



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRÁN"**

TESIS

Para obtener el grado de médico especialista en:
ONCOLOGÍA MÉDICA

**"REGULACIÓN NEGATIVA DE PTP1B INDUCIDA POR PACLITAXEL ES MEDIADA
POR NF- κ B EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA"**

Presenta:

DR. ELISEO NEFTALI DE LA CRUZ ESCOBAR

TUTOR

DRA. MARÍA DE JESÚS IBARRA SÁNCHEZ

CO-TUTORES

**DR. JOSÉ ESPARZA LÓPEZ
DR. EUCARIO LEÓN RODRÍGUEZ**

CIUDAD DE MÉXICO, 2016



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
"SALVADOR ZUBIRÁN"

AUTORIZACIÓN DE TESIS:

**"REGULACIÓN NEGATIVA DE PTP1B INDUCIDA POR PACLITAXEL ES MEDIADA POR
NF- κ B EN CELULAS DE CANCER DE MAMA"**

DRA. MARIA DE JESUS IBARRA SANCHEZ

Investigador en Ciencias Médicas
Tutor de Tesis
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"

DR. JOSÉ ESPARZA LÓPEZ

Investigador en Ciencias Médicas
Co-tutor de Tesis
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"

DR. EUCARIO LÉON RODRÍGUEZ

Profesor titular del Curso de Especialización en Oncología Médica
Co-tutor de Tesis
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"

DR. SERGIO PONCE DE LÉON ROSALES

Director de Enseñanza
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"

ABREVIATURAS

Bcl-2	Protooncogén Bcl-2 (abreviatura del inglés B- cell lymphoma 2)
EGF	Factor de crecimiento epidérmico (abrev. del inglés: Epidermal Growth Factor).
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico (abrev. del inglés: Epidermal Growth Factor Receptor).
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (abre. del inglés: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)
HER2	Receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano (abrev. del inglés human epidermal growth factor receptor 2).
INCMNSZ	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"
MAPs	Proteínas asociadas a microtúbulos (abrev. del inglés: Microtubule Associated Protein)
MAPK	Proteínas cinasas activadora del inglés mitogen activated protein kinase
MDR	Proteína resistencia multidroga (abrev. del inglés multidrug resistance protein)
TNF	Factor de necrosis tumoral (abrev. del inglés tumor necrosis factor)
NF- κ B	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (abrev. del inglés: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
PTP1B	Proteína fosfatasa de tirosina tipo 1B (abrev. del inglés: protein-tyrosine phosphatase)
RE	Receptor de estrógeno
RP	Receptor de progesterona
SFB	Suero Fetal Bovino
TNF	Factor de necrosis tumoral (Abv. el inglés tumor necrosis factor)

Dedicatoria

A mi Madre por su fe, sus enseñanzas y su ejemplo para seguir adelante

A mi Hermana Zaida Lucero y Joel por sus consejos y su apoyo incondicional

A Montse por su paciencia, comprensión, por alegrar mi vida y ser la mejor compañera

Agradecimientos

A Dios por ser mi sostén y fortaleza

A la Dra. Ibarra y al Dr. Esparza por compartir sus conocimientos, por su confianza y por invertir su tiempo y esfuerzo para hacer posible este trabajo

A mis maestros que me brindaron su conocimiento y experiencia

A mis amigos Francisco y Carlos que acompañaron y apoyaron durante en este proyecto

A mis pacientes por ser la razón de mi quehacer profesional

CONTENIDO	Página
1. INTRODUCCIÓN	8
1.1 Epidemiología del cáncer	8
1.2 Cáncer de mama	9
1.3 Paclitaxel y Microtúbulos	10
1.4 NF- κ B	12
1.5 Resistencia y NF- κ B	14
1.6 PTP1B	17
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	20
3. HIPOTESIS	20
4. OBJETIVOS	22
4.1 General	23
4.2 Específicos	23
5. MATERIAL Y MÉTODOS	24
5.1 Cultivos de células de cáncer de mama primario	24
5.2 Ensayo de citotoxicidad	25
5.3 Ensayo de Western Blot	27
5.4 Transfecciones	27
6.- RESULTADOS	29
6.1 Caracterización de la expresión de PTP1B endógena en cultivos primarios de cáncer de mama.	29
6.2 Efecto de dosis creciente de paclitaxel sobre la viabilidad dependiendo la expresión de PTP1B en cultivos primarios de cáncer de mama.	30
6.3 Expresión de basal de NF- κ B en relación a la expresión endógena de PTP1B en cultivos primarios de cáncer de mama.	31
6.4 El paclitaxel induce la activación de NF- κ B en cultivos primarios de cáncer de mama	32
6.5 El paclitaxel incrementa los niveles de Bcl-2 en células PTP1B positivas	34
6.6 Paclitaxel induce degradación PTP1B.	34
6.7 La inhibición de calpaína con ALLN previene la degradación de PTP1B e I κ B α mediada por paclitaxel.	35
6.8 El silenciamiento de P65 induce la expresión de PTP1B e incrementa la muerte inducida por paclitaxel	36
7.- DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	38
8.- REFERENCIAS	42

RESUMEN

Antecedentes: En México, el cáncer de mama es la neoplasia maligna más frecuente y la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres. El tratamiento del cáncer de mama incluye diversos tipos de terapias, como son las terapias blanco, radioterapia y agentes citotóxicos, dentro de último grupo, el paclitaxel es uno de los fármacos de quimioterapia más utilizado en el tratamiento de este tipo de cáncer. La resistencia intrínseca o adquirida a este medicamento es uno de los principales obstáculos para lograr un tratamiento exitoso. Previamente, se ha demostrado en nuestro laboratorio que las células PTP1B positivas presentan una mayor resistencia al paclitaxel por un mecanismo desconocido.

NF- κ B es un factor de transcripción que favorece la activación de vías proliferación, supervivencia y resistencia a la apoptosis. En el promotor de PTP1B se encuentra un sitio de unión para NF- κ B; sin embargo, se desconoce su relación con PTP1B y su papel en la resistencia a paclitaxel en las células de cáncer de mama. Identificar los mecanismos que participan en la resistencia a este fármaco podría favorecer el desarrollo de estrategias para mejorar la sensibilidad al tratamiento.

Material y Métodos: Se utilizaron cultivos primarios de cáncer de mama, obtenidos de pacientes del INCMNSZ. Las células fueron clasificadas de acuerdo a la expresión de PTP1B, siendo positivas las MBCD23, MBCD3, MBCDF-D5, MBCDF-B3, y negativas MBCDF, MBCD17, MBCD25. Se realizaron ensayos de citotoxicidad utilizando dosis crecientes de paclitaxel y la viabilidad se evaluó mediante la de técnica de cristal violeta. Se realizaron transfecciones para silenciar PTP1B y P65, y sobreexpresar la forma dominante negativa de κ B α . Mediante la técnica de Western Blot, se evaluó la expresión

de moléculas de la vía de señalización de NF- κ B de forma basal y posterior a la exposición de paclitaxel.

Resultados: Se caracterizó la expresión endógena de PTP1B de las células de cultivos primarios de cáncer de mama por Western blot. Las células se clasificaron como sigue: MBCD23, MBCDF-D5, MBCD3, MBCDF-B3, positivas para PTP1B, y MBCD17, MBCDF y MBCD25, negativas para PTP1B. Las células PTP1B positivas presentan una mayor viabilidad con respecto a las PTP1B negativas posterior a la exposición con paclitaxel. El tratamiento con paclitaxel incrementó la fosforilación de pP65-Ser536 con concomitante degradación de I κ B α , aumento en la expresión de Bcl-2 y degradación de PTP1B. Esta última es revertida por un inhibidor de calpaína (ALLN). La utilización de un siRNA de P65 incrementó la citotoxicidad mediada por paclitaxel e incremento de los niveles de PTP1B.

Discusión y Conclusiones: Las células de cáncer de mama PTP1B positivas que son resistentes a paclitaxel, presentan una mayor expresión basal de la subunidad P65 y de su forma activa, así como de otros miembros de la familia NF- κ B, por lo que este podría constituir un posible mecanismo de resistencia a paclitaxel. La exposición de dosis crecientes de paclitaxel indujo la fosforilación de pP65-Ser536 con concomitante degradación de I κ B α , e incremento en los niveles de la proteína anti-apoptótica, Bcl-2. La inhibición de NF- κ B incrementa la citotoxicidad inducida por paclitaxel y revierte la degradación de PTP1B mediada por paclitaxel. Estos resultados sugieren que paclitaxel activa vías anti-apoptóticas mediadas por NF- κ B en las células de cáncer de mama PTP1B positivas.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Epidemiología del cáncer

El cáncer representa actualmente la segunda causa de muerte por enfermedad, solo superado por las enfermedades cardiovasculares; sin embargo, se estima que en las próximas dos décadas se ubique como la principal causa de muerte a nivel mundial. En el 2012 causó 8.2 millones de muertes en todo el mundo. Un informe reciente indicó que en Estados Unidos de América durante el 2015 el cáncer ocupó la segunda causa de muerte en la población general (22.5%), solo precedida por enfermedad cardiovascular (23.4%) y la primera causa en mayores de 60 años. En la región de las Américas se estima que 2.8 millones de personas son diagnosticadas cada año y 1.3 millones mueren por cáncer en este tiempo. Esta estadística refleja el problema de salud pública que representa a nivel mundial. Se prevé que el número de casos nuevos aumente en aproximadamente un 70 % en los próximos 20 años. De acuerdo con el último informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el número de casos aumentará de 14 millones (2012) a 22 millones en las próximas dos décadas. Se estima que actualmente la probabilidad de desarrollar un cáncer invasivo es de 38 % en las mujeres (1 de cada 3) y el riesgo de desarrollar cáncer de mama durante la vida es de 12.3 % [1]

El cáncer de mama representa la principal causa de cáncer en mujeres correspondiendo al 29 % de los nuevos casos y la segunda causa de muerte por cáncer con un 14 %, solo precedida por cáncer de pulmón [2]. En México desde el 2006 el cáncer de mama es la neoplasia más frecuente. Los datos presentados por GLOBOCAN en 2012 reportan una incidencia de 35.4 casos de cáncer por cada 100,000 personas año y se estima que para

el 2030 en México existirán 24 386 mujeres diagnosticadas con cáncer de mama y 9778 (40%) de estos casos fallecerán por la enfermedad. La incidencia y mortalidad se encuentran en incremento reportándose un riesgo anual estimado de 2 % en 1980 a un 5 % para el 2010; sin embargo, la incidencia real se desconoce debido a la ausencia de un registro nacional de cáncer. Una revisión reciente muestra que existe un incremento en incidencia y mortalidad del 2001 al 2011 la cual es predominantemente después de los 60 años [3].

1.2 Cáncer de mama

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea, existen alrededor de 21 subtipos histológicos (ductal, lobulillar, mucinoso, apocrino, micropapilar, metaplasico, medular entre otros), y por lo menos 4 subtipos moleculares (luminal, normal –like, sobreexpresión de HER2, basal-like), los cuales son biológicamente diferentes respecto a su presentación, respuesta al tratamiento y pronóstico [4]. El factor pronóstico más importante es la etapa clínica al diagnóstico. La supervivencia a 5 años en enfermedad localizada, regional y a distancia es de 99 %, 85 %, 26% respectivamente. En México, el 78 % de los casos se diagnostica con enfermedad localmente avanzada con supervivencias libres de progresión a 3 años de 44 % y supervivencia global del 80 %, similar a las reportadas en la literatura [5].

