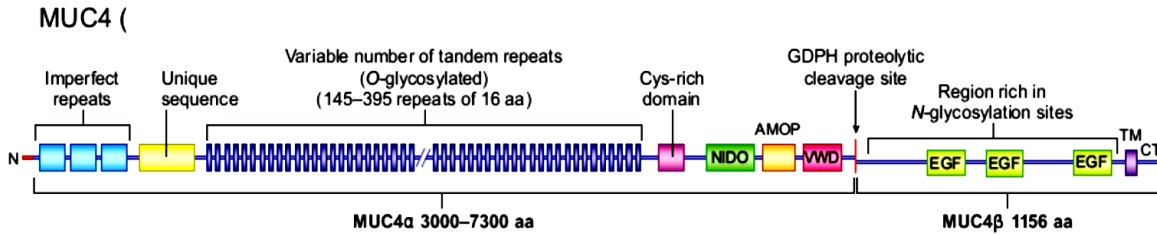


Figura 3. Estructura de MUC4. Los dominios mostrados incluyen la secuencia señal N-terminal (rojo), dominio transmembranal (TM), dominio C-terminal (CT), secuencia homóloga nidogen (NIDO), dominio asociado a adhesión y otras proteínas (AMOP); Factor von Willebrand (vWD) y dominios del factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Tomado de Hattrup y Gendler, 2008).

3.3 MUC4 y el cáncer.

En condiciones fisiológicas normales, MUC4 se localiza en la región apical de las células epiteliales de córnea, cavidad oral, oído medio, glándula lagrimal, glándulas salivales, tracto reproductivo femenino, próstata, esófago, estómago, colon, pulmón, tráquea y glándula mamaria, así como también en fluidos corporales como lágrimas, saliva y leche materna (Gipson 2004; Liu *et al.*, 2002; Kwon *et al.*, 2007). Se han reportado alteraciones cualitativas y cuantitativas en la estructura y expresión de MUC4 en enfermedades inflamatorias y cáncer. MUC4 se encuentra sobreexpresada en carcinomas de pulmón, mama, colon y ovario, y se expresa de forma aberrante en el cáncer de páncreas (Workman *et al.*, 2009; Davidson *et al.*, 2007). Se ha reportado neo-expresión de MUC4 en lesiones precancerosas pancreáticas y, se ha correlacionado con el avance de la enfermedad (Swartz *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2003). Por el contrario, la disminución en la expresión de MUC4 se ha observado en cáncer de próstata (Singh *et al.*, 2006). En estas células cancerosas, la localización apical de MUC4 se interrumpe y MUC4 está presente en toda la superficie celular (Singh *et al.*, 2007). Por otra parte, se ha reportado una localización difusa de MUC4 tanto en la membrana y el citoplasma, lo que podría sugerir su internalización constitutiva y reciclaje, como se ha sugerido para MUC1 (Litvinov y Hilkens, 1993). La pérdida de la polaridad celular en el cáncer también permite la interacción de MUC4 con ErbB2; este complejo se ha localizado en la superficie celular y en el citoplasma (Chaturvedi *et al.*, 2008), por lo que los efectos oncogénicos de MUC4 se cree que se producen a través de su interacción con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR).

3.3.1 MUC4 y la proliferación celular.

MUC4 contribuye a la regulación de la proliferación celular a través de su interacción con la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico (erbB). Estos receptores se encuentran en la superficie celular y se activan mediante la unión a sus ligandos específicos, lo que resulta en homó u heterodimerización con activación y fosforilación de residuos de tirosina (Riese *et al.*, 1998). Esta fosforilación provoca la activación y señalización de proteínas que se asocian con las tirosinas fosforiladas mediante la unión a los dominios SH2. Estas proteínas de señalización inician cascadas de transducción de señales relacionadas con proliferación celular, diferenciación, apoptosis y supervivencia (Schlessinger, 2000). La activación del receptor erbB2 representa un caso excepcional por diferentes motivos. En primer lugar no se ha descrito ningún ligando capaz de unirse a su ectodominio con alta afinidad, pero se ha encontrado a este receptor formando parte de dímeros con otros receptores (Citri *et al.*, 2003). La sobreexpresión de erbB2 es capaz de promover la transformación celular en ausencia de ligando sugiriendo que se expresa constitutivamente (Di Fiore *et al.*, 1987; Yarden *et al.*, 2001). Se ha demostrado que MUC4 actúa como ligando intramembranal de erbB2, activándolo y facilitando la dimerización con otros receptores (Carraway *et al.*, 2002; Jepson *et al.*, 2002). El complejo MUC4/erbB2 se ha observado en diversos tejidos normales (Arango *et al.*, 2001; Prici-Schiavi *et al.*, 2005) y, se ha evidenciado su formación y sobreexpresión en diferentes tipos de tumores y líneas celulares tumorales (Ramsauer *et al.*, 2006; Chaturvedi *et al.*, 2008b). El silenciamiento de MUC4 en células tumorales de páncreas se ha asociado con una regulación *down stream* de erbB2 y la consecuente disminución de su forma fosforilada (pY1248), sitio principal de autofosforilación en su región citoplasmática de erbB2 (Singh *et al.*, 2004). Estudios recientes han revelado que MUC4 interactúa con erbB2 estabilizando su expresión y actividad por mecanismos postraduccionales (Chaturvedi *et al.*, 2008b). erbB2 puede regular la proliferación celular y la metástasis mediante la activación de las vías MAPK y PI3K (Holbro *et al.*, 2004). Se ha demostrado que la interacción de MUC4 de rata (rMuc4) con erbB2 estimula la proliferación o diferenciación celular. Asimismo, esta unión induce la fosforilación limitada de la Y1248, que posteriormente conduce a la sobreexpresión de p21kip (inhibidor del ciclo celular) bloqueando las vías de MAPK y PI3K (Jepson *et al.*, 2002). Cuando las células han sido tratadas con neuroregulina (ligando para erbB3), la rMuc4 (mucina 4 de rata) potencia la señalización de erbB2 al activar las vías de MAPK y PI3K e incrementando la proliferación celular (Komatsu *et al.*, 2001) (**Figura 4**).

Se ha demostrado que MUC4 favorece la relocalización de erbB2 en la región apical de células cancerosas de colon, donde MUC4 fosforila a erbB2 en los residuos Y1139 y Y1248 activando p38, con la consiguiente activación de Akt (Ramsauer *et al.*, 2006). La activación de p38 por el complejo MUC4/erbB2 promueve la supervivencia y la diferenciación. Por lo tanto, la interacción de MUC4 con erbB2 tiene una función importante en la progresión del tumor.

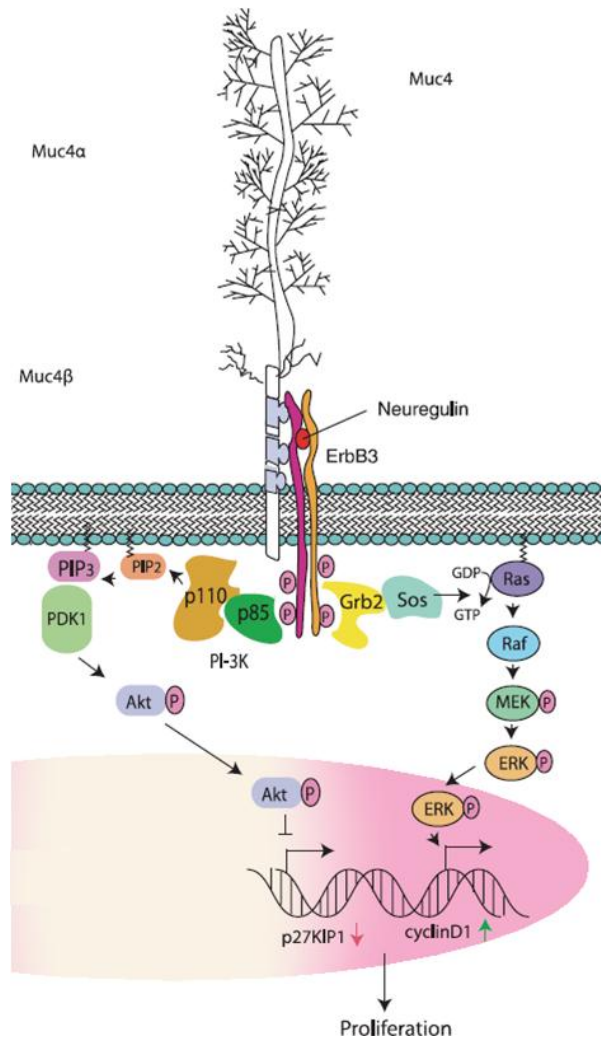


Figura 4 Participación de MUC4 en la proliferación celular. En presencia de neuregulina, rMuc4 potencia la fosforilación de erbB2 favoreciendo la supervivencia celular vía Akt y una respuesta proliferativa mediada por ERK (Tomada de Chatuverdi *et al.*, 2008).

3.3.2 MUC4 y la apoptosis.

La sobreexpresión de MUC4 confiere resistencia a la apoptosis en células tumorales. Se ha demostrado que la sobreexpresión de MUC4 y rMuc4 genera un rápido crecimiento tumoral y disminución de la respuesta apoptótica *in vitro* (Komatsu *et al.*, 2001; Chaturvedi *et al.*, 2007; Moniaux *et al.*, 2007). MUC4 crea resistencia a tratamientos anti-neoplásicos como la doxorubicina en líneas celulares de melanoma, reduciendo la activación de la caspasa-9 cuando son tratadas con el inductor de apoptosis, actinomicina D. A diferencia de MUC1, MUC4 no causa supresión de la vía extrínseca de apoptosis (Hu *et al.*, 2003).

Aunque la función anti-apoptótica de MUC4 no está bien definida, es posible que la interacción de MUC4 con erbB2 participe en la resistencia a la apoptosis. De hecho, estudios con rMUC4 han demostrado que esta interacción potencia la señalización de Akt, facilitando la sobrevivencia celular (Carraway *et al.*, 1999). En experimentos con rMUC4 se ha encontrado relación entre la resistencia a la apoptosis y la sobreexpresión de p27kip (Jepson *et al.*, 2002). Esta regulación se invierte en presencia de neuroregulina, ligando específico de erbB3. Por tanto, el papel de MUC4 en la resistencia a la muerte celular por apoptosis parece estar regulada por una red de señalización que implica MUC4 y erbB2, y otras vías de señalización alteradas por la transformación neoplásica (**Figura 5**).

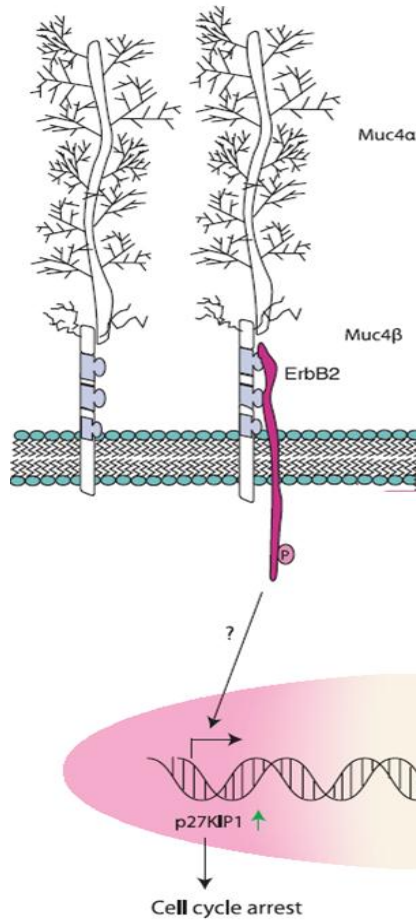


Figura 5. Participación de MUC4 en la apoptosis. La interacción de rMuc4 con erbB2 induce la sobreexpresión de p27Kip1 conduciendo al arresto del ciclo celular (Tomada de Chatuverdi *et al.*, 2008).

3.4 Receptores erbB.

Los receptores ErbB/HER conforman la subclase I de receptores tirosina quinasa (RTK) que regulan importantes funciones en las células normales y son importantes en la oncogénesis. El primero de los miembros de la familia descrito fue el receptor del factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal Growth Factor Receptor*, EGFR/ErbB1/HER1) identificado como una proteína de membrana de 170 kDa que se fosforilaba en presencia de EGF (Carpenter *et al.*, 1975; Carpenter *et al.*, 1978) promoviendo la proliferación de las células epiteliales (Cohen 1965). La familia de receptores erbB está formada por cuatro miembros: EGFR/erbB1, erbB2 (Neu, Her2), erbB3 y erbB4.

Los receptores ErbB como la mayoría de los RTKs, son glicoproteínas de membrana que presentan una estructura compuesta por una región extracelular a la que se une el ligando, una única región transmembrana y una larga cola citoplasmática que contiene el dominio tirosina

cinasa seguido de secuencias reguladoras no catalíticas con residuos de tirosina fosforilables (**Figura 6**).

La fosforilación de los residuos de tirosina en el dominio citoplasmático de los receptores ErbB permite su interacción con diferentes moléculas adaptadoras que desencadenan una red de cascadas de señalización intracelular (Schlessinger 2000). A pesar de su elevada homología, los receptores ErbB no presentan redundancia en lo que se refiere a la señal desencadenada. El estudio de los sitios fosforilables en la cola del receptor de EGF ha permitido deducir que éste activa principalmente, las vías Ras- MAPK y PI3K-Akt, pero no es capaz de acoplarse directamente a esta última (Schulze *et al.*, 2005). En cambio, el receptor carente de actividad cinasa ErbB3, puede reclutar a PI3K sobre todo cuando se encuentra formando dímeros con ErbB2. De hecho, ErbB3 es considerado el principal miembro de la familia encargado de activar esta vía de supervivencia celular (Waterman *et al.*, 1999). A pesar de no unirse con gran afinidad a ningún ligando, el receptor ErbB2, es el compañero preferencial del resto de receptores ErbB para formar complejos y, además, es el que se acopla a un mayor número de cascadas de señalización (Jones *et al.*, 2006) desencadenando así potentes señales mitogénicas (Citri y Yarden 2006).

