



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIA MEDICAS Y
NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN**

Análisis de la expresión de los receptores de la familia
HER en cultivos primarios de cáncer de mama.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

NOMBRE DEL ALUMNO
SARAI VELASCO MOLINA

DIRECTOR DE TESIS:
DRA. MARÍA DE JESÚS IBARRA SÁNCHEZ

ASESOR INTERNO
M. EN C. CATALINA MACHUCA RODRÍGUEZ.



Ciudad de México., 2018



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

	Pág.
1. RESUMEN	6
2. INTRODUCCIÓN	7
2.1 Factor de Crecimiento Epidermico (EGF)	9
2.2 Familia del Receptor del Factor de Crecimiento Epidermico (EGFR)	10
2.2.1 HER1/EGFR	11
2.2.2 HER2	14
2.2.3 HER3	15
2.2.4 HER4	15
3. JUSTIFICACIÓN	18
4. HIPÓTESIS	19
5. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	20
5.1 Objetivo general	20
5.2 Objetivos particulares	20
6. MATERIAL Y METODOS	21
6.1 Cultivos celulares	21
6.2 Ensayos de proliferacion celular	22
6.3 Extracción y cuantificacion de proteína	22
6.4 Electroforesis y Transferencia	23
6.5 Western Blot	23
6.6 Revelado	23
7. RESULTADOS	24
8. DISCUSIÓN	28
9. CONCLUSIONES	31
10. BIBLIOGRAFÍA	32

ABREVIATURAS

AR	Amfirregulinas
BTC	Betacelulina
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico (Del inglés “Epidermal growth factor”)
EGFR	Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (Del inglés “Epidermal growth factor receptor”)
EPR	Epirregulina
GRB2	Proteína de Unión al Receptor de Factores de Crecimiento 2, (del ingles “Growth factor receptor-bound protein 2”)
HB-EGF	Factor de crecimiento de unión a la heparina (del ingles “heparin binding EGF like growth factor”)
HER1	Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico Humano 1 (Del inglés “Human Epidermal Growth Factor Receptor 1”)
HER2	Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico Humano 2 (Del inglés “Human Epidermal Growth Factor Receptor 2”)
HER3	Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico Humano 3 (Del inglés “Human Epidermal Growth Factor Receptor 3”)
HER4	Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico Humano 4 (Del inglés “Human Epidermal Growth Factor Receptor 4”)
JAK	Proteína cinasa Janus (Del inglés “Janus kinase”)
MAPK	Cinasa Activada por Mitogenos (Del inglés “Mitogen-Activated Protein Kinase”)
MEK	Cinasa cinasa activada por mitogenos. (Del inglés “Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase”)
MET	Receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (También llamado HGFR) (Del inglés hepatocyte growth factor receptor).
MTT	Bromuro de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol]
NRGs	Neurregulinas

PI3K	Fosfatidilinositol 3 cinasa (Del inglés “phospahtidyl-inositol 3-kinase”)
RE	Receptor de Estrógeno
RP	Receptor de Progesterona
SH2 y 3	Dominio homologo a Src-2 y 3 (Del inglés “Src homology domain 2 and 3”)
SOS1/2	GTPasa de Ras (Del inglés “Son of sevenless 1 y 2”)
STAT	Transductor de señales y activador de transcripción (del inglés “signal transducer and activator of trnascription”)
TGFα	Factor de crecimiento transformante α (del inglés Transforming growth factor α)
VEGFR	Receptor del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (Del inglés “vascular endothelial growth factor receptor”).

DEDICATORIAS

A mí amada hija Katya Azeneth, porque tú me impulsas a querer ser cada día mejor en todos los aspectos.

A mis padres, por su infinita paciencia y comprensión, porque gracias a ellos soy lo que soy y mis logros son primero de ellos.

A mi madre Gloria Molina por su apoyo incondicional, por tus desvelos y sacrificios, por enseñarme con el ejemplo y mostrarme el valor de ser perseverante ante la adversidad.

A mi padre Marcos Velasco, por su apoyo incondicional y sabios consejos; por la dedicación que has tenido a tus hijos y por enseñarme el valor del tiempo e impulsarme cada vez que me detengo.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María de Jesús Ibarra Sánchez, por su infinita paciencia hacia conmigo, por haberme aceptado como tesista y guiarme durante este proceso, por haberme enseñado un tema que era nuevo para mí.

A la Mtra. Catalina Machuca Rodríguez, por su enorme e incondicional apoyo y consejos para terminar esta tesis.

A los sinodales que fueron asignados para la revisión de esta tesis, por sus aportaciones y consejos para poder culminarla.

A Mariscal, Abigail y Alma Gloria, por su apoyo incondicional y por alentarme a culminar esta Tesis.

A Daniel por dedicar parte de tu tiempo en mi para que yo pudiera culminar esta etapa sin dejar atrás mis metas.

Esta Tesis se realizó en la Red de Apoyo a la Investigación (RAI), Universidad Nacional Autónoma de México e Instituto Nacional de Ciencia Médica y Nutrición Salvador Zubiran en conjunto con la Unidad de Bioquímica, INCMNSZ, bajo la dirección de la Dra. María de Jesús Ibarra Sánchez y el Dr. José Esparza López.