El tratamiento del cáncer de mama localmente avanzado y metastásico está basado principalmente en la administración de quimioterapia (QT), ya que ha demostrado un incremento en la supervivencia. La reducción absoluta de la mortalidad atribuida a la

adyuvancia se estima entre un 6 a 10 %. En México existe poca información sobre la QT neoadyuvante, en un estudio retrospectivo de un centro, la quimioterapia más utilizada fue la combinación de antraciclinas y taxanos (HER2+ 42%, triple negativo 29% y 9% receptores hormonales positivos) siendo la tasa de respuesta completa de 33 % [5]. Otros agentes de quimioterapia altamente utilizados es el paclitaxel, que es uno de los agentes con mayor efectividad en el tratamiento del cáncer de mama. Su efectividad es evaluada por el porcentaje de respuestas objetivas, las cuales se reportan entre el 32-62 % cuando es utilizado como primera línea en enfermedad avanzada y un beneficio absoluto del 5% en supervivencia global cuando se emplea en la adyuvancia [6, 7].

1.3 Paclitaxel y Microtúbulos

Los microtúbulos son filamentos formados por heterodímeros de α y β tubulinas, estos participan en procesos biológicos como la proliferación, la adhesión y motilidad celular; así como el transporte interno de organelos, vesículas y proteínas. Durante la mitosis forman el huso que es responsable de la adecuada segregación de los cromosomas, todo esto mediante eventos de polimerización y despolimerización de las subunidades de tubulina. Estos eventos son conocidos como inestabilidad dinámica. Debido a estas funciones son un blanco terapéutico altamente efectivo en la terapia tumoral, los agentes que se unen a la tubulina (taxanos, alcaloides de la vinca, epotilonas y eribulina), son fármacos de gran utilidad en la Oncología, ya que suprimen la dinámica del huso durante la mitosis provocando un paro mitótico e inducción de la muerte de las células que se encuentran en el proceso de replicación. La diferencia entre ellos radica en el sitio de unión sobre el que actúan.

El paclitaxel es producto natural extraído de un árbol del pacífico denominado *Taxus brevifolia*, un fármaco que se utiliza en cáncer de mama desde 1990, se une de forma irreversible a la subunidad beta de la tubulina en los aminoácidos 1-31, 217-233 y Arg-282, causando la estabilización de los microtúbulos, esta alteración funcional produce una detención del ciclo celular en la fase G2/M y posteriormente inducción de la apoptosis. Uno de los principales obstáculos para tener éxito en el tratamiento, es el desarrollo de resistencia que es responsable del 90 % de las muertes de estos pacientes. Esta resistencia puede ser innata o adquirida posterior a la exposición del fármaco. El mecanismo de resistencia innato más estudiado es la sobreexpresión de proteínas de eflujo de drogas como lo la glicoproteína P o también llamada MDR, existen otros mecanismos que son específicos del tipo de fármaco, como es la expresión aberrante de isotipos de β tubulina o la sobreexpresión de las proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs del inglés Microtubule associated proteins) en el caso de paclitaxel [8, 9]. En estudios preclínicos se ha reportado que bajas dosis de paclitaxel induce la expresión de importantes factores de supervivencia como NF- κ B y que esta activación podría generar la activación de vías anti-apoptóticas favoreciendo la resistencia a los agentes de quimioterapia específicamente de paclitaxel [10].

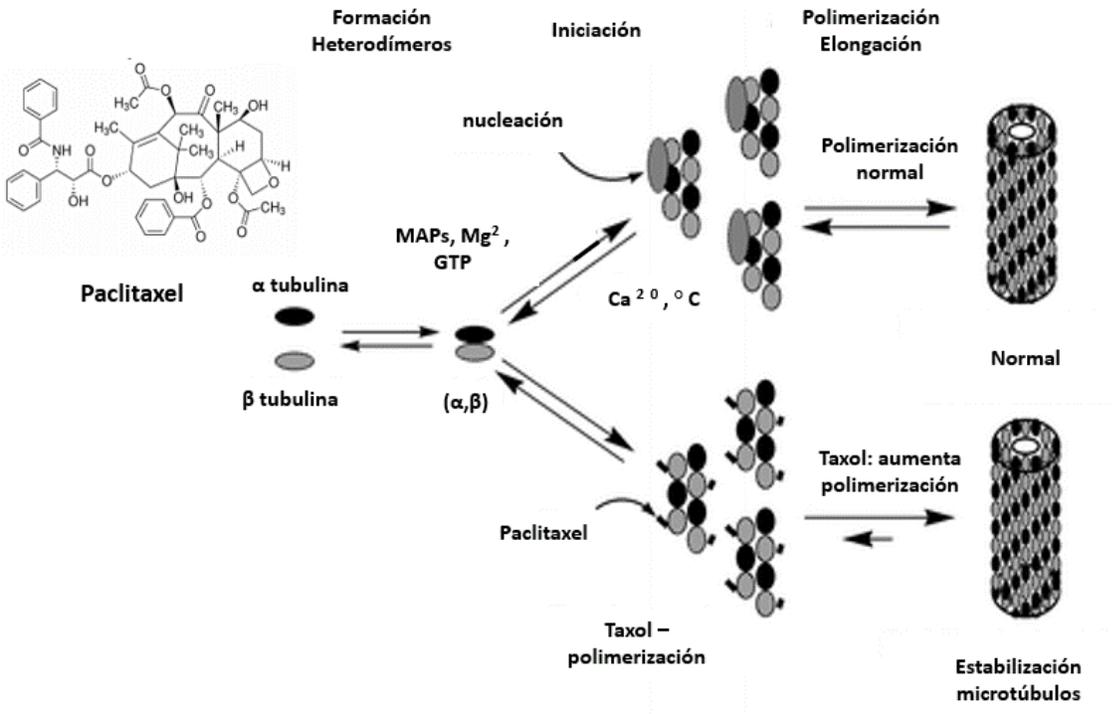


Figura 1. Mecanismo de acción del paclitaxel y dinámica de los microtúbulos

1.4 Factor nuclear κB (NF- κB)

El factor nuclear κB (NF- κB) es una familia de factores de transcripción, los cuales son activados en respuesta a múltiples y variados estímulos extracelulares, que corresponden a aproximadamente 150 en vertebrados entre los cuales se encuentran: estrés, citocinas, factores de crecimiento, carcinógenos y en respuesta a estas señales promueve la regulación de genes que participan en la respuesta inmune, inflamación, proliferación y en el caso de las células tumorales adicionalmente favorece la angiogénesis, invasividad e inhibición de la apoptosis. La familia de NF- κB está conformada por 5 miembros: p50 (NF- $\kappa B1$), p52 (NF- $\kappa B2$), p65 (relA), c-Rel y RelB. Todas estas formas poseen dominios conservados de 300 aminoácidos conocido como dominio homólogo a Rel en su porción N terminal, el cual es responsable de la dimerización, translocación nuclear, unión al DNA y asociación con proteínas inhibitoras I κB s. NF- κB existe como homo- o heterodímeros,

la forma más abundante e importante es el heterodímero p50/p65, al cual propiamente se le ha denominado NF- κ B, siendo P65 el homodímero el de mayor relevancia biológica y es el que se discute en este trabajo [11].

En las células en reposo NF- κ B se encuentra secuestrado como un complejo latente, a nivel citoplasmático unido a proteínas inhibitorias denominadas I κ Bs (I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , y Bcl-3). Diversos estímulos entre los que se incluyen TNF α , ligando de CD40, IL-1, TRANCE, factor de crecimiento epidérmico (EGF), peróxido, radiación ionizante y una variedad de mitógenos, inducen la fosforilación de las cinasa de I κ B α (IKKs, del inglés I κ B kinase), el complejo de IKK comprende dos subunidades catalíticas, IKK α e IKK β y con componente estructural IKK γ (o NEMO del inglés NF- κ B essential modulator). La activación de IKK produce fosforilación en los residuos de serina 32 y 36 de I κ B α , o en residuos de serina 19 y 23 de I κ B β . Esta fosforilación de los I κ Bs provoca su degradación dependiente de ubiquitina a través del complejo de proteosoma 26S, resultando en un incremento de la translocación nuclear de NF- κ B, en donde se une a un promotor y promueve la activación de alrededor de 180 genes entre los que se incluyen: BCL-2, IAPs, Survivina, ciclina D1, c-Myc, TNF, MMP, ICAM, VEGF, IL-1, IL 8 y PTP1B, que participan en los mecanismos antes descritos entre los que. Debido a estas funciones se ha ganado su reputación como “central switch”. Estudios proveen evidencia de que NF- κ B suprime la muerte celular en respuesta a una gran variedad de estímulos apoptóticos. Su efecto biológico es dependiente del tipo celular y de diversos procesos fisiológicos [12].

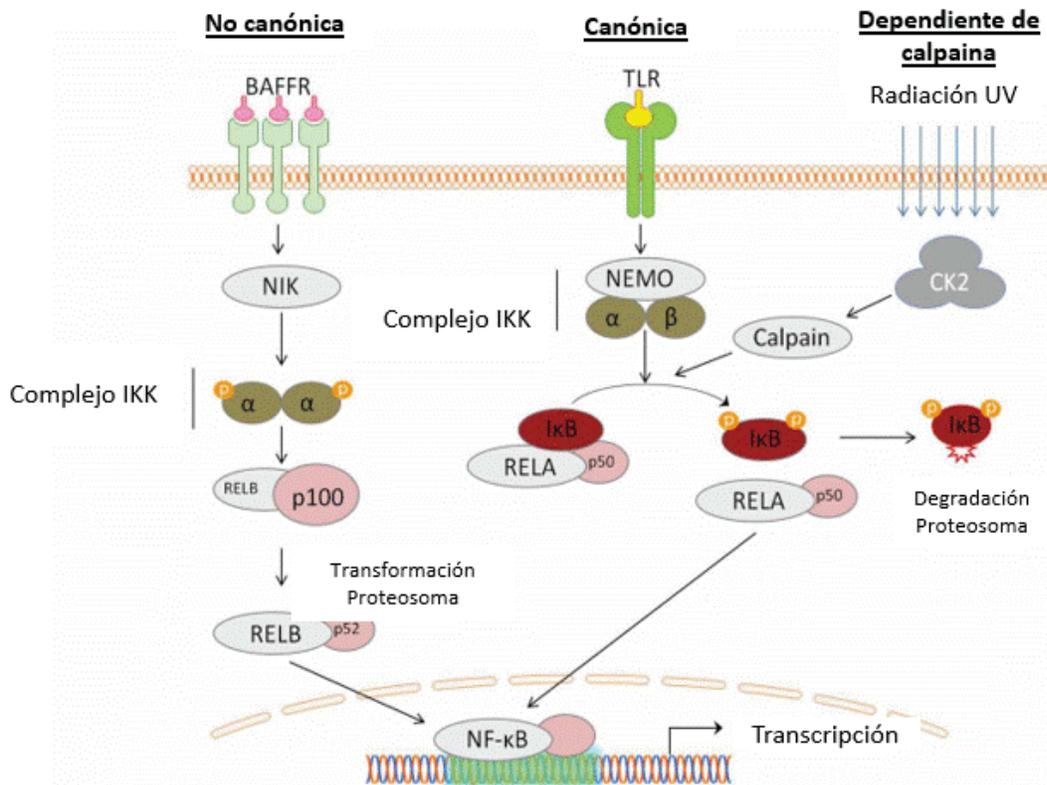


Figura 2. Vías de activación de NF-κB de acuerdo a la degradación IκBα. La vía canónica posterior a la unión de ligando receptor y es dependiente del complejo de las IKKs. La vía no canónica depende de la cinasa inductora de NF-κB (NIK), la cual promueve la proteólisis de p100 por IKKα. La vía dependiente de calpaína requiere la activación de caseína cinasa cinasa (CK2), la cual activa la proteasa de calpaína y degrada IκBα.