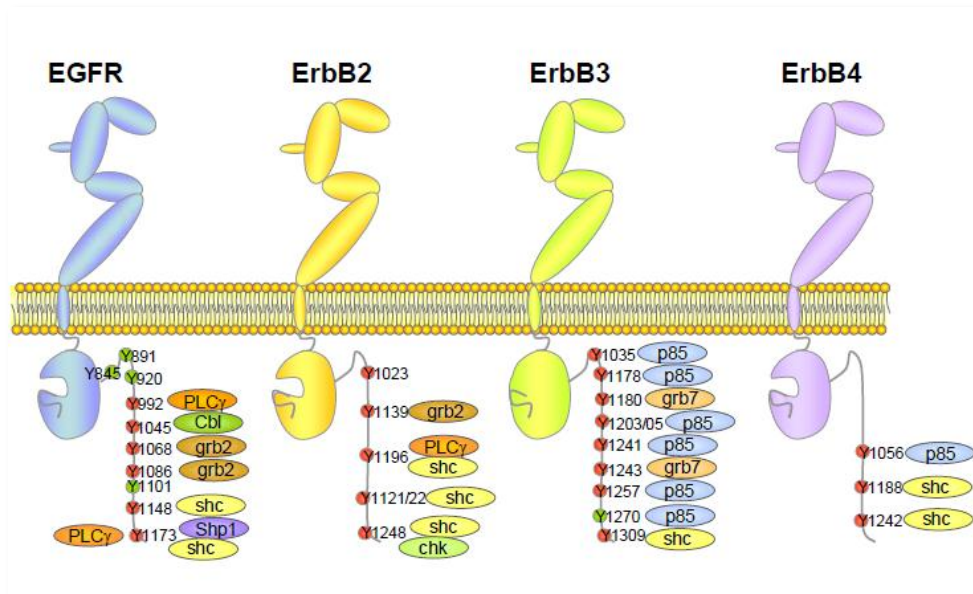


Figura 6. Residuos de tirosina fosforilables en la cola citoplasmática de los receptores ErbB y moléculas adaptadoras que se asocian a ellos. En rojo se representan los residuos de tirosina que se autofosforilan y en verde aquellos que son diana de la cinasa Src. Entre las moléculas que se asocian al dominio citoplasmático de los receptores ErbB se encuentran las moléculas adaptadoras Shc, Crk, Grb2, Grb7 y Gab1, las cinasas Src, Chk y PI3K (a través de p85) y proteínas tirosina fosfatasa como Shp1 y Shp2 (Tomado de Hynes y Lane 2005).

3.4.1 Receptores ErbB y cáncer

La señalización a través de los receptores ErbB es importante en múltiples procesos fisiológicos incluyendo el desarrollo embrionario, por lo que se encuentra ampliamente regulado. La desregulación de esta red de señalización puede desencadenar diferentes alteraciones del desarrollo y diferentes tipos de cáncer (Hynes y Lane 2005; Jiménez-Farfán *et al.*, 2005; Jacinto-Alemán *et al.*, 2012 *–en prensa–*). En el caso de los receptores ErbB esta mayor activación puede ser desencadenada por la sobreexpresión del receptor, por su activación constitutiva debida a alteraciones moleculares o por el incremento de los niveles de ligando (Yarden y Sliwkowski 2001).

3.4.2 erbB1 y cáncer

ErbB1 fue el primero de los receptores de la familia que se relacionó directamente con la carcinogénesis. Este factor de crecimiento se codifica en el cromosoma 7p13-q22 (Downward *et al.*, 1984). La sobreexpresión de erbB1 debida a la amplificación del gen que lo codifica es frecuente en diferentes tipos de tumores (Yarden y Sliwkowski 2001), y se ha asociado con un incremento de la proliferación y menor supervivencia. A pesar de estos datos, parece que el aumento de la actividad del receptor de EGF se da principalmente gracias a la generación de un bucle autócrino. De esta manera, la sobreexpresión del receptor en tumores suele ir acompañada de la expresión de ligandos como TGF α , ya sea por parte de las mismas células tumorales o procedentes del estroma circundante (Hanahan y Weinberg 2000). Asimismo, diferentes mutaciones en su secuencia hacen que se encuentre activo de forma constitutiva. La mutación más frecuente es la delección, variación descrita por primera vez en gliomas (Wong *et al.*, 1992), y posteriormente identificada en carcinomas de pulmón, ovario, mama y carcinoma escamoso de cabeza y cuello (García de Palazzo *et al.*, 1993; Moscatello *et al.*, 1995; Ge *et al.*, 2002; Okamoto *et al.*, 2003; Sok *et al.*, 2006), donde se evidenció fosforilación en ausencia de ligando (Batra *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 1997). Diversos estudios reportan que la sobreexpresión de erbB1 es constante en la mayoría de los casos de Carcinoma Oral de Células Escamosas (COCE) (Bei *et al.*, 2001 y 2004).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El cáncer de cabeza y cuello se encuentra entre las diez neoplasias más frecuentes en el hombre. De éstos, el Carcinoma Oral de Células Escamosas (COCE) es la neoplasia más común, con un índice de sobrevivencia de 5 años en el 50% de los casos. El COCE es una neoplasia epitelial invasiva. Hasta hace algunos años, su prevalencia en la cavidad oral era más alta en hombres debido al mayor consumo de tabaco y alcohol, aunque actualmente esta tendencia se ha ido modificando e igualando en relación a las mujeres. Se presenta más comúnmente entre la quinta y sexta décadas de la vida. El análisis histopatológico clasifica al COCE en tres tipos dependiendo del grado de diferenciación histológica (bien, moderado y pobremente diferenciado). La agresividad en la mayoría de los casos es inversamente proporcional al grado de diferenciación.

Los mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo del COCE no son aún bien conocidos, sin embargo existen evidencias de que entre los primeros cambios que ocurren en una célula durante su transición hacia la neoplasia se encuentra la modificación de mucinas y los receptores del factor de crecimiento epidérmico (ErbB).

El presente estudio propone brindar evidencia de la expresión simultánea de la mucina MUC4 y el receptor ErbB1 en muestras de tejido procedente de COCE en los tres grados de diferenciación histológica y, en la línea celular tumoral Cal-27, así como establecer la asociación de ambas moléculas con las redes de señalización relacionadas con proliferación y muerte celular.

5. HIPÓTESIS.

H₁. La expresión de la mucina MUC4 y el receptor tirosina cinasa ErbB1 está relacionada con el grado de diferenciación histológica del carcinoma oral de células escamosas.

H₂. La asociación de la mucina MUC4 y el receptor tirosina cinasa ErbB1 en la línea tumoral de carcinoma oral de células escamosas Cal-27 está relacionada con señales de proliferación y muerte celular.

6. OBJETIVO GENERAL.

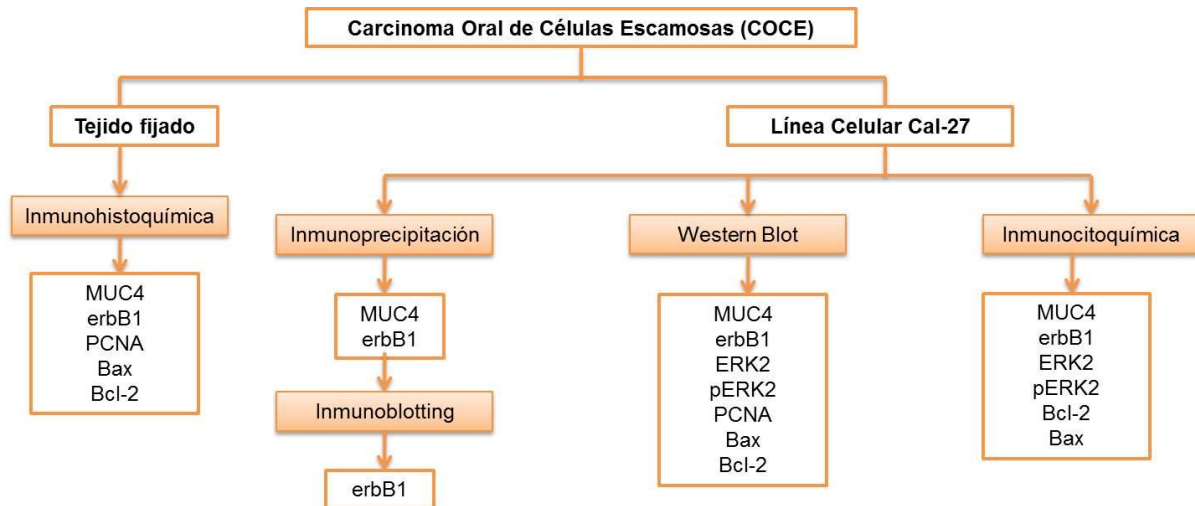
Establecer la asociación de la mucina MUC4 con el receptor ErbB1 y, su relación con la expresión de moléculas de proliferación y apoptosis en tejido con diagnóstico de carcinoma oral de células escamosas en los tres grados de diferenciación histológica y la línea tumoral Cal-27.

6.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Determinar el patrón de expresión de las moléculas MUC4 y el receptor ErbB1 en muestras de carcinoma oral de células escamosas en los tres grados de diferenciación histológica mediante inmunohistoquímica.
- Determinar la expresión de MUC4 y el receptor ErbB1 en la línea celular Cal-27 mediante inmunocitoquímica y Western blot.
- Determinar la asociación de MUC4 con el receptor ErbB1 en la línea celular Cal-27 mediante inmunoprecipitación.
- Determinar las diferencias en la proliferación celular en muestras de carcinoma oral de células escamosas en los tres grados de diferenciación histológica mediante inmunohistoquímica con PCNA (*Proliferation Cell Nuclear Antigen*).
- Determinar la expresión de moléculas de proliferación en la línea celular Cal-27 mediante inmunocitoquímica (ERK, p-ERK) y Western blot (ERK, p-ERK y PCNA).
- Determinar la expresión de moléculas de sobrevivencia y muerte celular en muestras de carcinoma oral de células escamosas en sus tres grados de diferenciación histológica mediante inmunohistoquímica con Bax y Bcl-2.
- Determinar la expresión de las moléculas de sobrevivencia y muerte celular Bax y Bcl-2 en la línea celular Cal-27 mediante Western Blot.

7. MATERIALES Y MÉTODOS.

7.1 Diseño experimental.



7.2 Muestras de Carcinoma Oral de Células Escamosas.

7.2.1 Casos.

Cincuenta y tres casos de carcinoma oral de células escamosas en los tres grados de diferenciación histológica fueron obtenidos del Departamento de Tumores de Cabeza y Cuello del Hospital General y del Instituto Nacional de Cancerología (INCan). Después de la tinción con Hematoxilina y Eosina se realizó la gradificación histológica de los casos de COCE según los parámetros de la OMS (Barnes *et al.*, 2005) (**Figura 7**).

7.2.2 Controles.

Se utilizaron veinte casos de mucosa oral sana (zona retromolar) procedentes del banco de muestras del Laboratorio de Inmunología, DEPeI, Facultad de Odontología, UNAM, de pacientes sometidos a extracción indicada de terceros molares.

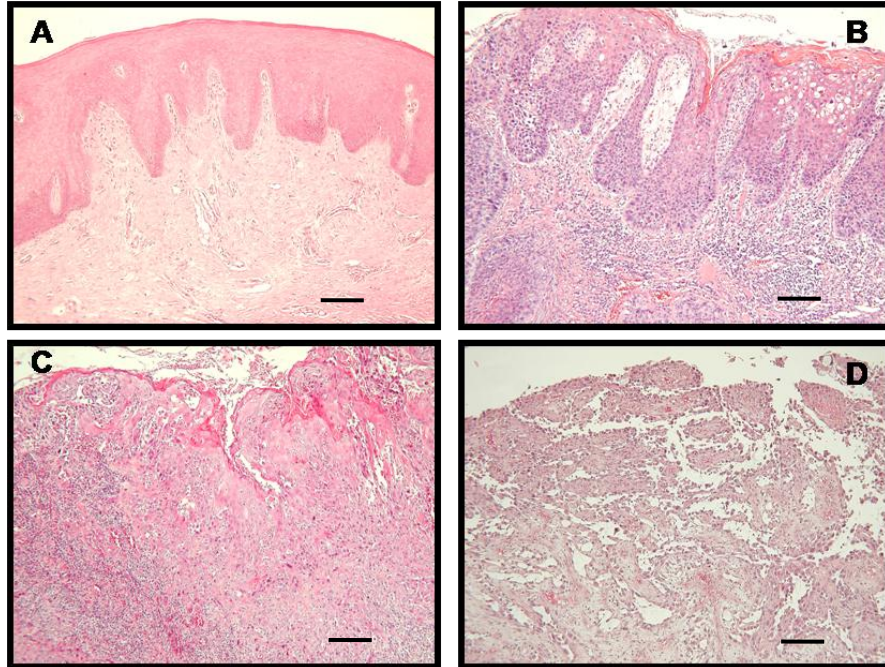


Figura 7.A. Mucosa Oral Epitelio escamoso estratificado queratinizado con proyecciones papilares hacia tejido conjuntivo. **B. COCE bien diferenciado.** Epitelio estratificado queratinizado displásico, con pleomorfismo celular, hiperplasia basal, edema intracelular, infiltrado inflamatorio intenso subepitelial, en estratos más profundos se observan islas epiteliales. **C. COCE moderadamente diferenciado.** Epitelio escamoso con alto grado de pleomorfismo celular, pérdida de cohesión, infiltración hacia tejido conjuntivo, hiperchromatismo nuclear, alteración de la membrana basal y, patrón reticular infiltrante. **D. COCE pobremente diferenciado.** Células pleomórficas con nucleolo evidente, ordenadas en islas y cordones y, pérdida de la cohesión celular (barra=200 μ m)

7.3 Inmunohistoquímica.

Se realizaron cortes seriados de 4 μ m y las muestras fueron desparafinadas y rehidratadas de manera convencional a través de baños en xilol y alcohol a diferentes concentraciones. Se realizó la recuperación antigénica con citrato de sodio 0.1M pH 6 en ebullición por 15 min. Las muestras fueron colocadas durante 20 min en PBS 1x-Tritón 0.2%. Se bloqueó la peroxidasa endógena con H₂O₂ al 3% durante 20 min. Se incubó con PBS-Albúmina (BSA) 0.1% durante 20 min. Se incubó con el anticuerpo primario anti-MUC4 (sc-20117, dilución 1:100), anti-erbB1, anti-PCNA (sc-56, dilución 1:100), anti-bcl-2 (sc-490, dilución 1:100) y anti-bax (sc-493, dilución 1:100) (Sta. Cruz, CA) toda la noche a 4°C en humedad. Se incubó con el Sistema Multilink (Dako North America, Inc, Carpinteria, CA) durante 30 minutos a temperatura ambiente, seguido de la incubación con estreptavidina+HRP por 30 min. Se reveló con 3'3'diaminobencidina (DAB) (Dako North America, Inc, Carpinteria, CA) y las muestras fueron contrateñidas con hematoxilina de Harris y montadas con resina hidrofóbica.