1. RESUMEN

El cáncer de mama se ha convertido en la primera causa de muerte por cáncer en las mujeres mexicanas. En nuestro país la mayoría de los casos es detectado en etapas avanzadas y las tasas de respuesta al tratamiento son bajas, lo que provoca una progresión de la enfermedad. Se han implicado a los receptores de la familia HER en el desarrollo y progresión del cáncer de mama, por lo que se han desarrollado diversos fármacos dirigidos contra estos receptores, tales como Trastuzumab y Pertuzumab que son dirigidos contra HER2 y Lapatinib contra HER1 y HER2. La resistencia a los fármacos es uno de los problemas que las pacientes presentan, y por esta razón es indispensable identificar nuevos marcadores pronóstico y predictivos de respuesta para desarrollar nuevas terapias blanco más personalizadas (Labidi et. al, 2016). En el presente trabajo se realizó la caracterización de la expresión de los receptores de la familia HER en cultivos primarios de cáncer de mama y su relación con la proliferación celular. Se utilizaron 10 cultivos primarios de cáncer de mama y la línea celular MCF-7 como control positivo; se realizaron pruebas de proliferación celular por el método colorimétrico del MTT, también se hicieron pruebas de western blot para determinar la expresión de los receptores de la familia HER (HER1, HER2, HER3 y HER4). Nuestros resultados demuestran la existencia de cuatro patrones de expresión diferentes en nuestra población estudiada, el patrón 1A se caracteriza por la expresión de HER1, la presencia de la forma truncada de HER2, HER3 y HER4. El patrón 1B, difiere del 1A, por una mayor expresión de HER1. El patrón 2A que se caracteriza por la expresión de HER2, HER3 y HER4. El patrón 2B presenta una mayor expresión de HER2 comparado con el 2A. Un hallazgo interesante en esta tesis es la relación mutuamente excluyente entre HER1 y HER2, es decir, cuando se expresa HER1, HER2 en su forma completa no se expresa; sin embargo, se expresa su forma truncada. Los patrones de expresión mostraron tasas de proliferación variadas. Estos resultados aportan información importante para conocer más a fondo acerca de la biología del cáncer de mama y que en estudios posteriores tomando en cuenta esta información se puedan establecer estrategias nuevas para combatir éste tipo de cáncer.

2. INTRODUCCION

El cáncer de mama es la neoplasia más frecuente en la población femenina a nivel mundial, de acuerdo a los datos GLOBOCAN (que engloba información de la IARC–International Agency for Research on Cancer y de WHO–World Health Organization). En el año 2012 se presentaron 1.67 millones de nuevos casos de cáncer de mama que representan el 25% del total de todas las neoplasias y se presentaron 522000 decesos (Ferlay et. al, 2015). En México, la incidencia del cáncer de mama aumento su frecuencia un 5.9% en las mujeres de 60 a 65 años de edad, este aumento fue más significativo en el centro y sur del país. La tasa de mortalidad también mostró un aumento del 0.4% entre las mujeres de 85 años o más. (Soto et. al, 2016). La etiología del cáncer de mama es multifactorial, las causas que se han descrito en la literatura son del tipo genético, ambiental, factores hormonales y reproductivos (Stuckey 2011). La mayor parte de los casos de mujeres con cáncer de mama es esporádico, es decir, no presentan antecedentes familiares y solo entre un 15% y 20% presentan antecedentes familiares. Por otra parte, el cáncer de mama hereditario corresponde alrededor de un 10-15% de todos los tumores malignos de mama, entre éstos se encuentran los tumores causados por mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 (Fackental et. al, 2007). Los factores pronóstico del cáncer de mama son el tamaño del tumor, grado histológico y la presencia de ganglios axilares positivos. Algunos de estos factores están incluidos en el sistema de clasificación TNM (la T corresponde a tumor, la N a nódulo o ganglio y la M corresponde a metástasis), esta clasificación permite agrupar a las pacientes según la progresión tumoral que se relaciona con la probabilidad de recidiva (Singletary et. al, 2006). Los avances en Biología Molecular han llevado a la identificación de nuevos marcadores tumorales predictivos y de respuesta, los cuales han llevado al desarrollo de terapias dirigidas contra estos marcadores. Los marcadores validados hasta la fecha para el diagnóstico y pronóstico del cáncer de mama en la práctica clínica son: Los receptores de estrógeno (RE), receptores de progesterona (RP), y el receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 [del inglés Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2)] (Harbeck N., 2011). En años recientes, mediante microarreglos se obtuvo la clasificación molecular del cáncer de mama que incluye al menos cinco subtipos: luminal A, luminal B, HER2-positivo, basaloide y normal-like (Tabla1) (Eliyatkın et. al, 2015). Los tumores de mama del tipo luminal son de