1.5 Quimioresistencia y NF-κB

La resistencia intrínseca o adquirida a los agentes de quimioterapia es un fenómeno común y representa un reto en el tratamiento, como se comentó previamente es una de las principales causas que conllevan a la muerte a los pacientes con cáncer. La quimioresistencia es definida por un complejo número de factores que incluyen proteínas de resistencia a múltiples drogas, reducción en biodisponibilidad del fármaco, incremento en la reparación, inactivación intracelular del fármaco y evasión de la apoptosis. Este último mecanismo es el que se hemos considerado en este trabajo implicado en la resistencia a paclitaxel en células de cáncer de mama. La resistencia al tratamiento es el principal obstáculo para un tratamiento exitoso [13, 14].

Los mecanismos de resistencia a taxanos no están bien dilucidados; sin embargo, se considera que pueden ser multifactoriales entre los que se incluyen: la sobreexpresión de glicoproteína P, la presencia de mutaciones de β tubulina, la alta expresión de proteína tau asociada a los microtúbulos. El tratamiento sistémico del cáncer de mama avanzado con quimioterapia incrementa la supervivencia en estas pacientes; sin embargo, la resistencia es un fenómeno frecuente que afecta los resultados. Debido a que no se conocen por completo los mecanismos causantes de quimioresistencia, es prioritario el desarrollo de nuevas drogas y estrategias para mejorar esa resistencia. Previamente se ha demostrado que el incremento en la expresión de NF- κ B se asocia a quimioresistencia [15]. La activación constitutiva de NF- κ B ha sido demostrada en algunos tumores como mama, pulmón linfoma y correlaciona con pobre pronóstico en algunos casos, la inhibición de la señalización del gen muestra incremento de las tasas de respuesta tumoral. La actividad de NF- κ B correlaciona inversamente con la sensibilidad a quimioterapia en líneas celulares de carcinomas [16].

En un estudio realizado en el hospital Clinic de Barcelona se observó que la sobreexpresión nuclear de NF- κ B se asoció con una pobre respuesta a la quimioterapia neoadyuvante (20 % vs 91 % sin sobreexpresión); por lo que se ha considerado que la expresión de este factor podría ser un marcador de resistencia [17, 15]. En otro estudio se analizó por medio de inmunohistoquímica la tinción nuclear de P65 como un subrogado de su activación; se encontró una sobreexpresión nuclear en el 26.3% de los casos, encontrando una asociación con alto grado histológico, receptores hormonales negativos y alto índice del Ki67, lo cual fue estadísticamente significativa. Las tasas de

respuesta patológica completa fueron más altas en los pacientes con baja expresión nuclear (26.5 % vs 6 %, p 0.004), especialmente en el subtipo HER2 negativo y receptores hormonales positivos [18].

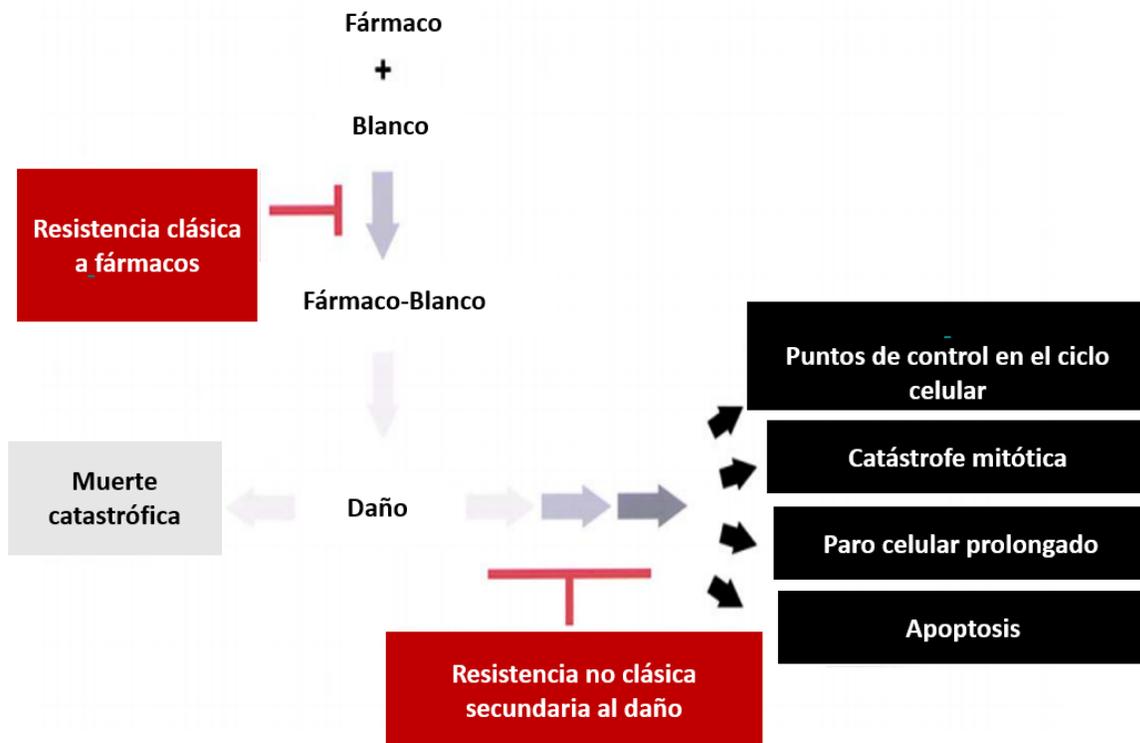


Figura 4. Mecanismos de resistencia a fármacos. La resistencia clásica relacionada a la disponibilidad del fármaco a su blanco y resistencia no clásica, secundaria al daño en donde se regulan mecanismos que bloquean el efecto final del tratamiento.

1.6 PTP1B

La fosforilación en residuos de tirosinas constituye un mecanismo importante de regulación de la señalización intra-celular, debido a que participa en la regulación de diversos procesos biológicos como proliferación, crecimiento, comunicación intercelular, adhesión y migración celular. Este proceso depende de la acción equilibrada entre dos tipos de enzimas: las proteínas cinasas de tirosina (PTK, del inglés protein tyrosine kinase) y proteínas fosfatasas de tirosinas (PTP, del inglés del inglés protein tyrosine phosphatase). Las primeras se encargan de agregar grupos fosfato a residuos de tirosina específicos en la proteína sustrato, promoviendo cambios conformacionales que modifican la interacción con otras proteínas [19]. Mientras que las PTPs remueven un fosfato en residuos de tirosina. La alteración en el balance de estas enzimas provoca niveles de fosforilación aberrantes asociados a diferentes enfermedades, entre ellas cáncer [20].

Las PTPs son una familia de enzimas con estructuras diferentes, se encuentran altamente reguladas por los dominios que flanquean al dominio catalítico, y pueden tener tanto efectos estimulatorios como inhibitorios. Las PTPs remueven los residuos fosfato mediante un mecanismo de 2 pasos: primero, la formación de un enlace covalente de fosfato-PTP; y segundo, la hidrólisis de la unión fosfato-proteína sustrato. En el genoma humano se han identificado un total de 107 PTPs las cuales están divididas en cuatro clases: clase I integrada por fosfatasas clásicas y duales, la clase II que son fosfatasas de bajo peso molecular, clase III CDC25 y la clase IV Eya 1-4. Las fosfatasas clásicas se dividen en intracelulares y transmembranales, PTP1B pertenece a las fosfatasas intracelulares [19]. El dominio catalítico de las PTPs tiene aproximadamente 280

aminoácidos, que contiene una secuencia consenso conservada (VHCSAGXGR[T/S]G), que incluye el residuo de cisteína necesario para la actividad catalítica [21].

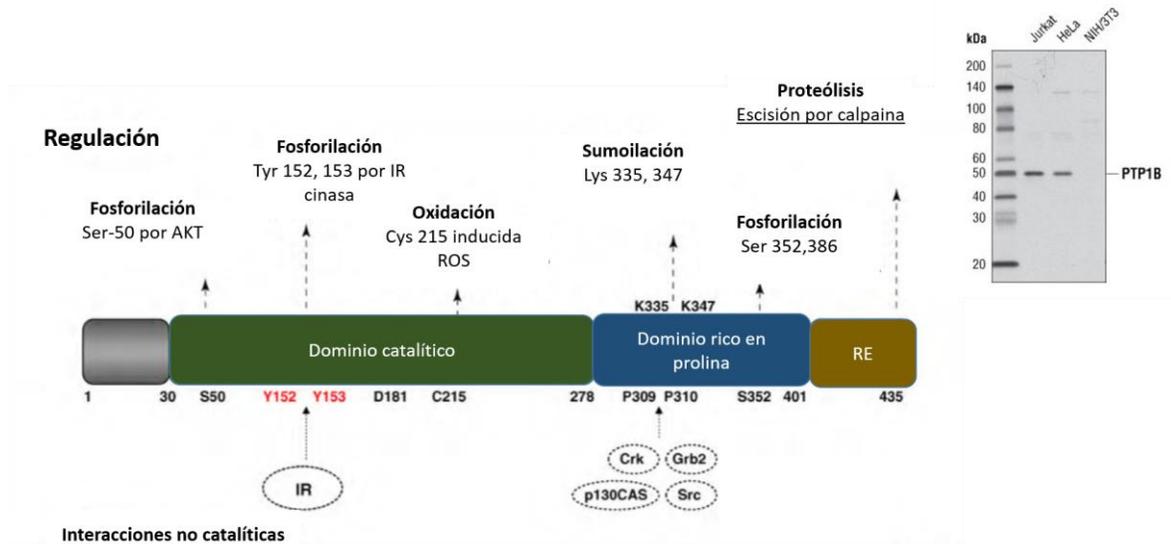


Figura 4. Dominios estructurales y sitios de regulación de PTP1B.