7.4 Líneas celulares y condiciones de cultivo.

Los fibroblastos utilizados procedieron de cultivos primarios de fibroblastos gingivales humanos (control negativo de MUC4). La línea celular tumoral de carcinoma oral de células escamosas Cal-27 y la línea celular tumoral FaDu (control positivo de MUC4) fueron adquiridas de American Tissue Cell Culture (ATCC).

Tabla I.

Línea celular	Especie	Origen	Medio de cultivo	Referencia
Cal-27 (CRL-2095)	<i>Homo sapiens</i>	Lengua	DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	GIOANNI J et al; 1988
FaDu (HTB-43)	<i>Homo sapiens</i>	Hipofaringe	EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium)	RANGAN SR 1972.

Los medios se suplementaron con penicilina y estreptomina (100 U/ml y 100 µg/ml respectivamente) y al 10% de Suero Fetal Bovino (SFB). Las líneas celulares se mantuvieron en una incubadora a 37°C, en una atmósfera húmeda al 5% de CO₂ y cultivadas en condiciones de esterilidad. Se cultivaron 2x10⁶ células en el medio de cultivo correspondiente para cada línea tumoral y medio DMEM para fibroblastos gingivales.

7.5 Extracción de proteína.

En botellas de cultivo se sembraron 2x10⁶ células en el medio correspondiente, como aparece en la **Tabla I** y suplementadas con 10% de suero fetal bovino (SFB, Byproductos, México), antibiótico, antimicótico e incubadas a 37°C con 5% de CO₂ hasta obtener una monocapa con una confluencia del 90%. Las células se lavaron con solución salina estéril e incubaron con Tripsina 1%-EDTA 0.25% (Sigma, St. Louis, MO, USA). Se neutralizó la reacción con medio de cultivo suplementado con SFB. La suspensión celular se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min. El pellet se resuspendió en 100 µl de buffer de lisis (150 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1% deoxicolato, 0.1% sulfato dodecil de sodio, 1% Tritón X-100, 50 mM NaF, 100 mM pirofosfato de sodio, 3.5 mM ortovanadato de sodio, coctel inhibidor de proteasas, y 0.1 mM PMSF) (Sigma, St. Louis, MO), la suspensión se sometió a agitación constante por 1h a

4°C. Se centrifugó a 9000 rpm durante 15 min a 4°C. La cuantificación de proteínas se realizó utilizando el método de Lowry (OD 580nm).

7.6 Inmunoprecipitación.

Se tomaron 500 µg del extracto proteico adicionando 0.2 µg/ml de anticuerpo anti-MUC4 (sc-20117, Sta. Cruz, CA) y buffer de lisis (150 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1% deoxicolato, 0.1% sulfato dodecil de sodio, 1% Tritón X-100, 50 mM NaF, 100 mM pirofosfato de sodio, 3.5 mM ortovanadato de sodio, coctel inhibidor de proteasas, y 0.1 mM PMSF) (Sigma, St. Louis, MO). Se incubó toda la noche a 4°C en agitación constante. Al inmunocomplejo se adicionaron 100 µl de agarosa-A/G (Sta. Cruz, CA) durante 3h a 4°C. Se recuperó el inmunoprecipitado por centrifugación a 10,000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se lavó el pellet tres veces con 1,000µl de buffer de lisis a 10,000 rpm a 4°C. El pellet final se resuspendió en 10µl de buffer de muestra 2X (sc-24945, Sta. Cruz, CA). Las muestras se calentaron en baño María durante 10 min a 65°C y fueron corridas en geles de poliacrilamida y posteriormente transferidas a membranas de nitrocelulosa como se describe a continuación.

7.7 Electroforesis y Western Blot.

7.7.1 SDS-PAGE.

La electroforesis se realizó en condiciones reductoras en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 8% y 10% dependiendo del tamaño de las proteínas a evaluar siguiendo el protocolo descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). Se tomaron 40 µg de proteína, se agregó buffer de muestra 2x (Sta. Cruz, CA). Se calentaron las muestras a 65 °C durante 5 min. Las muestras se corrieron en un Mini-PROTEAN®, BioRad (100 V) en buffer de corrida (Tris 20 mM, glicina 192 mM y 1% SDS, pH 8.3).

7.7.2 Western Blot.

Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa en una cámara semi-húmeda (BioRad) durante una hora a 15 V en buffer de transferencia (Tris 20 mM, glicina 192 mM, pH 8.3). Las membranas se bloquearon durante 1h con PBS 1x Tritón 1% más 5% de leche en polvo descremada en agitación constante a temperatura ambiente. Se incubó con el anticuerpo primario correspondiente: anti-eErbB1 (sc-03, dilución 1:500), anti-MUC4 (sc-20117, dilución 1:500), anti-PCNA (sc-56, dilución 1:500), anti-bcl-2 (sc-490, dilución 1:500), anti-Bax (sc-493, dilución 1:500), anti-ERK (sc-64, dilución 1:500) y anti-p-ERK (sc-7383, dilución 1:500)

(Santa Cruz, CA), durante toda la noche a 4°C. Se realizaron lavados con PBS/Tritón 1% y 1% de leche en polvo descremada y, se incubaron con el anticuerpo secundario HRP anti-mouse o anti-rabbit (dilución 1:1000, Santa Cruz, CA) dependiendo el caso durante 1h. Las bandas se visualizaron por quimioluminiscencia (sc-2048, Santa Cruz, CA).

7.8 Inmunocitoquímica.

Las células se cultivaron en cajas de 8 pozos en el medio de cultivo correspondiente de acuerdo a la **Tabla I** y suplementadas con 10% de suero fetal bovino (SFB, ByProductos, México), antibiótico, antimicótico e incubadas a 37°C con 5% de CO₂ hasta obtener una monocapa con una confluencia del 90%. Se eliminó el medio de cultivo y las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% (500 µl por pozo) a 4°C por 1h. Se realizó la recuperación antigénica con buffer de citratos 0.1 M, pH 6 en ebullición por 15 min. Se bloqueó la actividad de la peroxidasa endógena con H₂O₂ al 3% durante 10 min y se incubó con albúmina (BSA)/PBS 0.1% durante 20 min a temperatura ambiente, realizando lavados con PBS 1x y posteriormente se incubó con el anticuerpo primario anti-MUC4 (sc-20117, dilución 1:100), anti-erbB1 (sc-03, dilución 1:100), anti-bcl-2 (sc-490, dilución 1:100), anti-bax (sc-493, dilución 1:100), anti-ERK (sc-64, dilución 1:500) o anti-p-ERK (sc- 7383, dilución 1:500) (Sta. Cruz,CA) toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Después se realizaron lavados en PBS y se incubó con un anticuerpo secundario biotinilado del sistema multilink (Dako North America, Inc, Carpinteria, CA) durante 30 min a temperatura ambiente, seguido de la incubación de estreptavidina+HRP por 30 min. Se continuó con el revelado con 3'3' diaminobencidina (DAB) (Dako North America, Inc, Carpinteria, CA) y se contratiñeron las muestras con hematoxilina de Harris para después montarlas con resina hidrofóbica Entellan.

8. RESULTADOS

8.1 Descripción de los casos de Carcinoma Oral de Células Escamosas (COCE) en los tres grados de diferenciación histológica.

De los cincuenta y tres casos de Carcinoma Oral de Células Escamosas, 54.7% casos fueron del sexo masculino y 45.2% casos del sexo femenino. El rango de edad fue de 24 a 97 años, con un promedio de 60.6 ± 3.5 años para el sexo masculino y 63.8 ± 3.5 para el sexo femenino. La región anatómica donde se localizó más frecuentemente el carcinoma oral de células escamosas fue la encía con 21 casos (39.6%) y, el sitio menos frecuente fue el triángulo retromolar y el labio, con un caso cada uno (**Tabla II y Figura 8**).

TABLA II. FRECUENCIA DE CASOS POR LOCALIZACIÓN ANATÓMICA DEL CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS	
ZONA	NÚMERO DE CASOS
ENCIA	21
LENGUA Y PISO DE BOCA	19
PALADAR	5
OROFARINGE	3
MUCOSA	2
LABIO	1
OTROS	1
TRIGONO RETROMOLAR	1
TOTAL DE CASOS	53

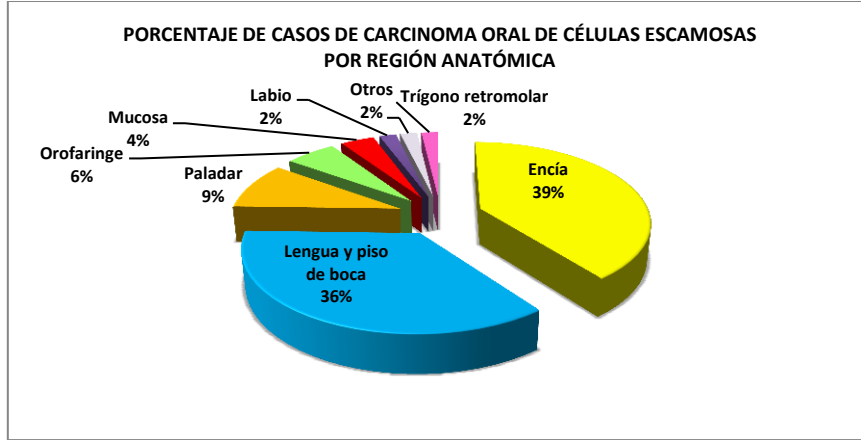
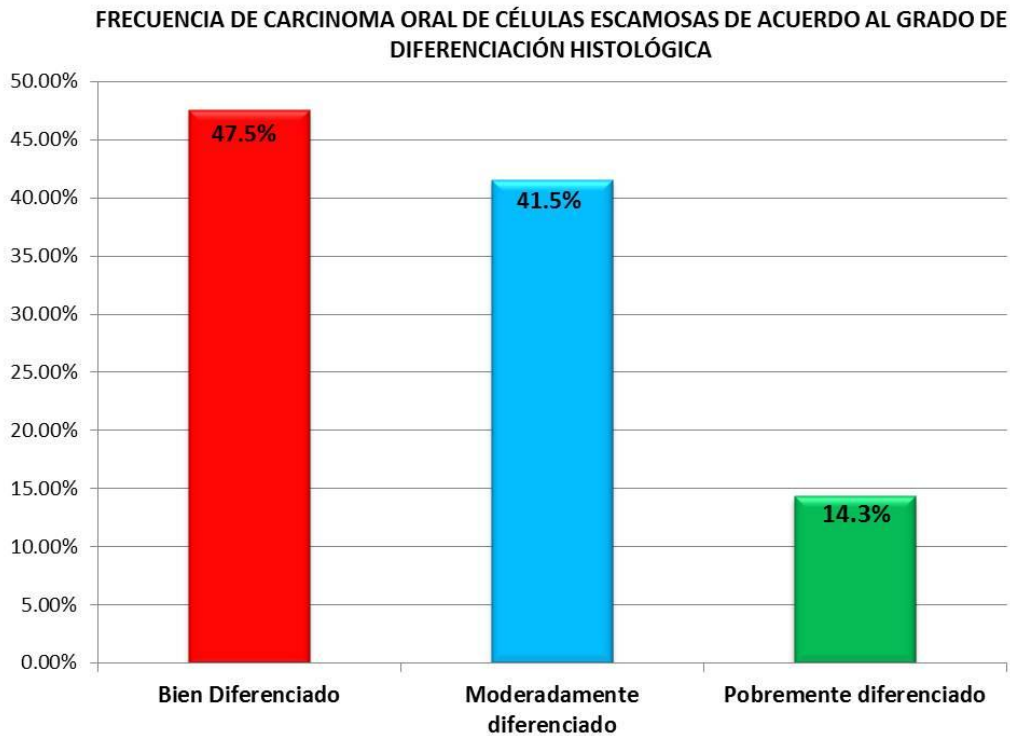


Figura 8.

En la **Figura 9** se agrupan los porcentajes de acuerdo al grado de diferenciación histológica de carcinoma oral de células escamosas. El 47.5% de los casos fueron carcinomas bien diferenciados, 41.5% moderadamente diferenciados y 14.3% pobremente diferenciados.

Figura 9



8.2 Determinación del patrón de expresión de MUC4 y el receptor erbB1 en Carcinoma Oral de Células Escamosas (COCE).

8.2.1 Inmunohistoquímica en muestras de COCE en los tres grados de diferenciación histológica.

Los resultados de inmunohistoquímica para la determinación de la expresión de MUC4 y erbB1 mostraron que ésta dependió del grado de diferenciación celular. Los resultados se describen a continuación.