La proteína fosfatasa de tirosina 1B (PTP1B) es una fosfatasa no transmembranal que pesa 50 kDa, que posee un dominio catalítico de 37 kDa hacia su extremo N-terminal flanqueado por dominios ricos en prolina y un dominio C-terminal con una secuencia de localización al retículo endoplásmico (RE). El gen que codifica a PTP1B se encuentra localizado en el cromosoma 20 en la región q13.1-q13.2. Su especificidad se encuentra regulada estrechamente por su acceso a los sustratos. Existen otros cuatro mecanismos que regulan la actividad de PTP1B, oxidación, fosforilación, sumoilación y proteólisis. Esta fosfatasa se ha identificado como un regulador muy importante en el desarrollo de enfermedades como diabetes, obesidad y cáncer [22, 23]. Los sustratos de PTP1B incluyen a receptores con actividad de tirosina cinasas, factores de transcripción y

proteínas del citoesqueleto, los cuales están asociados a procesos como proliferación, apoptosis, adhesión, diferenciación [24]. En un modelo transgénico de tumores de mama HER2 positivos y deficientes en PTP1B se encontró una mayor inducción de eventos apoptóticos [25]. Estudios en modelos murinos con cáncer de mama HER2 positivo, los cuales se caracterizan por una rápida progresión y desarrollo temprano de metástasis pulmonares, la delección de PTP1B retrasa el desarrollo y la progresión el desarrollo de tumores mamarios, y también reduce el desarrollo de metástasis pulmonares [25, 26].. En cáncer de mama se ha analizado la sobreexpresión de PTP1B de acuerdo a los subtipos, existe una fuerte asociación entre PTP1B y HER2 que sugiere que podrían compartir vías en la patogénesis de este subtipo, reportándose expresión en 53.1 % de pacientes HER2 positivo y 47.5 % % de pacientes HER2 negativo y su expresión se ha relacionado con pronóstico [27].

Recientemente se ha demostrado que la sobreexpresión de PTP1B provoca incremento en los niveles de HER2 de manera independiente a la transcripción y esto se asocia a un fenotipo más agresivo con mayor capacidad de proliferación y migración celular en cultivos primarios de cáncer de mama [28]. En otro estudio se demostró que la expresión endógena de PTP1B correlaciona con la resistencia a paclitaxel [29]. Estos resultados sugieren que PTP1B poder ser un marcador pronostico y predictivo de respuesta a fármacos en cáncer de mama; sin embargo, se desconoce cuáles son los mecanismos moleculares que median esta resistencia a paclitaxel.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Las neoplasias malignas se constituyen en la actualidad la segunda causa de muerte a nivel mundial, solo superado por las enfermedades cardiovasculares; sin embargo, se estima que los próximos años se ubique como la principal causa de muerte. El cáncer de mama, se ubica como la neoplasia maligna más frecuente y la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres en el mundo. En 2012 se diagnosticaron 1.7 millones de casos, representando el 25 % de todas las muertes por cáncer en mujeres [30, 2]. En México desde el 2006 el cáncer de mama es la neoplasia más frecuente en mujeres, superando al cáncer cervico uterino. El 78 % de los casos se diagnostican con enfermedad localmente avanzada [5].

En la actualidad la quimioterapia representa una parte fundamental del tratamiento en pacientes con cáncer de mama localmente avanzado o metastásico ya sea monodroga o en combinación. Además de tener un papel fundamental como adyuvancia en etapas localizadas de alto riesgo. El paclitaxel forma parte de los esquemas de quimioterapia estándar, ya que presentan altas tasas de respuesta (32- 62 %) [7, 6]. A pesar de estos resultados, la resistencia innata o adquirida representa un problema para un tratamiento exitoso. El paclitaxel promueve la regulación de vías de señalización intracelular, las cuales intervienen en mecanismos de supervivencia o apoptosis.

El factor nuclear κ B (NF- κ B) se ha involucrado en múltiples mecanismos como proliferación, inhibición de la apoptosis, invasión y resistencia a fármacos. Este último mecanismo es uno de los principales obstáculos para un lograr un tratamiento exitoso.

Múltiples moléculas se han implicado en la resistencia a quimioterapia y los mecanismos de regulación son muy complejos.

PTP1B es una fosfatasa fundamental en múltiples vías de señalización en cáncer de mama, su sobreexpresión se ha relacionado con resistencia a fármacos y pobre pronóstico. No existe información actual sobre la relación que existe entre la expresión de PTP1B y el NF- κ B posterior al uso de paclitaxel.

3. HIPOTESIS

El factor nuclear κ B (NF- κ B) promueve la regulación de PTP1B y la resistencia a paclitaxel en células de cultivos primarios de cáncer de mama tratadas con paclitaxel.

HIPOTESIS NULA

No existe relación entre la expresión de NF- κ B y PTP1B posterior al tratamiento con paclitaxel en células de cultivos primarios de cáncer de mama

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Determinar el papel de NF- κ B sobre la expresión de PTP1B y su relación con la resistencia paclitaxel en las células de cáncer de mama.

4.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar la expresión endógena de PTP1B en cultivos primarios de cáncer de mama
- Caracterizar la expresión basal de NF- κ B en cultivos primarios de cáncer de mama PTP1B positivo y negativo.
- Identificar los cambios en la expresión y la activación de NF- κ B posterior al tratamiento con paclitaxel en cultivos primarios de cáncer de mama
- Conocer el efecto de la inhibición de NF- κ B sobre la expresión de PTP1B en cultivos primarios de cáncer de mama.
- Conocer el efecto de la inhibición de PTP1B sobre la expresión NF- κ B en cultivos primarios de cáncer de mama con expresión de la fosfatasa.
- Evaluar el efecto de la inhibición de NF- κ B en la citotoxicidad mediada por paclitaxel en cultivos primarios de cáncer de mama PTP1B positivos

5. MATERIAL Y METODOS

Reactivos y anticuerpos.

Para la realización del presente trabajo se utilizaron los siguientes reactivos y materiales: Paclitaxel (Intas Pharmaceuticals Limited, Gujarat, India). Se utilizaron anticuerpos primarios contra pP65 y PTP1B (Cell signaling technology); p50, P52, c-Rel, IKB α , tubulina y actina de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA) y Cell Signalling Technology (Cambridge, MA, EUA.) Anticuerpo secundario anti-ratón o anti-conejo se adquirieron de Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, EUA).

5.1 Cultivos primarios de células de cáncer de mama

Se utilizaron cultivos celulares MBCD23, MBCD3, MBCD5, MBCD5-B3, positivos para PTP1B, y MBCD17, MBCDF y MBCD25, negativos para PTP1B, los cuales fueron generados previamente en el laboratorio a partir de biopsias obtenidas de pacientes que fueron sometidas a mastectomía radical (Protocolo aprobado por el comité de ética del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. BQO-008-06/9-1). Los cultivos se mantuvieron en RPMI-1640 (Gibco, Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, California, USA) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) (HyClone, Thermo, Utah, USA), antibiótico y antimicótico e incubadas a 37 °C con atmósfera de 5 % CO₂.

Estimulación Celular

Las células fueron sembradas en cajas de Petri de 60 mm de diámetro, mantenidas con medio RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen, Life, Technologies, Carlsbad, California, USA) suplementado con 10 % de suero fetal bovino, antibiótico y antimicótico e incubadas a 37 °C con atmósfera de 5 % CO₂, se dejaron adherir toda la noche. Posteriormente las células recibieron diferentes estímulos con los fármacos de interés que a continuación se detallan: Para la estimulación con Paclitaxel (Intas Pharmaceuticals Limited, Gujarat, India), las células fueron estimuladas con dosis creciente del fármaco 0, 0.05, 0.5, 5 µg/ml durante 3 horas. Posteriormente, se realizó un curso temporal en el cual las células fueron estimuladas con dosis fija de paclitaxel (5 µg/ml), por 0, 1, 2, 4, 8, 16, 24 h.

5.2 Curvas de citotoxicidad

La viabilidad celular posterior a la administración de diversos fármacos se realizó mediante la técnica de cristal violeta. Las células fueron sembradas a una densidad de 10, 000 células/cm² en placas de 48 pozos (Coming, NY, USA), por triplicado, en medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen, Life, Technologies, Carlsbad, California, USA) suplementado con 10 % de suero feta bovino. Las células se dejaron adherir a la placa toda la noche. Al día siguiente, se aplicaron concentraciones crecientes de paclitaxel (0.0005, 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 nM). Se incubaron durante 48 horas y después de este tiempo se fijaron las células con glutaraldehído (concentración) y se tiñó con cristal violeta al 0.1% en PBS en agitación durante 20 minutos. Se lavaron las placas en agua y se dejaron secar. El cristal violeta se disolvió en 400 µl/ pozo de ácido acético al 10 % en agitación por 20 minutos. Se leyó la absorbancia de la solución a 595 nm en un espectrofotómetro de microplaca (Opsys

MR, Dynex Technologies, Chantilly, VA, USA). Los valores están expresados como el porcentaje de viabilidad con respecto al control no tratado. Los datos representan al menos tres experimentos independientes sembrados por triplicado.

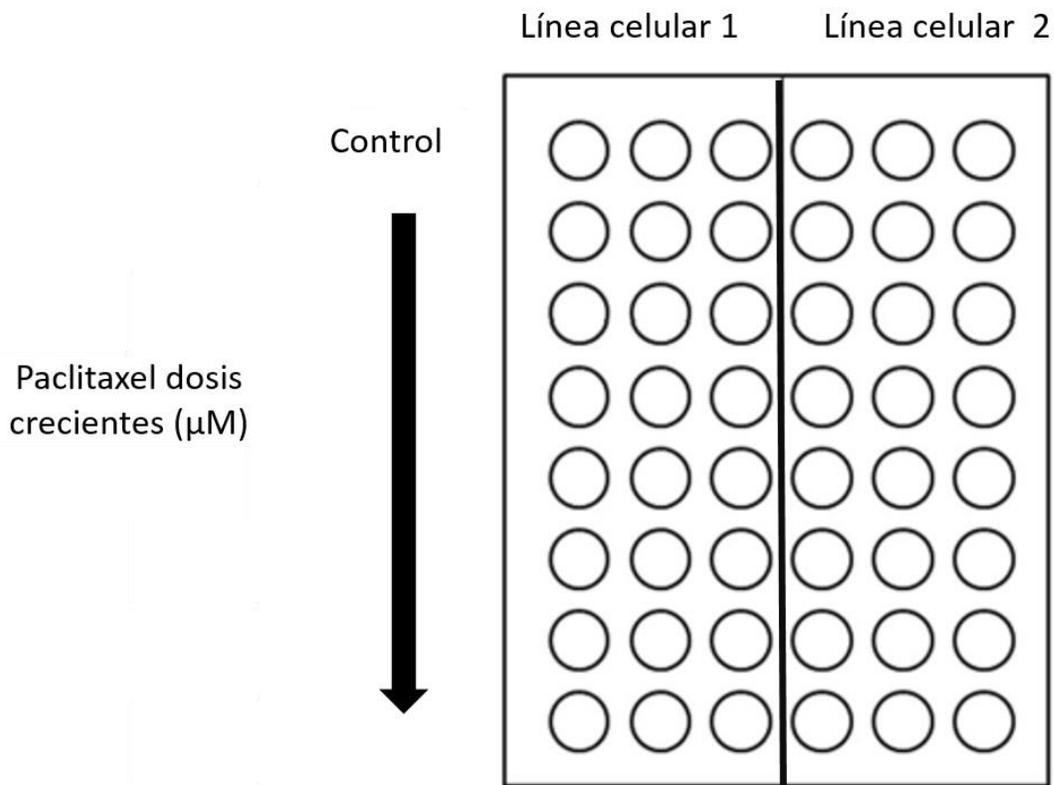


Figura 5. Esquema de ensayo de citotoxicidad con paclitaxel. En placas de 48 pozos se sembraron 10,000 células/cm², a las 24 horas se agregó paclitaxel a concentraciones crecientes (0.0005, 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 nM) durante 48 horas. Se realizó determinación de viabilidad con técnica de cristal violeta. Cada ensayo fue realizado por triplicado y al menos 3 veces de manera independiente.