Prácticamente todas las capas de la mucosa oral normal fueron levemente positivas a **ErbB1**. La capa basal y el estrato espinoso mostraron marca intensa en citoplasma y membrana (**Fig. 10A**). El COCE bien diferenciado mostró células positivas a **erbB1** (membrana y citoplasma) (**Fig. 10B**). El COCE moderadamente diferenciado presentó marca leve y moderada (patrón citoplasmático) (**Fig. 10C**). El COCE pobremente diferenciado mostró marcaje intenso para erbB1 en el citoplasma de numerosas células (**Fig. 10D**).

El patrón de expresión de MUC4 en tejidos fijados fue de leve a moderado en el citoplasma de las células del estrato granular. El estrato espinoso tuvo un marcaje moderado en citoplasma. Algunas células basales fueron levemente positivas (**Fig. 10E**). El tejido conectivo subyacente fue negativo para MUC4. Ningún control negativo mostró marcaje positivo. En los casos de COCE bien diferenciado se observó marcaje citoplasmático uniforme en islas epiteliales y epitelio displásico. En las células periféricas de las islas epiteliales y algunas células individuales invasivas separadas de las islas epiteliales infiltrativas hubo marcaje nuclear moderado (**Fig. 10F**). En los casos de COCE moderadamente diferenciado se observó levemente en el citoplasma de algunas células de las islas epiteliales infiltrativas. El epitelio displásico mostró marcaje leve y homogéneo en citoplasma de todos los estratos epiteliales (**Fig. 10G**). En los casos de COCE pobremente diferenciado se observó marcaje intenso en citoplasma y núcleo de células periféricas y centrales y, algunas células invasivas separadas de las islas epiteliales infiltrantes (**Fig. 10H**). El epitelio displásico mostró marcaje intenso en citoplasma y marcaje moderado en núcleo.

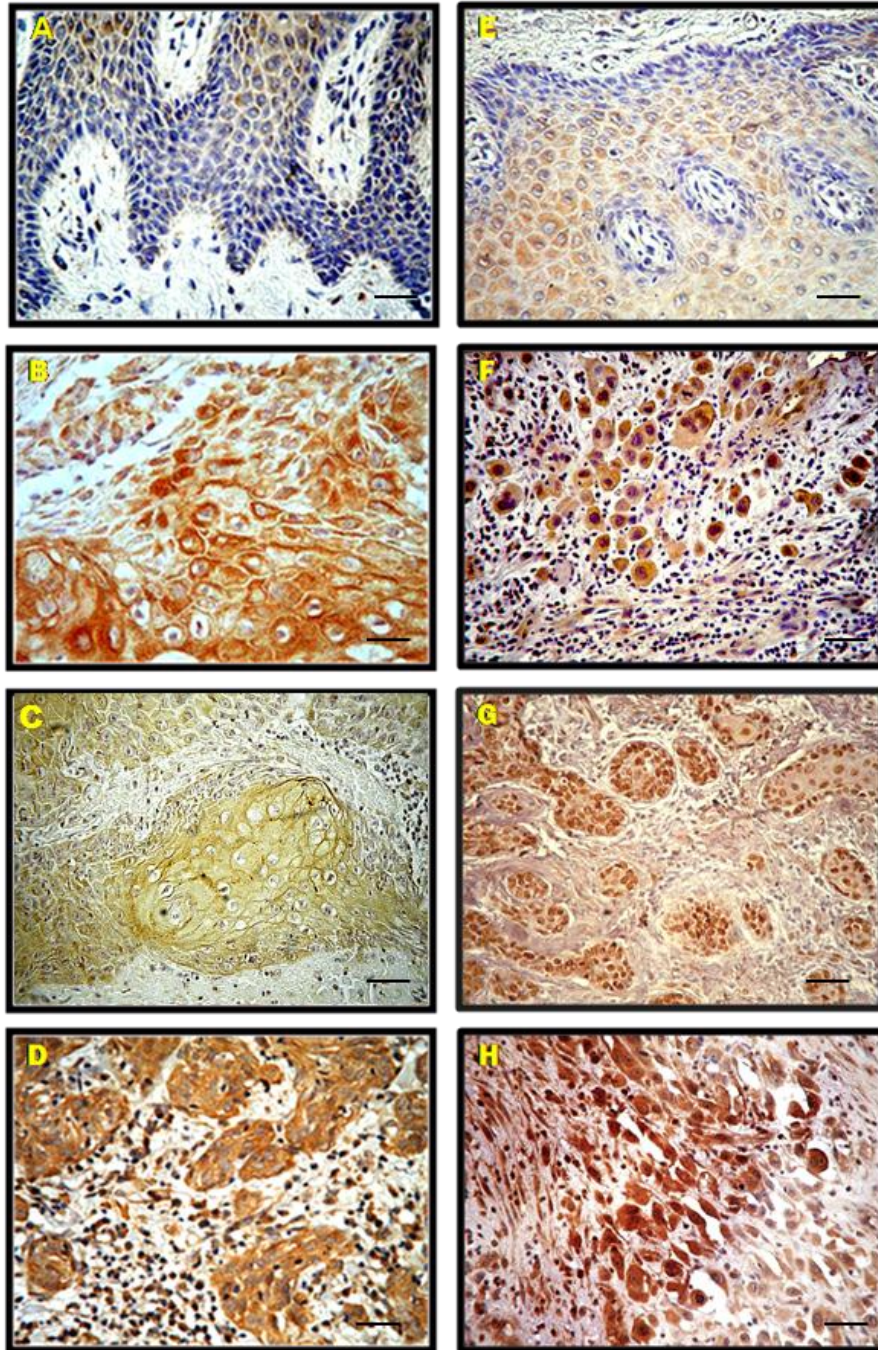


Figura 10. Patrón de expresión de *erbB1* y *MUC4*. *erbB1*: **A. Mucosa Oral:** Marcaje leve y homogéneo en citoplasma de todos los estratos. **B. COCE bien diferenciado:** Membrana y citoplasma positivos. **C. COCE moderadamente diferenciado:** Marcaje leve y moderada en citoplasma. **D. COCE pobremente diferenciado:** Marcaje citoplasmático leve en numerosas células. **MUC4. E. Mucosa Oral:** Marcaje moderado en estrato espinoso. **F. COCE bien diferenciado:** Marcaje nuclear de leve a moderado en algunas células dispersas separadas de las islas epiteliales infiltrativas. **G. COCE moderadamente diferenciado:** Marcaje leve en citoplasma de células en las islas epiteliales infiltrativas. **H. COCE pobremente diferenciado:** Marcaje intenso en citoplasma y núcleo de células no cohesivas (barra=40µm).

8.2.2 Inmunocitoquímica de MUC4 y erbB1 en línea celular Cal-27.

En nuestro estudio se evaluó la expresión y la localización celular de MUC4 y erbB1 en la línea celular Cal-27 mediante inmunocitoquímica, obteniendo los siguientes resultados.

La línea celular Cal-27 expresó ambos marcadores. MUC4 tuvo marcaje principalmente en membrana. La localización de erbB1 se observó predominantemente en membrana y algunas células mostraron marcaje en citoplasma (**Figura 11**).

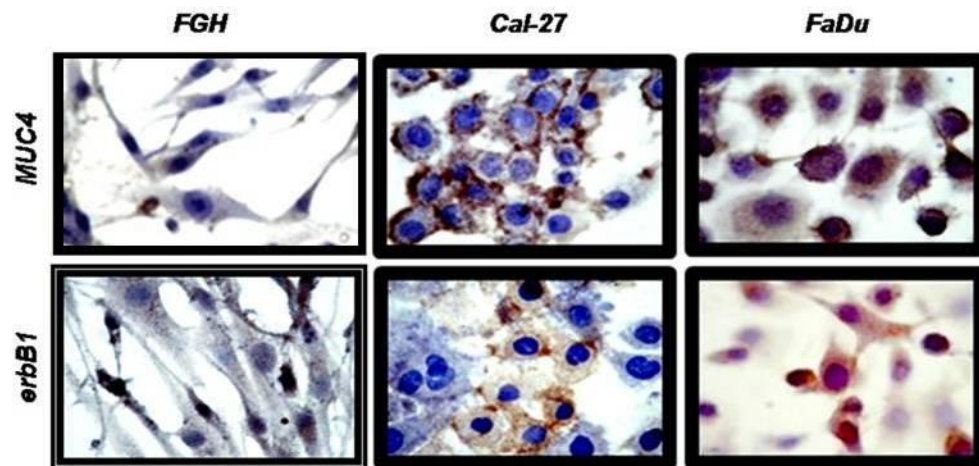


Figura 11. Expresión y localización celular de MUC4 y erbB1 mediante inmunohistoquímica en fibroblastos gingivales humanos (FGH) y las líneas tumorales Cal-27 y FaDu (control positivo de MUC4 y erbB1). **FGH:** Marcaje negativo a MUC4 y erbB1. **Cal-27:** Expresó ambos marcadores, estando MUC4 localizado predominantemente en membrana, mientras que erbB1 se localizó tanto en membrana como en citoplasma. **FaDu:** Expresó MUC4 y erbB1 predominantemente en citoplasma (40x).

8.3 Asociación de MUC4 con el receptor erbB1 en la línea tumoral Cal-27.

Para determinar si las proteínas MUC4 y erbB1 interaccionan entre sí, se realizaron co-inmunoprecipitaciones en lisados celulares de Cal-27 y el control positivo para erbB1, A-431 (carcinoma epidermoide de vulva). Se utilizó el anticuerpo anti-MUC4 y los precipitados fueron corridos en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 8% en condiciones reductoras y transferidos a membranas de nitrocelulosa para realizar el blotting con el anticuerpo anti-erbB1. Los resultados del inmunoblotting demostraron asociación de MUC4/erbB1 en la línea celular Cal-27 (**Figura 12A**).

En experimentos independientes se realizaron Western Blot para MUC4 y erbB1, en lisados de proteínas de la línea celular Cal-27 donde se comprobó nuevamente la expresión de MUC4 en la línea celular Cal-27, no así en fibroblastos gingivales que se incluyeron como control negativo, así como también se comprobó nuevamente la expresión de erbB1 en la línea celular Cal-27 (**Figura 12B**).

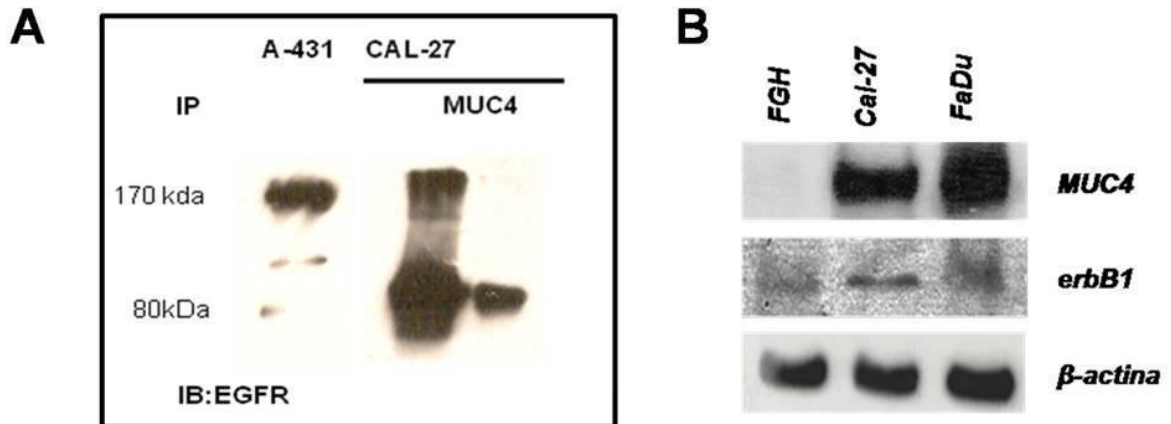


Figura 12. A. Co-inmunoprecipitación de MUC4 y erbB1 en la línea celular Cal-27 que muestra la asociación de MUC4/erbB1. **B.** Mediante WB se confirma la expresión de MUC4 y erbB1 en la línea celular Cal-27.

8.4 Incremento en la expresión de moléculas de proliferación celular en Carcinoma Oral de Células Escamosas (COCE).

8.4.1 Inmunohistoquímica con PCNA (*Proliferation Cell Nuclear Antigen*) en muestras de COCE en los tres grados de diferenciación histológica.

En mucosa oral el marcaje para PCNA fue principalmente citoplasmático y en células suprabasales. En COCE bien y moderadamente diferenciado, la marca fue predominantemente citoplasmática y nuclear, a diferencia del COCE pobremente diferenciado que presentó marca citoplasmática y nuclear intensa, así como algunas células con marcaje en membrana (**Figura 13**).

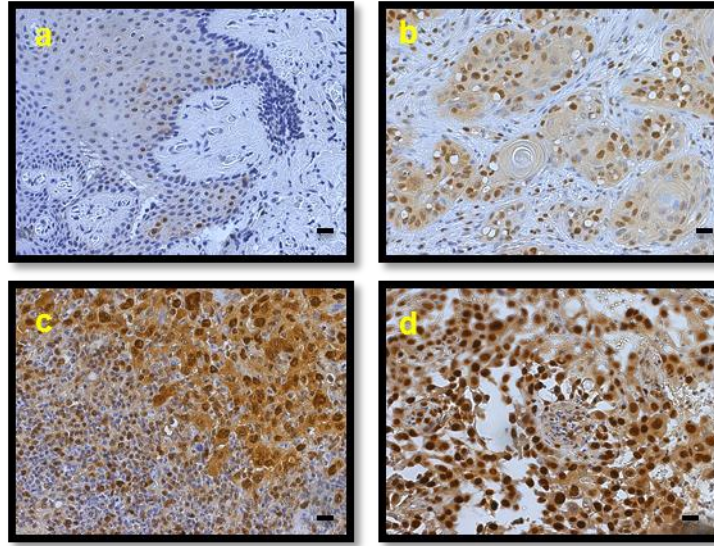


Figura 13. PCNA a. Mucosa oral con marca citoplasmática en células suprabasales. b. **COCE bien diferenciado.** Isla de epitelio queratinizante neoplásico con marca citoplasmática y nuclear. c. **COCE moderadamente diferenciado.** Se observa un manto de células neoplásicas epiteliales con alto pleomorfismo celular y nuclear con marca citoplasmática y nuclear. d. Manto de células neoplásicas no cohesivas con intenso pleomorfismo celular y nuclear con intensa marca citoplasmática y nuclear (20x, barra=1 μ m).

8.4.2 Expresión de moléculas de proliferación celular en la línea celular Cal-27.

Para evaluar la expresión de moléculas de proliferación se utilizaron las técnicas de inmunocitoquímica y Western blot. Mediante inmunocitoquímica se evaluaron las moléculas ERK2 y p-ERK, mientras que mediante Western Blot se evaluaron PCNA, ERK2 y p-ERK (**Figura 14**). ERK2 se expresó principalmente en citoplasma, sin embargo se observaron células con marca nuclear intensa. Este patrón fue constante en la línea tumoral Cal-27 y en fibroblastos gingivales. La expresión de p-ERK en fibroblastos gingivales fue menor en comparación con lo observado en la línea tumoral Cal-27. Su localización fue principalmente en citoplasma y en algunas células se muestra una marca nuclear. (**Figura 14A**). Los resultados de Western blot coincidieron con los resultados obtenidos mediante inmunocitoquímica, donde el patrón de expresión de ERK fue similar tanto en Cal-27 y en fibroblastos gingivales. Destaca la expresión mayor de p-ERK en la línea celular FaDu (control negativo de MUC4) en relación a Cal-27 y los fibroblastos gingivales. (**Figura 14B**). Los resultados de la evaluación por Western blot de PCNA, revelan una expresión mayor en Cal-27 y FaDu en comparación con los fibroblastos gingivales (**Figura 14B**).

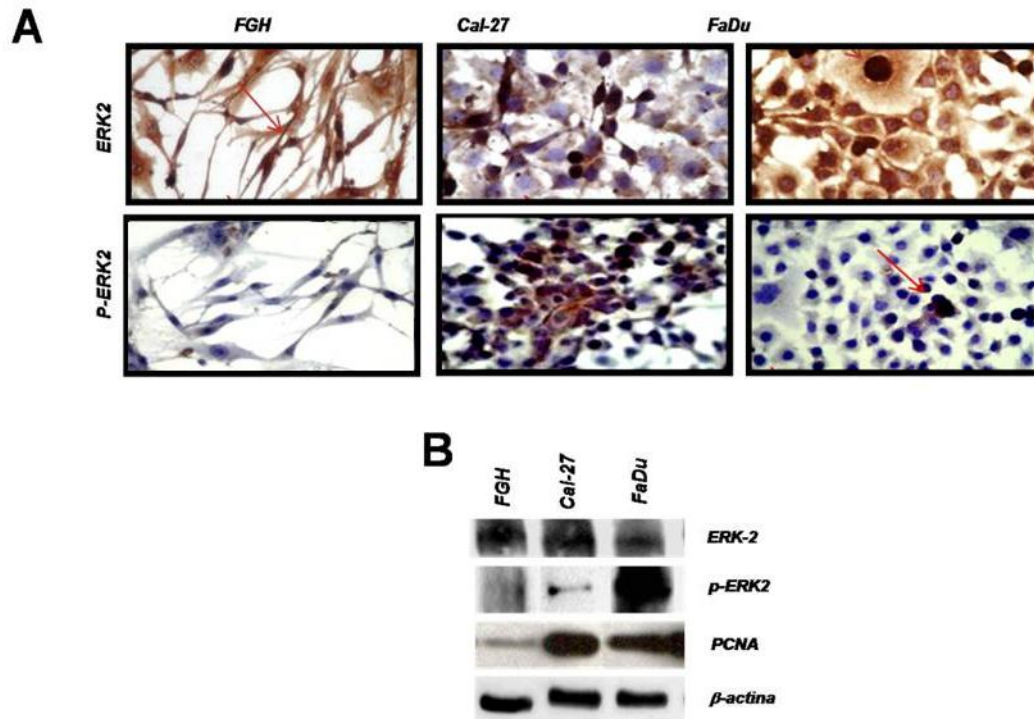


Figura 14. A. Se muestra la expresión y localización de ERK2 y p-ERK2 mediante inmunocitoquímica en fibroblastos gingivales humanos (FGH) y Cal-27. La expresión de ERK fue muy similar en FGH y Cal-27, sin embargo, pERK en Cal-27 presentó una marca más intensa con localización citoplasmática y nuclear en comparación con FGH (40X). **B.** Mediante WB se comprueba la expresión similar de ERK2 en FGH y Cal-27. La expresión de PCNA es elevada en comparación con FGH.

8.5 Expresión de moléculas de sobrevivencia y muerte celular en Carcinoma Oral de Células Escamosas (COCE).

8.5.1 Inmunohistoquímica con Bax y Bcl-2 en muestras de COCE en los tres grados de diferenciación histológica.

Se evaluaron dos moléculas que participan en procesos de apoptosis: Bax y Bcl-2 mediante la técnica de inmunohistoquímica en tejido fijado. En mucosa sana se observó que Bcl-2 se expresa de forma moderada en citoplasma de células del estrato granuloso y, algunas células mostraron marcaje positivo en membrana. En el estrato espinoso la marca citoplasmática fue moderada, mientras que las células del estrato basal se observaron con marca citoplasmática intensa **Figura 15(a)**. En los casos de carcinoma bien diferenciados, el epitelio displásico superficial presenta marca citoplasmática homogénea de leve a moderada con algunas células cercanas a perlas de queratina con marca membranal moderada. En las islas epiteliales infiltrantes la marca fue de moderada a intensa en células centrales queratinizantes. En las células aisladas la marca fue de moderada a intensa en citoplasma situado alrededor del

núcleo. Solamente un caso mostró marca de moderada a intensa en citoplasma de células cercanas a vasos sanguíneos **Figura 15(b)**. En los casos moderadamente diferenciados el epitelio displásico superficial mostró marca citoplasmática homogénea de leve a moderada con algunas células de marca membranal moderada no homogénea. En las islas epiteliales infiltrantes la marca fue de moderada a intensa en citoplasma. El marcaje fue intenso alrededor del núcleo de células que separadas tanto de la porción basal del epitelio displásico de cubierta como de las islas epiteliales infiltrantes **Figura 15(c)**. En los casos pobremente diferenciados la marca fue de moderada a intensa en citoplasma de células del epitelio displásico superficial así como en islas y mantos infiltrantes de epitelio neoplásico. Se observó marca citoplasmática intensa en células (neoplásicas) con núcleo picnótico de las islas epiteliales próximas al infiltrado inflamatorio **Figura 15(d)**.

En mucosa oral sana, la expresión de Bax por inmunohistoquímica fue de moderada a intensa no homogénea en citoplasma de células del estrato granuloso, mientras que en el estrato espinoso la marca fue moderada en citoplasma. El estrato basal mostró marca de leve a moderada en citoplasma, particularmente hacia un costado del núcleo **Figura 15(e)**. En los casos de COCE bien diferenciados, el epitelio displásico de cubierta mostró marcaje en citoplasma de células del estrato espinoso de leve a moderado no homogéneo, sin distinguirse el estrato granuloso ni basal. La marca se observó intensa en citoplasma de células adyacentes a perlas de queratina. En las islas epiteliales que infiltran el tejido conjuntivo la marca fue leve en citoplasma, particularmente a un lado del núcleo. Algunas células del centro de las islas epiteliales mostraron marca membranal leve. Las células acantolíticas infiltrantes tuvieron marca citoplasmática leve no homogénea especialmente en planos más profundos. Se observó marca intensa en citoplasma de células neoplásicas de islas epiteliales adyacentes a la pared de los vasos sanguíneos **Figura 15(f)**. En los casos de COCE moderadamente diferenciados, el epitelio displásico superficial mostró marca homogénea de leve a moderada en citoplasma de algunas células. Solo en algunos casos ésta fue intensa en citoplasma. En las islas epiteliales infiltrantes la marca fue leve no homogénea en citoplasma, con marca intensa en células adyacentes a perlas de queratina. En los campos de epitelio neoplásico donde se observaron abundantes mitosis, las células aisladas pleomórficas con núcleos prominentes presentaron marca intensa en citoplasma. En citoplasma de células neoplásicas cercanas a la pared de los vasos sanguíneos, la marca fue de moderada a intensa **Figura 15(g)**. En los casos de COCE pobremente diferenciados, la marca fue de leve a moderada no homogénea en citoplasma de células del estrato granuloso, mientras que en el estrato espinoso la marca fue de leve a moderada no homogénea en citoplasma, con algunas células cercanas a la capa basal con

marca intensa. Las células del estrato basal mostraron marcaje leve y homogéneo en citoplasma. En las islas epiteliales que infiltran el tejido conjuntivo la marca fue leve en citoplasma. En estratos profundos se observaron células pleomórficas con marca citoplasmática de leve a moderada, particularmente en las áreas cercanas al músculo estriado y a la pared de los vasos sanguíneos **Figura 15(h)**.

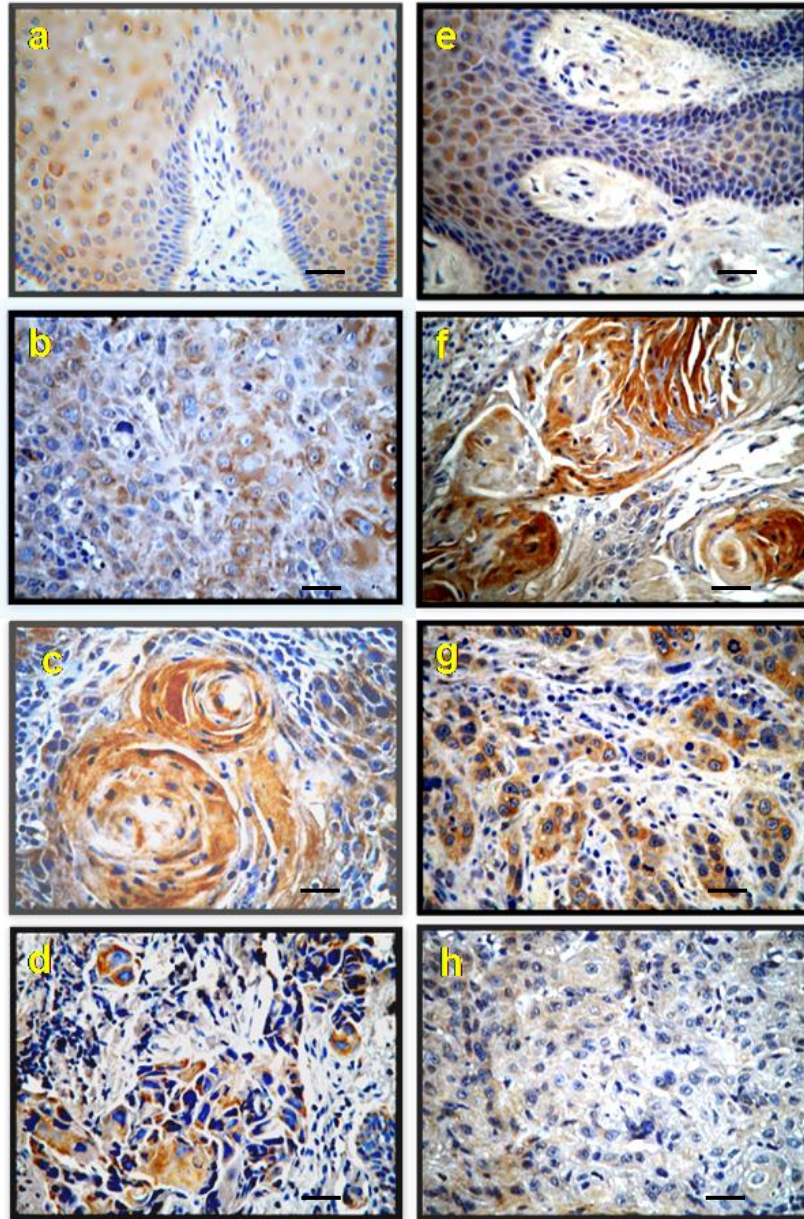


Figura 15. Expresión de Bcl-2. **a.** Mucosa oral sana. Epitelio escamoso estratificado de aspecto normal, marca citoplasmática en células basales y citoplasma del estrato espinoso. **b.** COCE BD. Manto de células epiteliales pleomórficas con nucléolo evidente, marca citoplasmática. **c.** COCE MD Islas de epitelio neoplásico queratinizante, núcleos picnóticos con marca intensa en citoplasma. **d.** COCE PD. Islas de células epiteliales con marcado pleomorfismo celular y nuclear, escaso citoplasma con marca citoplasmática intensa. **Expresión de Bax.** **e.** Mucosa oral sana. Se observa estrato espinoso soportado con tejido conjuntivo. **f.** COCE BD. Islas de epitelio neoplásico queratinizante, núcleos picnóticos con marca intensa en citoplasma. **g.** COCE MD Nidos de células con nucléolos evidentes con marca citoplasmática y membranal nuclear. **h.** Manto de células neoplásicas con pleomorfismo marcado y numerosas mitosis con marcaje en citoplasma (40x, barra=4µm).