5.3 Western Blot.

Las células fueron sembradas en cajas de Petri de 60 mm, hasta obtener una confluencia del 90%, se realizó extracción de la proteína raspando las células, se obtuvieron los pellets, los cuales fueron lisados con un buffer que contiene HEPES 50mM (pH 7.4), EDTA 1 mM, NaCl 250 mM, Nonidato P-40 1%, NaF 10 Mm, Vanadato de sodio e inhibidores de proteasas (Complete, EDTA-free, Roche). La proteína obtenida fue cuantificada mediante el método de Bradford. 25µg de proteína se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturizante (SDS-PAGE) y fueron transferidos a una membrana de Immobilon-P PVPDF (Millipore Corp. Bedford, MA, EUA). Las membranas fueron bloqueadas durante 60 minutos con leche al 5% en PBS-Tween 0.05%. Posteriormente fueron incubadas con los correspondientes anticuerpos de primarios de interés: pP65, p50, P52, c-Rel, IκBα, pIκBα, PTP1B, tubulina y GADPH durante toda la noche a 4 °C en agitación. Al día siguiente se incubaron por 60 minutos con el anticuerpo secundario conjugado correspondiente. La señal fue visualizada mediante quimioluminiscencia utilizando el kit Super Signa West Pico (Thermo, Rockford, IL, EUA) y se expuso a una película radiográfica (Kodak).

5.4 Transfecciones

Las células positivas para PTP1B (MBCD3, MBCD23, MBCD5), se transfectaron mediante el protocolo de LiofectAMINE plus Reagent. Las células se sembraron en placas de 6 pozos a una densidad de 250,000 células por pozo. Una hora antes de la transfección se cambió el medio convencional por medio libre de antibióticos y SFB. Para inhibir la expresión de P65, se colocaron 4 picomoles del siRNA P65 o siRNA control.

Para la sobreexpresión de I κ B α mutado se utilizó un plásmido que contiene el cDNA de I κ B α con la mutaciones S32A/S36A. Para inhibir la expresión de PTP1B se usaron 2 μ g de DNA de los plásmidos pGFP-V-RS sh control o los pGFP-V-RS shRNAs para PTP1B. Brevemente, la transfección se realizó diluyendo el DNA con Plus Reagent en un tubo eppendorf en medio libre de suero y antibióticos. Se incubó la mezcla durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de este tiempo se mezcló con lipofectamina diluida en medio libre de suero y antibióticos, esta mezcla final se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente. Después de este tiempo el DNA con la lipofectamina se adicionó en las células y se incubó por 48 horas. En algunos casos se agregó el estímulo farmacológico correspondiente y se realizaron los experimentos correspondientes, ya sea de western blot o ensayo de citotoxicidad.

6. RESULTADOS

6.1 Caracterización de la expresión PTP1B endógena en cultivos primarios de cáncer de mama.

Para caracterizar la expresión PTP1B en cultivos primarios de cáncer de mama, se analizaron seis cultivos primarios de cáncer de mama por Western blot utilizando un anticuerpo anti-PTP1B. Las células se clasificaron como sigue: MBCD23, MBCD5, MBCD3, MBCD5-B3, positivos para PTP1B, y MBCD17, MBCDF y MBCD25, negativos para PTP1B, en este último grupo los niveles de PTP1B no fueron detectables por esta técnica (Figura 6).

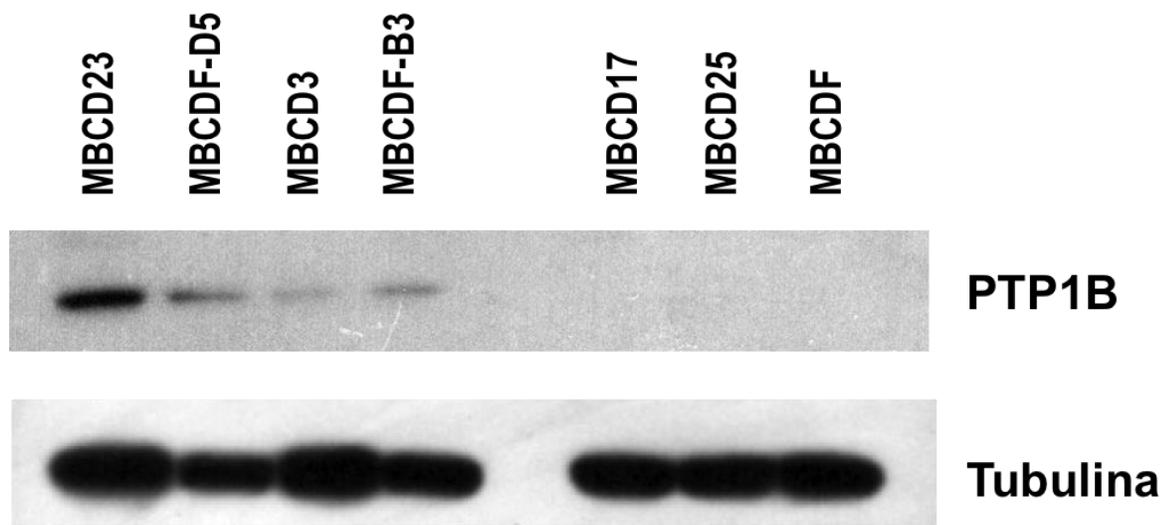


Figura 6. Expresión endógena de PTP1B en cultivos primarios de cáncer de mama. Se realizó Western blot para caracterizar la expresión basal de PTP1B utilizando un anticuerpo específico. Se separaron 20 µg de proteína total, mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 9 % (SDS-PAGE). La membrana se limpió y se determinaron los niveles de tubulina como control de carga.

6.2 Efecto de dosis creciente de paclitaxel sobre la viabilidad dependiendo la expresión de PTP1B en cultivos primarios de cáncer de mama.

Para confirmar la susceptibilidad a paclitaxel se realizaron ensayos de citotoxicidad con los cultivos PTP1B positivos (MBCDF-D5, MBCD3, MBCD23) y PTP1B negativos (MBCD17 y MBCD25). Las células fueron incubadas a concentraciones 0, 0.5, 1 y 5 $\mu\text{g/mL}$ de paclitaxel por 48 h y la viabilidad celular fue evaluada por la técnica de Cristal Violeta. Los resultados mostraron que los cultivos positivos para PTP1B presentan mayor viabilidad celular comparadas con las células PTP1B negativas (Figura 7). Estos resultados están de acuerdo con lo previamente reportado en otros estudios [29].

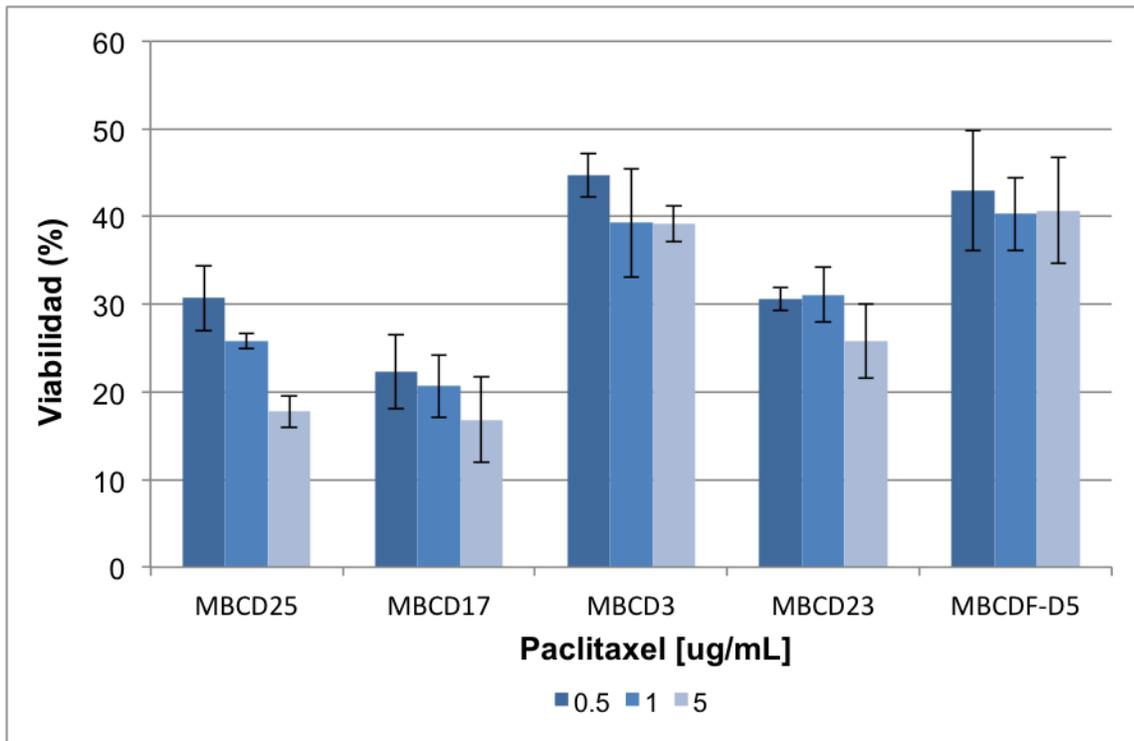


Figura 7. Efecto de concentraciones crecientes de paclitaxel en células de cáncer de mama PTP1B positivas y negativas. Las células fueron tratadas durante 48 horas con dosis crecientes de paclitaxel ($\mu\text{g/mL}$). La viabilidad celular se evaluó por Cristal Violeta. Se realizaron 3 experimentos independientes por triplicado.

6.3 Expresión de basal de NF- κ B en relación a la expresión endógena de PTP1B en cultivos primarios de cáncer de mama.

Una vez que se determinó cuales cultivos primarios expresan PTP1B y se corroboró la resistencia a paclitaxel, se analizó por medio de Western blot la expresión de los diferentes miembros de la familia de NF- κ B para lo cual se utilizaron anticuerpos específicos para pP65-Ser536, P65, P50, P52, c-Rel, I κ B α . Se encontró que las células PTP1B positivas presentan una mayor cantidad de pP65-Ser536, P65, c-Rel e I κ B α , mientras que las negativas presentaron una mayor expresión de p52 precursor de p100 (NF- κ B2) (Figura 8). Estos resultados sugieren que en células de cáncer de mama PTP1B positivas, algunos de los miembros de la familia de NF- κ B se encuentran en mayores niveles, por lo cual podrían estar promoviendo una mayor supervivencia al paclitaxel.