8.5.2 Expresión de moléculas de sobrevivencia y muerte celular en la línea celular Cal-27.

Para evaluar la expresión de moléculas de sobrevivencia y muerte celular se utilizaron las técnicas de inmunocitoquímica y Western blot. Mediante inmunocitoquímica se evaluaron las moléculas Bcl-2 y Bax en las líneas tumorales Cal-27 y FaDu. El análisis inmunocitoquímico de Bcl-2 demostró un gran número de células positivas, se observó una marca citoplasmática uniforme con algunas células con marca nuclear, la marca fue más intensa en la línea control FaDu en comparación con la línea Cal-27. Bax tuvo una localización citoplasmática de aspecto granular y con algunas células con marca nuclear y otras con marca alrededor del núcleo (**Figura 16 A**). Mediante Western blot se evaluaron la expresión de Bax y Bcl-2 en lisados de fibroblastos gingivales humanos (FGH) y de las líneas tumorales Cal-27 y FaDu. El análisis de Western blot como se observa en la **Figura 16 B** muestra incremento en la expresión de Bcl-2 en la línea Cal-27 en comparación con el control positivo FaDu. Mientras tanto, la expresión de Bax fue menor en Cal-27 en comparación con el grupo control.

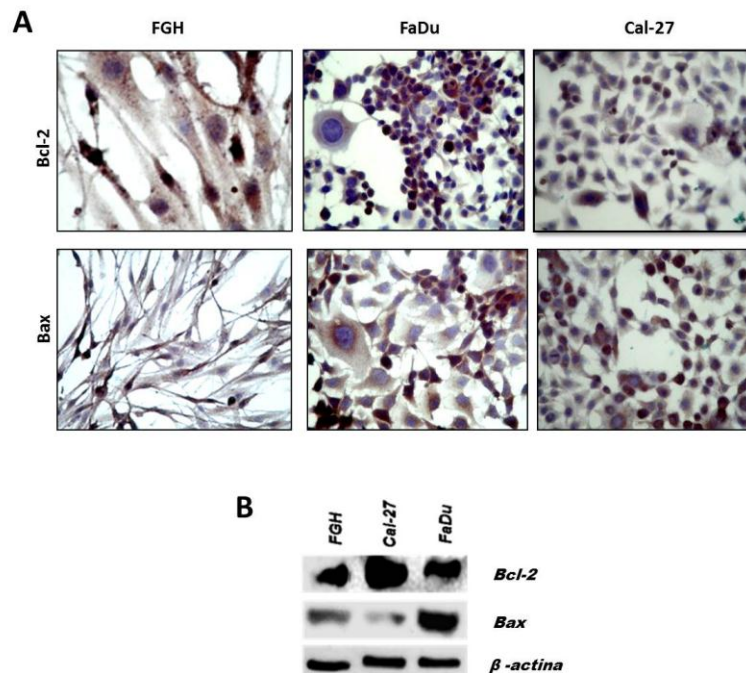


Figura 16. A. Se muestra la localización y expresión de Bcl-2 y Bax mediante inmunocitoquímica en las líneas tumorales Cal-27 y FaDu. Células positivas para Bcl-2 y Bax con marca citoplasmática y nuclear intensa, destaca la marca de Bax alrededor del núcleo (40x). **B) Análisis WB** La línea tumoral Cal-27 muestra un incremento en la expresión de Bcl-2 en comparación con los grupos control. En cuanto a la expresión de Bax en la línea Cal-27 se encuentra disminuida en comparación a los grupos control.

9. DISCUSIÓN.

En el presente estudio se evaluó la asociación de MUC4, un marcador importante de transformación maligna y progresión tumoral, y erbB1 primer receptor que ha sido implicado de manera directa en el desarrollo de diversos carcinomas (Croce, 2008; Roepstorff *et al.*, 2008). La sobreexpresión del receptor erbB1 se ha correlacionado con mal pronóstico en cáncer de cabeza y cuello (Williams, 2000). Asimismo, la expresión anormal de MUC4 ha sido reportada en diversos carcinomas (Davidson *et al.*, 2007; Karg *et al.*, 2006; Saitou *et al.*, 2005).

El análisis de 53 casos de COCE mostró que la expresión de erbB1 se relaciona con el grado de diferenciación histológica, dado que el nivel de inmunoexpresión de este receptor disminuía conforme los carcinomas perdían diferenciación. Asimismo, se modificó el sitio de expresión, es decir que en los casos de Carcinoma Oral de Células Escamosas (COCE) bien diferenciados la expresión predominó en membrana plasmática, pero disminuía a medida que incrementaba su localización en citoplasma en los casos de COCE pobremente diferenciado. Esto concuerda con los datos presentados por Hiraishi *et al.*, 2006 y Maiorano *et al.*, 1998, quienes mostraron que el grado y sitio de expresión de erbB1 en COCE pobremente diferenciado presentaba modificaciones. La función principal de erbB1 es inducir la activación de cinasas citoplasmáticas a través de la transducción de señales que comienzan a nivel de la membrana cuando se produce el reconocimiento ligando-receptor (Yarden *et al.*, 2001). Los cambios en el grado y sitio de expresión pueden ser debidos a la transformación maligna de los COCE. Lin *et al.*, 2001 y Hanada *et al.*, 2002 demostraron que el receptor erbB1 puede traslocar de la membrana plasmática hacia el núcleo funcionando como un factor transcripcional de ciclina D y Myb-B promoviendo la transformación neoplásica.

Se sabe que MUC4 se expresa en varios tejidos epiteliales adultos y en células poco diferenciadas de embriones y fetos (Gendler *et al.*, 1995; Moniaux *et al.*, 2004). Los resultados obtenidos en nuestro estudio, muestran que la mucosa oral sana expresó MUC4 predominantemente en el citoplasma de células del estrato granular y espinoso, con algunas células basales positivas. Estos datos concuerdan con los obtenidos por Idris *et al.*, 1999 y Price-Shiavi *et al.*, 1998, que mostraron que la expresión de MUC4 está asociada con células bien diferenciadas, es decir que la expresión de MUC4 es mayor en células no proliferantes de capas superficiales del epitelio, en comparación a la expresión de células de la capa basal.

En cuanto a la expresión de MUC4 en COCE, encontramos una correlación significativa entre la expresión de MUC4 y el grado de diferenciación, observado una alta expresión de MUC4 en

COCE pobremente diferenciado. Estos resultados concuerdan con estudios en diferentes carcinomas, los cuales muestran que la expresión de MUC4 tiene una fuerte asociación con el patrón de citodiferenciación, y a menudo esta expresión es semejante a la expresión durante el desarrollo embrionario (Burchell, 2001). Por tanto, la expresión de MUC4 en COCE puede ser un indicador de diferenciación de células tumorales o bien un marcador y mediador de crecimiento tumoral y de progresión.

Jepson *et al.*, 2002 consideran a la mucina MUC4 como un marcador de epitelio bien diferenciado, la cual es sobreexpresada en líneas tumorales bien diferenciadas de ovario y páncreas (Giuntoli *et al.*, 1998), y no es expresada en líneas celulares pobremente diferenciadas (Jonckeere *et al.*, 2004). Esto contrasta con nuestros resultados, en donde la inmunocitoquímica demostró la expresión de MUC4 en la línea celular Cal-27, que corresponde a un carcinoma pobremente diferenciado. Mediante inmunoprecipitación se evidenció la interacción de MUC4/erbB1 que hasta el momento no había sido reportada en ningún tipo de carcinoma, no obstante que la expresión de ambas moléculas ya ha sido evaluada de forma independiente en carcinomas de cabeza y cuello (Kappler *et al.*, 2000). Normalmente, las células epiteliales tienen una morfología polarizada lo que permite que las moléculas de membrana tengan ubicaciones específicas entre las regiones apical, basal y lateral. La mucina MUC4 siempre que está presente en las células normales tiene una localización apical, mientras que erbB1 se encuentra ubicado preferentemente en membrana basolateral (Kufe, 2009). En presencia de inflamación y otros parámetros que inducen daño, hay pérdida de la integridad de las uniones estrechas y por lo tanto de la polaridad celular. A su vez, las mucinas de membrana se reposicionan alrededor de toda la membrana e interactúan con los receptores erbB, lo que permite a las células epiteliales activar programas de reparación o de sobrevivencia. Si la respuesta al estrés es reversible, la polaridad se restablece después de la reparación, sin embargo, en células transformadas esto no sucede. Bajo estas condiciones, la mucina MUC4 podría constitutivamente interactuar con el receptor erbB1 promoviendo señales que activen vías de proliferación y supervivencia en las células cancerosas (Vermeer *et al.*, 2003).

La principal vía de señalización de erbB1 es la vía de las MAPK (*Mitogen-activated protein kinases*, o proteína cinasas activadas por mitógenos) (Klapper *et al.*, 2000). La activación de Ras inicia una cascada de fosforilación de múltiples pasos, que conduce a la activación de las MAPK. Las MAPKs extracelulares ERK tipo 1 y 2 son las mejor caracterizadas y tienen una mayor asociación con el cáncer humano. ERK se activa por fosforilación en sus residuos de

tirosina y treonina y, posteriormente regula la transcripción celular. Su activación ha sido vinculada a la proliferación, supervivencia y transformación neoplásica (Lewis *et al.*, 1998). En nuestros resultados, el análisis de ERK en la línea tumoral Cal-27 no mostró diferencia en la expresión comparada con los fibroblastos gingivales humanos. Por el contrario, la expresión de p-ERK en Cal-27 fue mayor, lo que sugiere que aunque ERK es una molécula expresada de manera constitutiva en todas las células, su activación se presenta en mayor proporción en células transformadas.

PCNA (*Proliferation Cell Nuclear Antigen*) es una proteína nuclear no histona que funciona como accesoria de la ADN polimerasa δ y está relacionada con la síntesis de ADN y la proliferación celular. La proteína se detecta en la fase G1 tardía del ciclo celular, inmediatamente antes del comienzo de la fase S, donde se encuentra su máximo valor, declinando durante G2 y M (Bravo *et al.*, 1987). Las células PCNA positivas son frecuentemente correlacionadas con el curso clínico de los carcinomas. Al igual que los resultados de Sarafoleanu *et al.*, 2009 se encontró una asociación entre la expresión de PCNA y el grado de diferenciación histológica, siendo menor la expresión de PCNA en carcinomas bien diferenciados e incrementándose en función a la pérdida de diferenciación histológica. Los resultados *in vitro* mostraron mayor expresión en Cal-27 y menor en fibroblastos gingivales humanos.

En condiciones fisiológicas, el balance entre proliferación y muerte celular en un tejido está perfectamente controlado, de modo que se permita el correcto recambio celular. Este equilibrio puede verse alterado por necesidades del propio tejido, pero siempre bajo un estricto control. Así mismo, la diferenciación celular también está controlada de forma rigurosa y, en general, acoplada de forma inversa al grado de proliferación. En el cáncer se altera toda esta regulación produciéndose una proliferación continua que suele ir acompañada de pérdida en grado diverso, de la capacidad de diferenciación y de una resistencia variable a la muerte celular programada (Cory y Adams, 2002).

Experimentos con microarreglos en tumores humanos metastásicos, sugieren que la progresión tumoral se correlaciona con la pérdida de función de genes proapoptóticos como *BAX*, *p53* y la proteína cinasa asociada a muerte, *DAPK* o el aumento en la expresión de genes anti-apoptóticos como *bcl-2* o *NF κ B* (factor nuclear kappa) (Inbal *et al.*, 1997; Um *et al.*, 2004). De hecho se piensa que la resistencia a la apoptosis es una de las ventajas requeridas por la célula tumoral para poder llevar a cabo la formación de un tumor (Hanahan y Weinberg, 2000). La adquisición de la resistencia es importante tanto para el desarrollo del tumor primario como para

las etapas posteriores del crecimiento tumoral, es decir, la metástasis (Mehlen y Puisieux, 2006).

Diversos estudios han informado sobre la expresión aberrante de Bcl-2 en cáncer oral. En nuestros resultados, la expresión de Bcl-2, se encontró una relación significativa entre la expresión de Bcl-2 y el grado de diferenciación, al observar una alta expresión de Bcl-2 en COCE pobremente diferenciado. Estos resultados concuerdan con datos de *Suri, 2009* que muestran que la expresión de Bcl-2 tiene una fuerte asociación con el patrón de diferenciación. En mucosa oral sana, Bcl-2 limitó su expresión al estrato basal, mientras en estratos superficiales aumentó la expresión de moléculas proapoptóticas como Bax. Lo anterior sugiere que Bcl-2 está implicado en la preservación de células con alta capacidad proliferante, disminuyendo su expresión en estratos superiores. En nuestros resultados Bcl-2 se encuentra expresado en estratos superficiales, sugiriendo una alteración en el patrón de expresión que podría proporcionar una ventaja de sobrevivencia a las células tumorales (Qi-Long *et al.*, 1996). En cuanto a la expresión de Bax en COCE, encontramos una disminución en la expresión conforme el carcinoma pierde diferenciación, observándose baja expresión de Bax en COCE pobremente diferenciado. Nuestros resultados concuerdan con los datos obtenidos por Guan *et al.*, 1997, quienes mostraron que hay una mayor expresión de Bax en estadios tempranos de COCE, y la expresión se disminuía conforme las células perdían diferenciación.

En los resultados obtenidos en la línea celular Cal-27 hubo diferencias en la expresión de Bax y Bcl-2. Se encontró una expresión mayor del marcador anti-apoptótico Bcl-2 y una disminución en la expresión del marcador pro-apoptótico Bax.

Los resultados mostrados en el presente estudio, proporcionan información acerca de la participación simultánea de dos moléculas importantes en el curso biológico de los carcinomas: erbB1 y MUC4. Específicamente, el presente estudio ha establecido la asociación entre MUC4 y erbB1 en el Carcinoma Oral de Células Escamosas, la cual no había sido reportada anteriormente en carcinomas de cabeza y cuello.

10. CONCLUSIONES

- Se estableció la relación entre la expresión de MUC4 y erbB1 en muestras de Carcinomas Oral de Células Escamosas y el grado de diferenciación tumoral.
- Se estableció la asociación de la mucina MUC4 y el receptor erbB1 en Carcinomas Oral de Células Escamosas *in vitro*.
- Se estableció la relación entre la expresión de los marcadores de proliferación celular y ERK en Carcinomas Oral de Células Escamosas y el grado de diferenciación tumoral.
- Se estableció la relación entre la expresión de los marcadores de apoptosis Bcl-2 y Bax en muestras de Carcinomas Oral de Células Escamosas y el grado de diferenciación tumoral.

11. PERSPECTIVAS DE INVESTIGACIÓN

- Se propone la realización de estudios que consideren la utilización de líneas celulares procedentes de cultivos primarios, cuyo patrón represente los tres grados de diferenciación histológica y, evalúen simultáneamente el grado de expresión de los receptores erbB y MUC4, así como su participación en vías de señalización de proliferación y muerte celular.
- Se propone la realización de ensayos de inhibición farmacológica y silenciamiento mensajeros y/o genes, que permitan evaluar directamente los efectos en el balance proliferación/muerte celular, así como el papel en la migración e invasión tumoral.

Agradecimientos

Al C.D y E.P.B. Alejandro Macario Hernandez por su apoyo en el análisis histopatológico y a la Mtra. Cristina Trejo Solis (Laboratorio de Neuroinmunología, Instituto Nacional de Neurología, SSA) por su asesoría en las técnicas de biología molecular realizadas en el estudio. Este trabajo fue parcialmente apoyado por los proyectos DGAPA-PAPIIT 217912 y SEP-CONACyT 167474.

12. REFERENCIAS

- Adam JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; 281: 1322-1326.
- Andrianifahanana M, Agrawal A, Singh AP, Moniaux N, Van SI, Aubert JP, Meza J, Batra SK. Synergistic induction of the MUC4 mucin gene by interferon-gamma and retinoic acid in human pancreatic tumour cells involves a reprogramming of signalling pathways. *Oncogene* 2005;24: 6143– 6154.
- Arango M, Li P, Komatsu M, Montes C, Carraway C, Carraway K. Production and localization of Muc4/sialomucin complex and its receptor tyrosine kinase ErbB2 in the rat lacrimal gland. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42: 2749–2756.
- Bafna S, Kaur S, Batra SK. Membrane-bound mucins: the mechanistic basis for alterations in the growth and survival of cancer cells. *Oncogene* 2010; 29: 2893-2904.
- Barnes L, Evenson JW, Rihad D, Sidransky D. Pathology and genetic of head and neck tumors. WHO 2005. Chapter 4. Tumors of the oral cavity and oropharynx; 168-175.
- Batra S, Castelino-Prabhu S, Wikstrand C, Zhu X, Humphrey P, Friedman H, Bigner D. Epidermal growth factor ligand independent, unregulated, cell-transforming potential of a naturally occurring human mutant EGFRvIII gene. *Cell Growth Differ* 1995;6:1251-1259.
- Bei R, Budillon A, Masuelli L, Cereda V, Vitolo D, Di Gennero E. Frequent overexpression of multiple ErbB receptors by head and neck squamous cell carcinoma contrasts with rare antibody immunity in patients. *J Pathol* 2004; 204:317-25.
- Bei R, Pompa G, Vitolo d; Moriconi E, Ciocci L, Quaranta M. Co-localization of multiple ErbB receptors in stratified epithelium of oral squamous cell carcinoma. *J Pathol* 2001; 195: 343-348.
- Bravo R, Frank R, Blundell PA, McDonald-Bravo H. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of AND polymerasa-delta. *Nature* 1987; 326: 515-515.
- Buisine MP, Devisme L, Degand P, Dieu MC, Gosselin B, Copin MC, Aubert, JP, Porchet N. Developmental mucin gene expression in the gastroduodenal tract and accessory digestive

- glands. II. Duodenum and liver, gallbladder, and pancreas. *J Histochem Cytochem* 2000; 48: 1667–1676
- Burchell J. O-linked Glycosylation in the mammary gland: changes that occur during malignancy. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2001; 6:355–364.
- Carpenter G, King L, Cohen. Epidermal growth factor stimulates phosphorylation in membrane preparations in vitro. *Nature* 1978; 276: 409-410.
- Carpenter G, Lembach K, Morrison M, Cohen S. Characterization of the binding of 125-I-labeled epidermal growth factor to human fibroblasts. *J Biol Chem* 1975; 250: 4297-4304.
- Carraway KL, Rossi EA, Komatsu M, Price-Schiavi A, Huang D, Guy PM, Carvajal ME, Freigien N. An intramembrane modulator of ErbB receptor tyrosine kinase that potentiates neuregulin signaling. *J Biol Chem* 1999; 274: 5263-5266.
- Carraway KL, Perez A, Idris N, Jepson S, Arango M, Komatsu M. Muc4/sialomucin complex, the intramembrane ErbB2 ligand, in cancer and epithelia: to protect and to survive. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2002; 71:149–185.
- Chaturvedi P, Singh A, Batra KB. Structure, evolution, and biology of the MUC4 mucin. *The FASEB* 2008; 22: 966-981.
- Chaturvedi P, Singh A, Chakraborty S, Chauhan SC, Bafna S, Meza JL. MUC4 mucin interacts with and stabilizes the HER2 oncoprotein in human pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 2008b; 68: 2065–2070.
- Chaturvedi P, Singh AP, Moniaux N, Senapati S, Chakraborty S, Meza JL, et al. MUC4 mucin potentiates pancreatic tumor cell proliferation, survival, and invasive properties and interferes with its interaction to extracellular matrix proteins. *Mol Cancer Res* 2007; 5:309–320.
- Choudhury A, Singh RK, Moniaux N, El-Metwally TH, Aubert JP, Batra SK. Retinoic acid dependent transforming growth factor-beta2-mediated induction of MUC4 mucin expression in human pancreatic tumor cells follows retinoic acid receptor-alpha signaling pathway *J Biol Chem* 2000; 275: 33929– 33936.
- Ciccarelli FD, Doerks T, Bork P. AMOP, a protein module alternatively spliced in cancer cells. *Trends Biochem Sci* 2002; 27: 113- 115.

- Citri A, Skaria KB, Yarden Y. The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3. *Exp Cell Res* 2003; 284:54-65.
- Citri A, Yarden Y. EGF-ERBB signaling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7: 505-516.
- Cohen S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new born animal. *J Biol Chem* 1962; 237: 1555-1562.
- Cohen S. The stimulation of epidermal proliferation by a specific protein (EGF). *Dev Biol* 1965; 12: 394-407.
- Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 647-656.
- Croce CM. Oncogenes and cancer. *N Engl J Med* 2008; 358: 502-511.
- Davidson B, Baekelandt M, Shih I. MUC4 is upregulated in ovarian carcinoma effusions and differentiates carcinoma cells from mesothelial cells. *Diagn Cytopathol* 2007; 35:756-760.
- Di Fiore PP, Pierce JH, Kraus MH, Segatto O, King CR, Aaronson SA. erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells. *Science* 1987; 237:178-182.
- Downward J, Yarden Y, Mayes E, Scrace G, Totty N, Stockwell P, Ullrich A, Schlessinger J, Waterfield M. Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature* 1984; 307:521-527.
- Duraisamy S, Ramasamy S, Kharbanda S, Kufe D. Distinct evolution of the human carcinoma-associated transmembrane mucins, MUC1, MUC4 and MUC16. *Gene* 2006; 373: 28-34.
- Fowler J, Vinall L, Swallow D. Polymorphism of the human muc genes. *Front Biosci* 2001; 6: D1207- D1215.
- Fregien N, Carraway CA, Carraway KL. An intramembrana modulator of the ErbB2 receptor tyrosine kinase that potentiates neuregulin signaling. *J Biol Chem* 1999; 274, 5263–5266.
- Freire T, Bay S, Mensdorff-Pouilly S, Osinaga E. Molecular basis of incomplete O-glycan synthesis in MCF-7 breast cancer cells: Putative role of MUC6 in Tn antigen expression. *Adv Cancer Res* 2005; 65:7880-87.

- Garcia de Palazzo I, Adams G, Sundareshan P, Wong A, Testa J, Bigner D, Weiner M. Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-small cell lung carcinomas. *Cancer Res* 1993; 53:3217-3220.
- Ge H, Gong X, Tang C. Evidence of high incidence of EGFRvIII expression and coexpression with EGFR in human invasive breast cancer by laser capture microdissection and immunohistochemical analysis. *Int J Cancer* 2002. 98:357-361.
- Gendler S, Spicer P. Epithelial mucin genes. *Annu Rev Physiol* 1995;57:607–634.
- Gioanni J, Fischel JL, Lambert JC, Demard F, Mazeau C, Zanghellini E, et al. Two new human tumor cell lines derived from squamous cell carcinomas of the tongue: establishment, characterization and response to cytotoxic treatment. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1988; 24:1445–55.
- Gipson IK. Distribution of mucins at the ocular surface. *Exp. Eye Res* 2004; 78: 379–388.
- Giuntoli RL, Rodriguez GC, Whitaker RS, Dodge R, Voynow JA. Mucin gene expression in ovarian cancers. *Cancer Res* 1998; 58:5546-5550.
- Guan W, Gao, Y. Expression of apoptosis related protein in epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 1997; 33: 419-425.
- Hanada N, Lo HW, Day CP, Pan Y, Nakajima Y, Hung MC. Co- regulation of B-Myb expression by E2F1 and EGF receptor. *Mol Carcinog* 2006; 45: 10-7.
- Hanahan D, Weinberg R. The Hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.
- Hatrupp C, Gendler J. Structure and function of the cell surface (Tethered) mucins. *Annu Rev Physiol* 2008; 70:431-457.
- Hiraishi Y, Wada T, Nakatani K, Negoro K, Fujita S. Immunohistochemical expression of EGFR and p-EGFR in oral squamous cell carcinomas. *Pathol Oncol Res* 2006; 12: 87-91.
- Holbro T, Hynes NE. ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004;44: 195–217.
- Hollingsworth M, Swanson B. Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nat Rev Cancer* 2004; 4:45-60.

- Hu YP, Haq B, Carraway KL, Savaraj N, Lampidis TJ. Multidrug resistance correlates with overexpression of Muc4 but inversely with P-glycoprotein and multidrug resistance related protein in transfected human melanoma cells. *Biochem Pharmacol* 2003; 65:1419–1425.
- Huang H, Nagane M, Klingbeil K, Lin H, Nishikawa R, Ji X, Huang C, Gill N, Wiley S, Cavenee W. The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling. *J Biol Chem* 1997; 272 :2927-2935.
- Hynes E, Lane H. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 341-354.
- Idris N, Carraway KL. Sialomucin complex (Muc4) expression in the rat female reproductive tract. *Biol Reprod* 1999; 61:1431–1438.
- Inbal, B, Cohen S, Polak-Charcon J, Kopolovic E, Vadai L, Eisenbach A, Kimchi. "DAP kinase links the control of apoptosis to metastasis. *Nature* 1997. 390: 180-4.
- Jacinto-Alemán LF, García-Carrancá A, Leyva-Huerta ER, Zenteno E, Jiménez-Farfán MD, Hernández-Guerrero JC. erbB expression changes in ethanol and 7,12 – dimethylbenz(a)anthracene-induced oral carcinogenesis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* (en prensa).
- Jepson S, Komatsu M, Haq B, Arango ME, Huang D, Carraway CA. Muc4/sialomucin complex, the intramembrane ErbB2 ligand, induces specific phosphorylation of ErbB2 and enhances expression of p27(kip), but does not activate mitogen-activated kinase or protein kinaseB/Akt pathways. *Oncogene* 2002; 21: 7524–7532.
- D Jiménez-Farfán, J Guevara, E Zenteno, H Malagón, JC Hernández-Guerrero. EGF-R and erbB-2 in murine tooth development after ethanol exposure. *BDRA Clin Mol Teratol* 2005; 73:65-71.
- Jonckheere N, Perrais M, Mariette C, Batra SK, Aubert JP, Pigny P, Van Seuningen I. A role for human MUC4 mucin gene, the ErbB2 ligand as a target of TGF- β in pancreatic carcinogenesis. *Oncogene* 2004; 23: 5729-5738.
- Jones R, Gordus A, Krall J, MacBeath G. A quantitative protein interaction network for the ErbB receptors using protein microarrays. *Nature* 2006; 439: 168-174.

- Kapler LN, Kirschbaum MH, Sela M, Yarden Y. Biochemical and clinical implications of the erbB/HER signaling network of growth factor receptor. *Adv Cancer Res* 2000; 77:25-79.
- Karg A, Dinc ZA, Basok O, Ucvet A: MUC4 expression and its relation to ErbB2 expression, apoptosis, proliferation, differentiation, and tumor stage in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Pathol Res Pract* 2006; 202:577-583.
- Komatsu M, Jepson S, Arango ME, Carothers Carraway CA, Carraway KL. Muc4/sialomucin complex, an intramembrane modulator of ErbB2/HER2/Neu, potentiates primary tumor growth and suppresses apoptosis in a xenotransplanted tumor. *Oncogene* 2001;20: 461–470.
- Komatsu YL, Carraway KL. Overexpression of sialomucin complex, a rat homolog of MUC4, inhibits tumor killing by lymphokine-activated killer cells. *Cancer Res* 1999; 59: 2229–2236.
- Kufe D. Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. *Nature Review Cancer* 2009;9: 874-885.
- Kwon KY, Ro JY, Singhal N, Killen DE, Sienko A, Allen TC, Zander DS, Barrios R, Haque A, Cagle PT. MUC4 expression in nonsmall cell lung carcinomas: relationship to tumor histology and patient survival. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131:593-598.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
- Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res* 1998; 74: 49-139.
- Lin SY, Makino K, Xia W, Matin A, Wen Y, Kwong KY, et al. Nuclear localization of EGF receptor. *Nat Cell Biol* 2001; 3:802-8.
- Litvinov SV, Hilkens J. The epithelial sialomucin, episialin, is sialylated during recycling. *J Biol Chem* 1993; 268: 21364-71.
- Liu B, Lague JR, Nunes DP, Toselli P, Oppenheim FG, Soares RV, Troxler RF, Offner GD. Expression of membrane-associated mucins MUC1 and MUC4 in major human salivary glands. *J Histochem Cytochem* 2002; 50: 811–820.