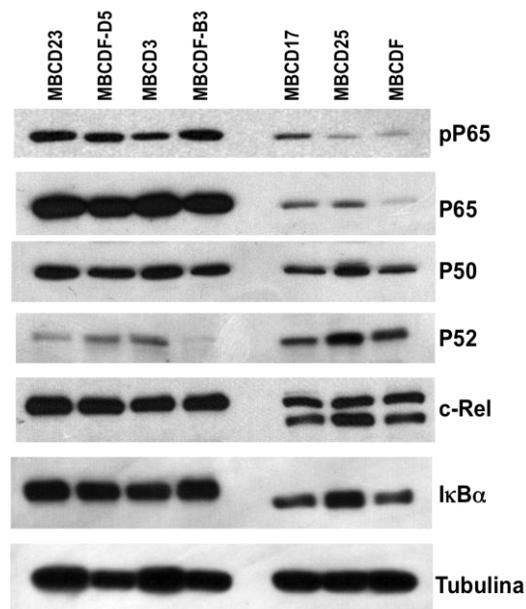


Figura 8. Expresión de los miembros de la familia de NF- κ B. Western Blot en el que se muestra la expresión diferencial de los miembros de la familia de NF- κ B de acuerdo a la expresión de PTP1B en las líneas celulares de cultivos primarios de cáncer de mama. Se separaron 20 μ g de proteína total, mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 7.5 % (SDS-PAGE). Se utilizó anticuerpo para P65, pP65-Ser536, P50, P52, c-Rel, I κ B α . La membrana se limpió y se determinaron los niveles de tubulina como control de carga.

6.4 El paclitaxel induce la activación de NF- κ B en cultivos primarios de cáncer de mama

Una vez que se habían analizado los niveles de los miembros de la familia de NF- κ B, se eligió un cultivo positivo y uno negativo para PTP1B para determinar el efecto de paclitaxel sobre la activación de NF- κ B mediante Western blot. Las células fueron tratadas con dosis crecientes de paclitaxel con 0, 0.05, 0.5 y 5 μ g/ml de paclitaxel durante 3 horas. Se observó que existe incremento de la fosforilación de P65 en la Ser536 con una concomitante degradación de I κ B α posterior a la estimulación con paclitaxel, las cuales son dosis dependiente. Como ya se había observado los niveles de P65 son menores en las células de cáncer de mama PTP1B negativas (Figura 9).

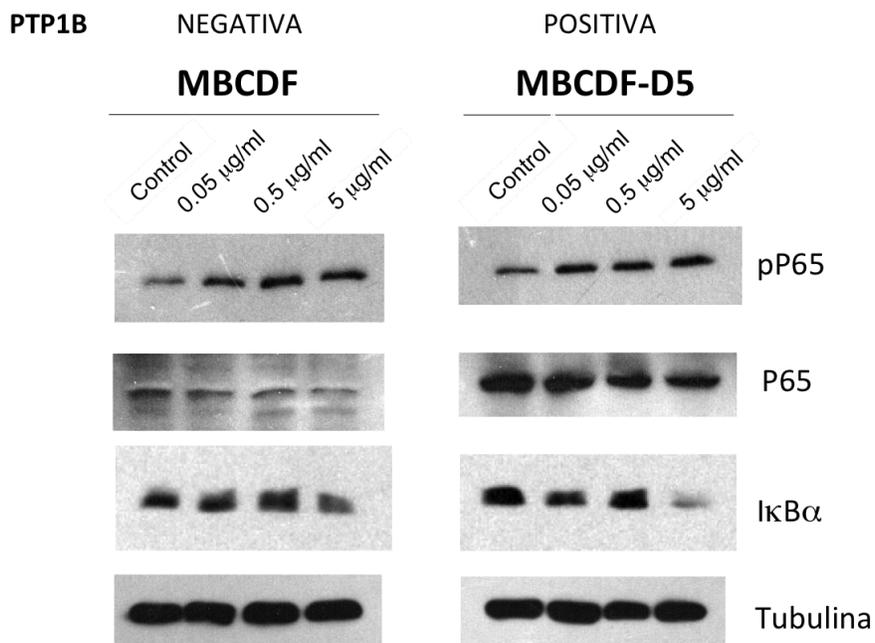


Figura 9. Efecto de paclitaxel sobre la activación de NF- κ B y la degradación de I κ B α . Se muestra a las células MBCDF y MBCDF-D5 posterior a la exposición a dosis crecientes de paclitaxel (0.05, 0.5, 5 μ g/mL). Se observa incremento de la fosforilación y degradación de I κ B α . Se separaron 20 μ g de proteína total, mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 9 % (SDS-PAGE). Se utilizó anticuerpo para P65, pP65, I κ B α . La tubulina se utilizó como control de carga.

6.5 El paclitaxel incrementa los niveles de Bcl-2 en células PTP1B positivas de cáncer de mama.

Tomando en cuenta los resultados previos, en los que NF- κ B esta sobreexpresados en las células PTP1B positivas. Se estudió la expresión de Bcl-2, el cual es un regulador del proceso apoptosis, la sobre-expresión de este induce resistencia a la apoptosis. Por esta razón, se analizaron los cambios en la expresión de Bcl-2 en respuesta a paclitaxel. Las células fueron tratadas con dosis crecientes de paclitaxel con 0, 0.005 0.05, 0,5 5 y 50 μ g/mL durante 3 horas. La expresión de Bcl-2 se evaluó mediante la técnica de Western. Los resultados mostraron que paclitaxel incrementa los niveles de Bcl-2 de manera dosis respuesta (Figura 5). Estos resultados sugieren que la resistencia a paclitaxel en células de cáncer mama PTP1B positivas se debe a que este incrementa los niveles de Bcl-2 a través de los altos niveles de la activación de NF- κ B.

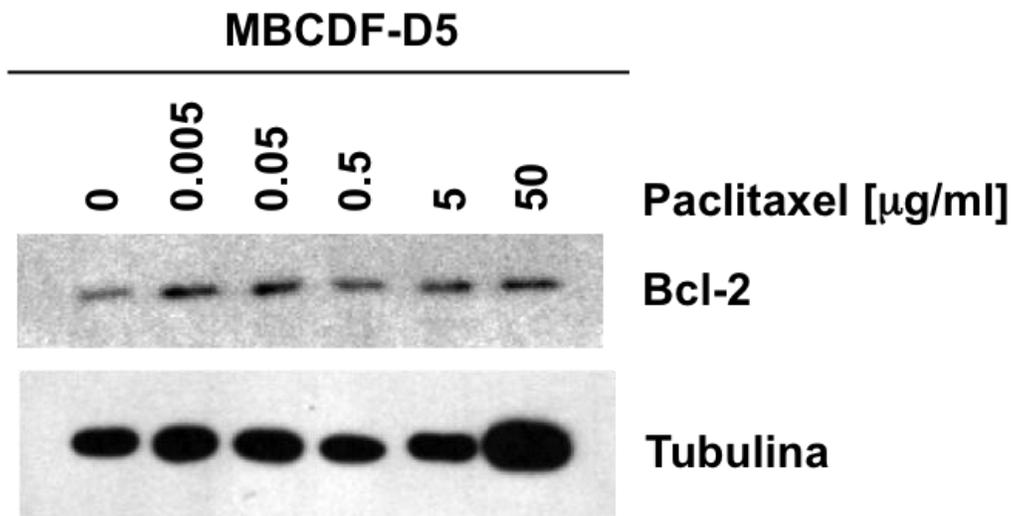


Figura 6. El paclitaxel incrementa los niveles de Bcl-2 en células PTP1B positivas de cáncer de mama. Se muestra a las células MBCDF-D5 posterior a la exposición a dosis crecientes de paclitaxel (0, 0.005 0.05, 0,5 5 y 50 μ g/mL). Se observa incremento de la expresión de Bcl-2. Se separaron 20 μ g de proteína total mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 9 % (SDS-PAGE). Se utilizó anticuerpo para P65, pP65, I κ B α . La tubulina se utilizó como control de carga.

6.6 Paclitaxel induce degradación PTP1B.

Una vez que se demostró que el paclitaxel induce la activación de NF- κ B e incrementa Bcl-2, se investigó cual es el efecto de dosis crecientes de paclitaxel sobre la expresión de PTP1B por medio de Western Blot. Las células fueron tratadas con dosis crecientes de paclitaxel con 0, 0.05, 0.5 y 5 μ g/ml de paclitaxel durante 3 horas. Se observó que existe degradación de PTP1B dosis dependiente en las células tratadas con paclitaxel (Figura 10).

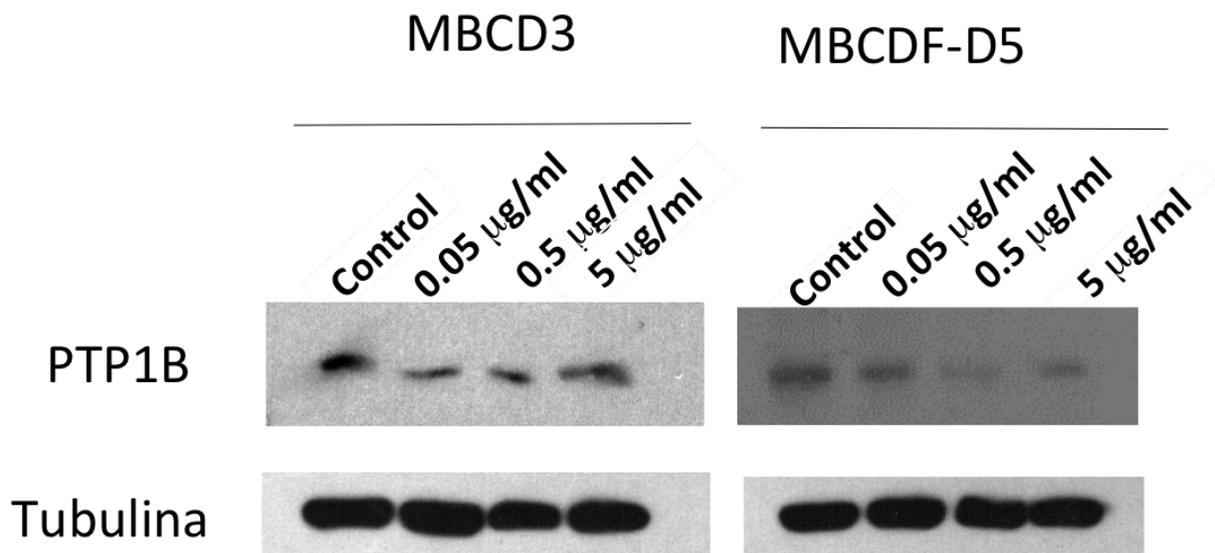


Figura 10. Paclitaxel induce degradación de PTP1B. Se muestra a las células MBCD3 y MBCDF-D5 posterior a la exposición a dosis crecientes de paclitaxel (0.05, 0.5, 5 μ g/mL). Se observa degradación de PTP1B inducida por paclitaxel la cual es dosis dependiente. Se separaron 20 μ g de proteína total, mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 9 % (SDS-PAGE). Se utilizó anticuerpo para PTP1B. La tubulina se utilizó como control de carga.