- Lopez FA, Barranco C, Bolos C. Apomucin expression and association with Lewis antigens during gastric development. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2001; 9: 42-48.
- Maiorano E, Favia G, Maisonneuve P, Viale G. Prognostic implications of epidermal growth factor receptor immunoreactivity in squamous cell carcinoma of the oral mucosa. *J Pathol* 1998; 185: 167-74.
- Mehlen P, Puisieux A. Metastasis: a question of life or death. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 449-58.
- Moldovan A, Pfander B, Jentsch S. PCNA, the Maestro of the Replication Fork. *Cell* 2007;129:665- 679.
- Moniaux N, Andrianifahanana, M, Brand RE, Batra, SK. Multiple roles of mucins in pancreatic cancer, a lethal and challenging malignancy. *Br J Cancer* 2004;91: 1633–1638.
- Moniaux N, Chaturvedi P, Varshney GC, Meza JL, Rodriguez-Sierra JF, Aubert JP, et al. Human MUC4 mucin induces ultrastructural changes and tumorigenicity in pancreatic cancer cells. *Br J Cancer* 2007; 97:345–357.
- Moniaux N, Escande F, Porchet N, Aubert JP, Batra SK. Structural organization and classification of the human mucin genes. *Front Biosci* 2001; 6: D1192-D1206.
- Moniaux N, Séverine N, Porchet N, Degand P, Laine A, Aubert JP. Complete sequence of the human mucin MUC4: a putative cell membrane-associated mucin. *Biochem J* 1999; 338: 325-333.
- Moscatello D, Holgado-Madruga M, Godwin K, Ramirez G, Gunn G, Zoltick W, Biegel A, Hayes L, Wong J. Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. *Cancer Res* 1995; 55:5536-5539.
- Okamoto I, Kenyon C, Emler R, Mori T, Sasaki J, Hirosako S, Ichikawa Y, Kishi H, Godwin K, Yoshioka M, Suga M, Matsumoto M, Wong J. Expression of constitutively activated EGFRvIII in non-small cell lung cancer. *Cancer Sci* 2003; 94:50-56.
- Park H, Kim J, Kim G, Bae H, Crawley S, Yang S. Aberrant expression of MUC3 and MUC4 membrane-associated mucins and sialyl Le(x) antigen in pancreatic intraepithelial neoplasia. *Pancreas* 2003; 26:e48–e54.

- Pemberton L, Rughetti A, Taylor-Papadimitriou J, Gendler S. The epithelial mucin MUC1 contains at least two discrete signals specifying membrane localization in cells. 1996. *J Biol Chem* 271: 2332-2340.
- Peschard M, Park. From Tpr-Met to Met, tumorigenesis and tubes. *Oncogene* 2007; 26: 1276–1285.
- Price-Schiavi SA, Andrechek E, Idris N, Li P, Rong M, Zhang J. Expression, location, and interactions of ErbB2 and its intramembrane ligand Muc4 (sialomucin complex) in rat mammary gland during pregnancy. *J Cell Physiol* 2005;203: 44–53.
- Price-Schiavi SA, Meller D, Jing X, Merritt J, Carvajal ME, Tseng SCG, Carraway KL. Sialomucin complex at the rat ocular surface:a new model for ocular surface protection. *Biochem J* 1998; 335:457–463.
- Puttlakath H, Huanf DC, O’Reilly LA, King SM, Strasser A. The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell* 1999; 3: 287-296.
- Qi-Long L, Paul A, Foster C. Bcl-2 role in epithelial differentiation and oncogenesis. *Hum Pathol* 1996; 27:102-10.
- Ramsauer VP, Carraway CA, Salas PJ, Carraway KL. Muc4/sialomucin complex, the intramembrane ErbB2 ligand, translocates ErbB2 to the apical surface in polarized epithelial cells. *J Biol Chem* 2003; 278: 30142–30147.
- Ramsauer VP, Pino V, Farooq A, Carothers Carraway CA, Salas PJ, Carraway KL. Muc4-ErbB2 complex formation and signaling in polarized CACO-2 epithelial cells indicate that Muc4 acts as an unorthodox ligand for ErbB2. *Mol Biol Cell* 2006; 17: 2931–2941.
- Ramsauer VP, Pino V, Farooq A, Carothers Carraway CA, Salas PJ, Carraway KL. Muc4-ErbB2 complex formation and signaling in polarized CACO-2 epithelial cells indicate that Muc4 acts as an unorthodox ligand for ErbB2. *Mol Biol Cell* 2006; 17: 2931–2941.
- Rangan S. A new human cell line (FaDu) from a hypopharyngeal carcinoma. *Cancer* 29: 117-121, 1972.
- Reed JC. Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 1998; 17: 3225-3236.

- Reid CJ, Harris A. Developmental expression of mucin genes in the human gastrointestinal system. *Gut* 1998; 42: 220-226.
- Riese D, Stern D. Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. *Bioessays* 1998;20:41–48.
- Roepstorff K, Grovdal L, Grandal M, Lerdrup M, Deurs B. Endocytic downregulation of ErbB receptors: mechanism and relevance in cancer. *Histochem Cell Biol* 2008; 129:563-578.
- Saitou M, Goto M, Horinouchi M, Tamada S, Nagata K, Hamada T, Osako M, Takao S, Batra SK, Aikou T, Imai K, Yonezawa S: MUC4 expression is a novel prognostic factor in patients with invasive ductal carcinoma of the pancreas. *J Clin Pathol* 2005; 58:845-852.
- Sarafoleanu D, Postelnicu V, Iosif C, Manea C. The role of p53, PCNA and Ki-67 as outcome predictors in treatment of laryngeal cancer. *Journal of Medicine and Life* 2009; 2: 219-226.
- Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2000;103:211–225.
- Schlessinger J. Cell signalling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2000; 103: 211-225.
- Schulze W, Deng L, Mann M. Phosphotyrosine interactome of the ErbB-receptor kinase family. *Mol Syst Biol* 2005; 1: 312-320.
- Shingh AP, Moniaux N, Chahuan SC, Meza JL, Batra SK. Inhibition of MUC4 expression suppresses pancreatic tumor cell growth and metastasis. *Cancer Res* 2004; 64: 622-630.
- Singh AP, Chaturvedi P, Batra SK. Emerging Roles of MUC4 in Cancer: A novel Target for Diagnosis and Therapy. *Cancer Res* 2007; 67: 433-436.
- Singh AP, Chauhan SC, Bafna S, Johansson SL, Smith LM, Moniaux N, Lin MF, Batra SK. Aberrant expression of transmembrane mucins, MUC1 and MUC4, in human prostate carcinomas. *Prostate* 2006; 66: 421-429.
- Singh PK, Hollingsworth MA. Cell surface-associated mucins in signal transduction. *Trends Cell Biol* 2006; 16: 467–476.
- Sok C, Coppelli M, Thomas M, Lango N, Xi S, Hunt L, Freilino L, Graner W, Wikstrand J, Bigner D, Gooding E, Furnari B, Grandis R. Mutant epidermal growth factor receptor

- (EGFRvIII) contributes to head and neck cancer growth and resistance to EGFR targeting. *Clin Cancer Res* 2006; 12:5064-5073.
- Suri C. The Immunohistochemical Evaluation of the expression of Bcl-2 in Squamous Cell Carcinoma. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 2009; 3: 1891-1899.
- Swartz MJ, Batra SK, Varshney GC, Hollingsworth MA, Yeo CJ, Cameron JL, Wilentz RE, Hruban RH, Argani P. MUC4 expression increases progressively in pancreatic intraepithelial neoplasia. *AM J Clin Pathol* 2002; 117: 791- 796.
- Tanguy Y, Ramasamy J, Faoro L, Varalakshmi J, Vidya N, Mohamed ED, et al. The MET Receptor Tyrosine Kinase Is a Potential Novel Therapeutic Target for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Res* 2009; 69: 3021-3031.
- Taylor R, Sean P. Cullen, Seamus J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9: 231-241.
- Teni T, Pawar S. Expression of bcl-2 and bax in chewing tobacco induced oral cancers and oral lesions from India. *Path Oncology Res* 2002; 8:109-13.
- Theodoropoulos G, Carraway KL. Molecular signaling in the regulation of mucin. *J Cell Biochem* 2007; 102: 1103-1116.
- Um JH, Kwon JK, Kang CD, Kim MJ, Ju DS, Bae JH, Kim DW, Chung BS, Kim SH. Relationship between antiapoptotic molecules and metastatic potency and the involvement of DNA-dependent protein kinase in the chemosensitization of metastatic human cancer cells by epidermal growth factor receptor blockade. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 311: 1062-70.
- Vermeer PD. Segregation of receptor and ligand regulates activation of epithelial growth factor receptor. *Nature* 2003; 422: 322–326.
- Waterman H, Alroy I, Strano S, Seger R, Yarden Y. The C-terminus of the kinase- defective neuregulin receptors ErbB-3 confers mitogenic superiority and dictates endocytic routing. *Embo J* 1999; 18: 3348-3358.
- Williams HK. Molecular pathogenesis of oral squamous carcinoma. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 2000; 53: 165-172.

- Wong J, Ruppert M, Bigner S, Grzeschik C, Humphrey A, Bigner S, Vogelstein B. Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:2965- 2969.
- Workaman H, Miller J, Ingalla E, Kaur R, Yamamoto D, Beckett L, Young L, Cardiff R, Borowsky A, Carraway K, Sweeney C. The membrane mucin MUC4 is elevated in breast tumor lymph node metastases relative to matched primary tumors and confers aggressive properties to breast cancer cells. *Breast Cancer Research* 2009; 11: 1-12.
- Yarden Y, Sliwkowski M. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2:127-137.
- Zhang J, Carraway C, Carraway K. Muc4 expression during blood vessel formation in damaged rat cornea. *Curr Eye Res* 2006; 31:1011-1014.
- Zhang J, Perez A, Yasin M, Soto P, Rong M, Theodoropoulos G, Carraway CA, Carraway KL. Presence of MUC4 in human milk and at the luminal surfaces of blood vessels. *J Cell Physiol* 2005; 204:166-177.
- Zhang J, Yasin M, Carraway C, Carraway K. MUC4 expression and localization in gastrointestinal tract and skin of human embryos. *Tissue Cell* 2006; 38: 271-275.

PRODUCTOS DE LA INVESTIGACIÓN.

Presentación en eventos de investigación.

- “MUC1 and MUC4 interact with erbB receptors in oral cancer”. **A Ríos**, E Leyva, LF Jacinto, JC Hernández, MD Jiménez-Farfán. 85th IADR General Session. Barcelona, España. Julio 2010.
- “MUC1 y MUC4: probable relación con la familia erbB en el carcinoma oral de células escamosas”. **Ríos Magallanes AD***, D Jiménez Farfán, A Macario Hernández, LF Jacinto Alemán, M Cardiel Nieves, JC Hernández Guerrero. XXII Congreso Nacional e Internacional de Posgrado e Investigación en Odontología. Reunión Anual de la División Mexicana de la IADR. Acapulco, Gro. México. Mayo 2010.
- “MUC1 y MUC4: probable correlación con los receptores erbB1 y erbB2 en el carcinoma oral de células escamosas”. **A Ríos Magallanes***, D Jiménez Farfán, LF Jacinto Alemán, A Macario, M Cardiel, JC Hernández, C Trejo. XVII Encuentro Nacional y VIII Iberoamericano de Investigación en Odontología. México, D.F. Octubre 2009.
- “MUC1 and MUC4: probable correlation with erbB receptors in oral squamous cell carcinoma”. **AD Ríos***, MD Jiménez-Farfán, LF Jacinto, ER Leyva, JC Hernández, M Cardiel, A Macario, C Trejo Solís. Second World Congress of the International Academic of Oral Oncology. Toronto, Canadá. Julio 2009.

Asesorías.

- Tercer lugar en el “Concurso de Informes Técnicos de Estancias Cortas”, Programa “Jóvenes hacia la investigación”. Dirección General de Divulgación de la Ciencia. UNAM. Trabajo: “Mucinas en carcinoma oral de células escamosas”. Alumnos: Michell Mónica Madrid Chartt (Preparatoria No. 7, UNAM) y Eduardo Reynoso Cesáreo (Preparatoria No. 2). 20 de noviembre de 2009. Tutor: Dra. María Dolores Jiménez Farfán. Asesores: **C.D. Adriana Ríos Magallanes**, C.D. Claudio Viveros Amador.
- “MUC1 y MUC4: probable correlación con los receptores erbB en carcinoma oral de células escamosas. Julio Basurto, Dolores Jiménez, **Adriana Ríos**, Claudio Viveros, Fernando Jacinto, Alejandro Macario, Juan Carlos Hernández. Póster presentado en el Foro del XIX Verano Nacional de la Investigación Científica. Academia Mexicana de las Ciencias, A.C.

Agosto de 2009. Tutor: Dra. María Dolores Jiménez Farfán. Asesores: C.D. y E.P.B Alejandro Macario Hernández, **C.D. Adriana Ríos Magallanes.**

PUBLICACIONES

- **Ríos Magallanes A,** C Trejo Solís, LF Jacinto-Alemán, A Macario-Hernández, JC Hernández Guerrero, MD Jiménez Farfán. MUC4: probable correlation with erbB1 in oral squamous cell carcinoma. Med Oral Patol Oral Cir Bucal (enviado a evaluación).