6.7 La inhibición de calpaína con ALLN previene la degradación de PTP1B e I κ B α mediada por paclitaxel.

Para analizar cuál es el mecanismo de degradación de PTP1B mediado por paclitaxel, las células MBCD3 fueron tratadas con el inhibidor del proteosoma (ALLN) 2h antes de adicionar paclitaxel. Observamos que como ya se había demostrado paclitaxel induce reducción de la expresión de PTP1B, y esta degradación es inhibida por el ALLN, lo cual sugiere que esta la degradación de PTP1B se realiza por vía de la calpaína. Se utilizó a TNF como un control positivo de la activación de NF- κ B y también se observa que el ALLN es capaz de bloquear la degradación de I κ B α (Figura 11).

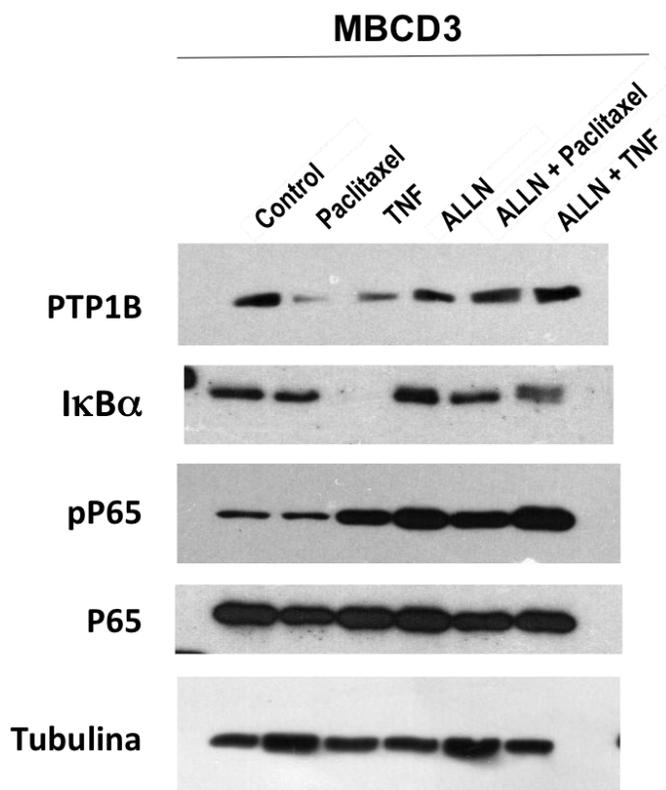


Figura 11. Efecto de la inhibición de calpaína sobre la degradación de PTP1B e I κ B α . Las células MBCD3 fueron tratadas con 20 mM de ALLN 2 h antes de ser estimuladas con paclitaxel (5 μ g/mL). El tratamiento con ALLN previene la expresión de PTP1B e I κ B α . Se separaron 20 μ g de proteína total, mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 9 % (SDS-PAGE). Se realizaron Western blot para PTP1B, I κ B α , pP65, P65 y tubulina como control de carga.

6.8 El silenciamiento de P65 induce la expresión de PTP1B e incrementa la muerte inducida por paclitaxel

Para determinar el papel de P65 en la expresión de PTP1B. Se transfectaron RNAs de interferencia, siControl y siP65, en las células PTP1B positivas, MBCDF-D5, MBCD3 y MBCDF-B3, con 100 pmoles de los siRNAs. Se analizó el silenciamiento de P65 por Western blot. Observamos que P65 disminuye su expresión con el siRNA específico de P65. El silenciamiento de P65 induce una mayor expresión de PTP1B (Figura 12A). Por otro lado, se analizó el efecto del silenciamiento de P65 sobre la muerte inducida por paclitaxel. Por lo cual, se transfectaron las células PTP1B positivas con siRNA control y de P65, 24 h post-transfección las células fueron tratadas con 0, 0.05, 0.5 y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de paclitaxel por 48 h. Se observó que el silenciamiento de P65 potencia la muerte inducida por paclitaxel comparado con las células a las cuales no se les inhibió el p65. Estos resultados apoyan el papel de NF-kB en la resistencia a paclitaxel en las células de cáncer de mama PTP1B positivas.

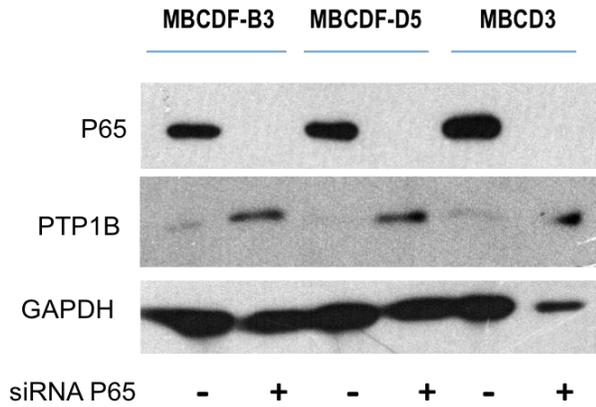
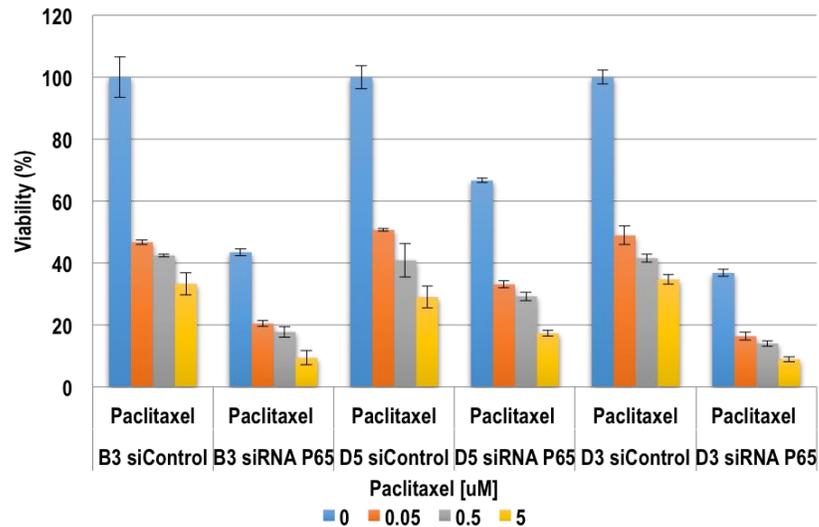
A**B**

Figura 12. Efecto del silenciamiento de NF- κ B sobre la expresi3n de PTP1B. (A) Se realiz3 transfecci3n del siRNA de P65 a las c3lulas PTP1B positivas (MBCDF3, MBCDF-D5, MBCD5-B3). (B) Ensayo de viabilidad en c3lulas PTP1B positivas y silenciadas para P65. El silenciamiento de P65 reduce de forma significativa la viabilidad celular y potencia el efecto citot3xico del paclitaxel. Se separaron 20 μ g de prote3na total, mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 9 %. Se separaron 20 μ g de prote3na total, mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 9 % (SDS-PAGE).

7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El paclitaxel es uno de los medicamentos de quimioterapia más utilizados en el tratamiento del cáncer de mama. La resistencia innata o adquirida es una de las principales causas de la falla a tratamiento en estas pacientes. Por lo cual, entender los mecanismos de resistencia a este fármaco es de vital importancia para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. En el presente trabajo estudiamos el papel del factor de transcripción NF- κ B como un potencial mecanismo de respuesta en células de cáncer de mama PTP1B positivas. Aportamos evidencia que la expresión de PTP1B correlaciona con un incremento en los niveles de expresión de algunos miembros de la familia del factor de transcripción NF- κ B. En particular, la subunidad P65 se encuentra en su forma fosforilada activa, esto sugiere un potencial papel de NF- κ B en este tipo de células de cáncer de mama. Además, el paclitaxel indujo una mayor activación de NF- κ B, un incremento en la proteína anti-apoptótica, Bcl-2 y degradación de PTP1B, indicando que paclitaxel está activando vías anti-apoptóticas mediadas por NF- κ B en células de cáncer de mama PTP1B positivas.

El cáncer de mama es la neoplasia maligna más frecuente y la segunda causa de muerte en mujeres, su tratamiento incluye diversos tipos de terapias, dentro de las que se encuentran las terapias blanco, radioterapia y agentes citotóxicos. En este último grupo, el paclitaxel forma parte de los esquemas estándar para el manejo de los pacientes en el escenario adyuvante y metastásico debido a que presenta buena tasa de respuesta objetiva y ha demostrado incrementar la supervivencia. Este agente ejerce su acción al unirse a la superficie interna de la β tubulina promoviendo la polimerización de los microtúbulos, los cuales son parte fundamental del citoesqueleto de las células

eucariotas, ya que participan en el tránsito de organelos, moléculas intracelulares, señales de transducción y fundamentalmente en la división celular, durante la cual desempeñan un papel crítico en la función del huso mitótico, segregación de cromosomas y citocinesis. La principal limitante para la efectividad del paclitaxel es el desarrollo de resistencia, la cual se presenta en más del 90 % de los pacientes que fallecen por esta enfermedad [8].

Dentro de la biología del cáncer mama, la expresión de moléculas que participan en la señalización, proliferación, supervivencia y resistencia a la apoptosis es muy variada debido a que se trata de una neoplasia heterogénea conformada por distintos subtipos celulares. En las últimas décadas se ha tratado de encontrar diferentes marcadores pronóstico y de respuesta a fármacos. Hasta el momento solo la expresión de receptores hormonales y la sobreexpresión de HER2 son los únicos marcadores validados y que son usados para el tratamiento específico de las pacientes. Sin embargo, la búsqueda de nuevos marcadores continúa debido a que existen subgrupos que no se benefician de los marcadores antes mencionados. Entre las moléculas que confieren un fenotipo característico sobresale la fosfatasa de tirosina PTP1B, la cual ha sido implicada en el desarrollo y progresión de la enfermedad [25, 26]. Previamente, se ha reportado la relación entre PTP1B y HER2, así como su importancia en la proliferación, migración celular [28]; específicamente como un marcador de resistencia a fármacos de quimioterapia como docetaxel y paclitaxel [29]. Sin embargo, el mecanismo de cómo PTP1B participa en la resistencia a estos fármacos se desconoce. En este trabajo confirmamos que las células de cáncer de mama con expresión de PTP1B son resistentes al efecto citotóxico de paclitaxel.

El factor nuclear κ B (NF- κ B) es una familia de factores de transcripción, los cuales son activados en respuesta a múltiples y variados estímulos entre los que se encuentran el daño intracelular generado por fármacos y promueve la regulación de genes que participan en la proliferación, invasividad e inhibición de la apoptosis [31]. Dado que observamos una correlación positiva entre la expresión basal de NF- κ B y PTP1B, evaluamos el papel de este factor de transcripción en la resistencia a paclitaxel, inicialmente observamos que al exponer a las células a dosis crecientes de paclitaxel se inducía la degradación de I κ B α y la fosforilación de P65. En la literatura, se ha propuesto que la activación de NF- κ B inducida por paclitaxel favorece la apoptosis en líneas celulares de cáncer de mama; sin embargo, como demostramos en este estudio, el efecto de la activación de este factor de transcripción inducida por paclitaxel en la muerte celular puede ser dual y favorecer la resistencia a la apoptosis [32]. Interesantemente, en las células de cáncer de mama PTP1B positivas, el tratamiento con paclitaxel incremento los niveles de Bcl-2, sugiriendo que la activación de la vía de NF- κ B promueve la resistencia a paclitaxel a través de la inhibición de la apoptosis, la cual normalmente se produce posterior a presentar un paro mitótico prolongado.

Por otra parte, el tratamiento con paclitaxel indujo una degradación de la fosfatasa PTP1B. Esta degradación esta mediada por la calpaína, ya que al utilizar un inhibidor de esta encontramos que se inhibe la degradación de PTP1B inducida por paclitaxel. En la literatura se ha reportado que paclitaxel es capaz de activar a la calpaína y movilizar calcio intracelular [33, 34]. Por otra parte, PTP1B es un conocido sustrato de calpaína y ambas moléculas están implicadas en la regulación de invadopodia [35, 36]. Esto apoya el hecho de que paclitaxel induzca la degradación de PTP1B y la cual es revertida por el

ALLN. Por otra parte, ALLN también revierte la degradación de $I\kappa B\alpha$ inducida por paclitaxel. Estos datos sugieren que la degradación de PTP1B e $I\kappa B\alpha$ están mediados por la activación de la calpaína. Es conocido que paclitaxel moviliza calcio intracelular, un paso indispensable para la activación de la calpaína [33, 37].

Además, al silenciar la expresión P65 previo a la exposición con paclitaxel se observa un incremento significativo en la expresión de PTP1B, sugiriendo que NF- κ B ejerce una regulación negativa de PTP1B. Por otro lado, el silenciamiento de P65 aumento la muerte mediada por paclitaxel. Los resultados anteriores hacen suponer que la activación de vía de NF- κ B promueve la resistencia a paclitaxel en estas células de cáncer de mama PTP1B positivas, a través del aumento de Bcl-2. La importancia de NF- κ B en la clínica ya se ha empezado a abordar; en pacientes con cáncer de mama sin tratamiento, se ha encontrado sobreexpresión de NF- κ B a nivel nuclear y esta correlaciona con una menor respuesta al tratamiento [15].

La información generada en este estudio es útil ya que podría servir como base para realizar estudios clínicos y establecer si la expresión de PTP1B y NF- κ B podrían ser considerados como factores predictivos de respuesta al tratamiento con paclitaxel, lo cual ayudaría a una mejor selección de los pacientes. Adicionalmente, el saber que NF- κ B promueve la resistencia a paclitaxel abre la oportunidad para evaluar la adición de fármacos inhibidores de P65 al tratamiento con este fármaco.

8. REFERENCIAS

1. Torre LA, Siegel RL, Ward EM, Jemal A. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2016;25(1):16-27. doi:10.1158/1055-9965.EPI-15-0578.
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin*. 2016;66(1):7-30. doi:10.3322/caac.21332.
3. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359-86. doi:10.1002/ijc.29210.
4. Dieci MV, Orvieto E, Dominici M, Conte P, Guarneri V. Rare breast cancer subtypes: histological, molecular, and clinical peculiarities. *Oncologist*. 2014;19(8):805-13. doi:10.1634/theoncologist.2014-0108.
5. Arce-Salinas C, Lara-Medina FU, Alvarado-Miranda A, Castaneda-Soto N, Bargallo-Rocha E, Ramirez-Ugalde MT et al. [Evaluation of breast cancer treatment at a tertiary-level institution with Popular Health Insurance in Mexico]. *Rev Invest Clin*. 2012;64(1):9-16.
6. Esteva FJ, Valero V, Pusztai L, Boehnke-Michaud L, Buzdar AU, Hortobagyi GN. Chemotherapy of metastatic breast cancer: what to expect in 2001 and beyond. *Oncologist*. 2001;6(2):133-46.
7. Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc*. 1971;93(9):2325-7.
8. Jordan MA, Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(4):253-65. doi:10.1038/nrc1317.
9. Parker AL, Kavallaris M, McCarroll JA. Microtubules and their role in cellular stress in cancer. *Front Oncol*. 2014;4:153. doi:10.3389/fonc.2014.00153.
10. Aggarwal BB, Shishodia S, Takada Y, Banerjee S, Newman RA, Bueso-Ramos CE et al. Curcumin suppresses the paclitaxel-induced nuclear factor-kappaB pathway in breast cancer cells and inhibits lung metastasis of human breast cancer in nude mice. *Clin Cancer Res*. 2005;11(20):7490-8. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-1192.
11. Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer*. 2013;12:86. doi:10.1186/1476-4598-12-86.
12. Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell*. 2008;132(3):344-62. doi:10.1016/j.cell.2008.01.020.
13. Godwin P, Baird AM, Heavey S, Barr MP, O'Byrne KJ, Gately K. Targeting nuclear factor-kappa B to overcome resistance to chemotherapy. *Front Oncol*. 2013;3:120. doi:10.3389/fonc.2013.00120.
14. Zhang W, Ding W, Chen Y, Feng M, Ouyang Y, Yu Y et al. Up-regulation of breast cancer resistance protein plays a role in HER2-mediated chemoresistance through PI3K/Akt and nuclear factor-kappa B signaling pathways in MCF7 breast cancer cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2011;43(8):647-53. doi:10.1093/abbs/gmr050.
15. Montagut C, Tusquets I, Ferrer B, Corominas JM, Bellosillo B, Campas C et al. Activation of nuclear factor-kappa B is linked to resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *Endocr Relat Cancer*. 2006;13(2):607-16. doi:10.1677/erc.1.01171.
16. Chuang SE, Yeh PY, Lu YS, Lai GM, Liao CM, Gao M et al. Basal levels and patterns of anticancer drug-induced activation of nuclear factor-kappaB (NF-kappaB), and its attenuation by tamoxifen, dexamethasone, and curcumin in carcinoma cells. *Biochem Pharmacol*. 2002;63(9):1709-16.
17. Zhou Y, Eppenberger-Castori S, Eppenberger U, Benz CC. The NFkappaB pathway and endocrine-resistant breast cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2005;12 Suppl 1:S37-46. doi:10.1677/erc.1.00977.

18. Jones RL, Rojo F, A'Hern R, Villena N, Salter J, Corominas JM et al. Nuclear NF-kappaB/p65 expression and response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Pathol.* 2011;64(2):130-5. doi:10.1136/jcp.2010.082966.
19. Jiang ZX, Zhang ZY. Targeting PTPs with small molecule inhibitors in cancer treatment. *Cancer Metastasis Rev.* 2008;27(2):263-72. doi:10.1007/s10555-008-9113-3.
20. Ostman A, Hellberg C, Bohmer FD. Protein-tyrosine phosphatases and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(4):307-20. doi:nrc1837 [pii]
- 10.1038/nrc1837.
21. Andersen JN, Mortensen OH, Peters GH, Drake PG, Iversen LF, Olsen OH et al. Structural and evolutionary relationships among protein tyrosine phosphatase domains. *Mol Cell Biol.* 2001;21(21):7117-36. doi:10.1128/MCB.21.21.7117-7136.2001.
22. Elchebly M, Payette P, Michaliszyn E, Cromlish W, Collins S, Loy AL et al. Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science.* 1999;283(5407):1544-8.
23. Dube N, Tremblay ML. Beyond the metabolic function of PTP1B. *Cell Cycle.* 2004;3(5):550-3.
24. Bourdeau A, Dube N, Tremblay ML. Cytoplasmic protein tyrosine phosphatases, regulation and function: the roles of PTP1B and TC-PTP. *Curr Opin Cell Biol.* 2005;17(2):203-9. doi:S0955-0674(05)00015-3 [pii]
- 10.1016/j.ceb.2005.02.001.
25. Julien SG, Dube N, Read M, Penney J, Paquet M, Han Y et al. Protein tyrosine phosphatase 1B deficiency or inhibition delays ErbB2-induced mammary tumorigenesis and protects from lung metastasis. *Nat Genet.* 2007;39(3):338-46. doi:ng1963 [pii]
- 10.1038/ng1963.
26. Bentires-Alj M, Neel BG. Protein-tyrosine phosphatase 1B is required for HER2/Neu-induced breast cancer. *Cancer Res.* 2007;67(6):2420-4. doi:0008-5472.CAN-06-4610 [pii]
- 10.1158/0008-5472.CAN-06-4610.
27. Soysal A, Yuksel B, Czermin B, Aydemir S, Tugcu B, Aysal F et al. Case study of sporadic mitochondrial disease with myotonic discharges and optic atrophy. *Muscle Nerve.* 47(2):308-9. doi:10.1002/mus.23641.
28. Hernández-Flores O, Esparza-López J, Escobar-Arriaga E, León-Rodríguez E, Ibarra-Sánchez MJ. Sobreexpresión de PTP1B induce mayor proliferación celular en cultivos primarios de cáncer de mama. *Gaceta Mexicana de Oncología* 2013;12(1):4-9.
29. J.C. G-D, López-Zelada KA, Escobar-Arriaga E, León-Rodríguez E, Esparza-López J, Ibarra-Sánchez MJ. PTP1B como factor predictivo de respuesta a paclitaxel y docetaxel en cultivos primarios de cáncer de mama. *GAMO.* 2014;13(2):91-6.
30. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015;65(2):87-108. doi:10.3322/caac.21262.
31. Mitchell S, Vargas J, Hoffmann A. Signaling via the NFkappaB system. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2016;8(3):227-41. doi:10.1002/wsbm.1331.
32. Huang Y, Fang Y, Dziadyk JM, Norris JS, Fan W. The possible correlation between activation of NF-kappaB/IkappaB pathway and the susceptibility of tumor cells to paclitaxel-induced apoptosis. *Oncol Res.* 2002;13(2):113-22.
33. Liao PC, Tan SK, Lieu CH, Jung HK. Involvement of endoplasmic reticulum in paclitaxel-induced apoptosis. *J Cell Biochem.* 2008;104(4):1509-23. doi:10.1002/jcb.21730.
34. Pineiro D, Martin ME, Guerra N, Salinas M, Gonzalez VM. Calpain inhibition stimulates caspase-dependent apoptosis induced by taxol in NIH3T3 cells. *Exp Cell Res.* 2007;313(2):369-79. doi:10.1016/j.yexcr.2006.10.020.

35. Frangioni JV, Oda A, Smith M, Salzman EW, Neel BG. Calpain-catalyzed cleavage and subcellular relocation of protein phosphotyrosine phosphatase 1B (PTP-1B) in human platelets. *EMBO J.* 1993;12(12):4843-56.
36. Cortesio CL, Chan KT, Perrin BJ, Burton NO, Zhang S, Zhang ZY et al. Calpain 2 and PTP1B function in a novel pathway with Src to regulate invadopodia dynamics and breast cancer cell invasion. *J Cell Biol.* 2008;180(5):957-71. doi:10.1083/jcb.200708048.
37. Benbow JH, Mann T, Keeler C, Fan C, Hodsdon ME, Lolis E et al. Inhibition of paclitaxel-induced decreases in calcium signaling. *J Biol Chem.* 2012;287(45):37907-16. doi:10.1074/jbc.M112.385070.