mejor pronóstico y se caracterizan por expresar receptores hormonales de estrógenos y progesterona. El subtipo luminal A es el más frecuente, con 67%, estos expresan RE, RP, sin expresión de HER2. El subtipo luminal B presenta RE, RP y HER2. Los tumores luminales al expresar los receptores hormonales se pueden beneficiar de tratamientos con tamoxifeno o inhibidores de aromatasas (Eliyatkın et. al, 2015). El subtipo HER2 positivo no expresa receptores hormonales y presentan amplificación del gen de HER2 este subtipo es de mal pronóstico y suele asociarse con mayor metástasis y peor supervivencia global; estos tipos de tumores se benefician de terapias blanco anti-HER2 como trastuzumab, pertuzumab y lapatinib (Labidi et. al, 2016). El subtipo basaloide se caracteriza por no expresar receptores hormonales y HER2; en cambio expresan citoqueratinas características de la capa basal (CK5/6, CK17) y la expresión de genes como Rb y p53 que están relacionados con la proliferación celular (Imigio et. al, 2011). Estos tumores suelen sobre expresar el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Este subtipo se asocia a las mutaciones en BRCA1 (Arrechea et. al, 2011). Todos los antecedentes antes descritos han demostrado que el cáncer de mama es una enfermedad heterogénea, por lo que es importante estudiar y comprender el comportamiento biológico de los diversos subtipos del cáncer de mama, por medio de la identificación de nuevos biomarcadores pronósticos y predictivos que sean útiles para el tratamiento de las pacientes con cáncer de mama como son los receptores de factores de crecimiento.

Tabla 1. Clasificación molecular del cáncer de mama.

SUBTIPO	EXPRESION DE RECEPTORES	PRONOSTICO
Luminal A	RE (+) y/o RP (+) HER2 -	Buen pronostico
Luminal B	RE (+) y/o RP (+) HER2 +	Pronostico variable
HER2 sobreexpresado	RE (-), RP (-) HER2 (+)	Pobre pronostico
Basaloide/Triple negativo	RE (-), RP (-) HER2 (-) y/o EGFR (+)	Pobre pronostico
Normal breast-like	Genes característicos de tejido adiposo	Buen pronostico

Nota: Fuente: Modificado de Zhiyuan Hu, Cheng Fan, et. al, *The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms*, BMC Genomics 2006, 7(96):1-12.

2.1 Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF)

El factor de crecimiento epidérmico (EGF, del inglés epidermal growth factor) fue descubierto por Stanley Cohen y Rita Levi-Montalcini en el año de 1962 y fueron galardonados con el premio Nobel de Medicina del año 1986 por este descubrimiento. El EGF es un péptido de 53 aminoácidos, con un peso molecular de 6.2 kDa que promueve la proliferación, la diferenciación y la supervivencia celular a través de la unión de EGF a su receptor (EGFR) que se encuentra presente en la membrana celular. La familia de factores de crecimiento similares a EGF son ligandos de la familia de receptores HER (HER1, HER2, HER3 y HER4). El dominio EGF está presente en todos los ligandos de la familia, que se caracterizan por un determinado espaciamiento entre 6 cisteínas a lo largo de una región de 35–40 aminoácidos, lo que resulta en tres giros intramoleculares unidos por un puente disulfuro, críticos para el mantenimiento de la estructura del dominio (Singh et. al, 2016). La especificidad de los ligandos nos permite dividirlos en tres grupos: el primero incluye el EGF, el factor de crecimiento transformante α (TGF α , del inglés Transforming growth factor α) y la amfirregulina (AR), los cuales se unen a HER1; el segundo incluye la betacelulina (BTC), el factor de crecimiento de unión a heparina (HB-EGF) y la epirregulina (EPR), los cuales

muestran una especificidad dual uniendo tanto HER1 como HER4. El tercer grupo se compone de las neuregulinas (NRGs) (también llamada Heregulinas, HRG) que forman dos subgrupos; las que unen HER3 y HER4 (NRG1 y NRG2) y las que se unen a HER4 (NRG3 y NRG4) (Singh, 2016).

2.2 Familia de Receptores del Factor de Crecimiento Epidérmico.

La familia del EGFR son receptores con actividad tirosina cinasa conocida como familia del EGFR o familia HER, consta de cuatro miembros que son: EGFR/HER1/ErbB1, HER2/ErbB2/neu (Receptor del Factor de crecimiento epidérmico Humano 2), HER3/ErbB3 (Receptor del Factor de crecimiento epidérmico Humano 3), HER4/ErbB4 (Receptor del Factor de crecimiento epidérmico Humano 4), todos ellos tienen una región extracelular que se divide en cuatro dominios denominados I, II, III y IV. Se ha propuesto que los dominios I y III participan en la unión al ligando mientras que los dominios II y IV están involucrados en la dimerización entre receptores. También cuentan con una región transmembranal y una región intracelular que contiene el dominio de tirosina cinasa, este está seguido por un extremo carboxilo terminal con sitios de autofosforilación (Figura 1) (Wells, 2000). HER2 no tiene ligando, pero puede formar heterodímeros con los otros miembros de la familia (Zerecero et. al, 2012). HER3 es el único miembro de la familia que carece de actividad cinasa debido a sustituciones de residuos del dominio cinasa fundamentales para su función (Zerecero et. al, 2012).

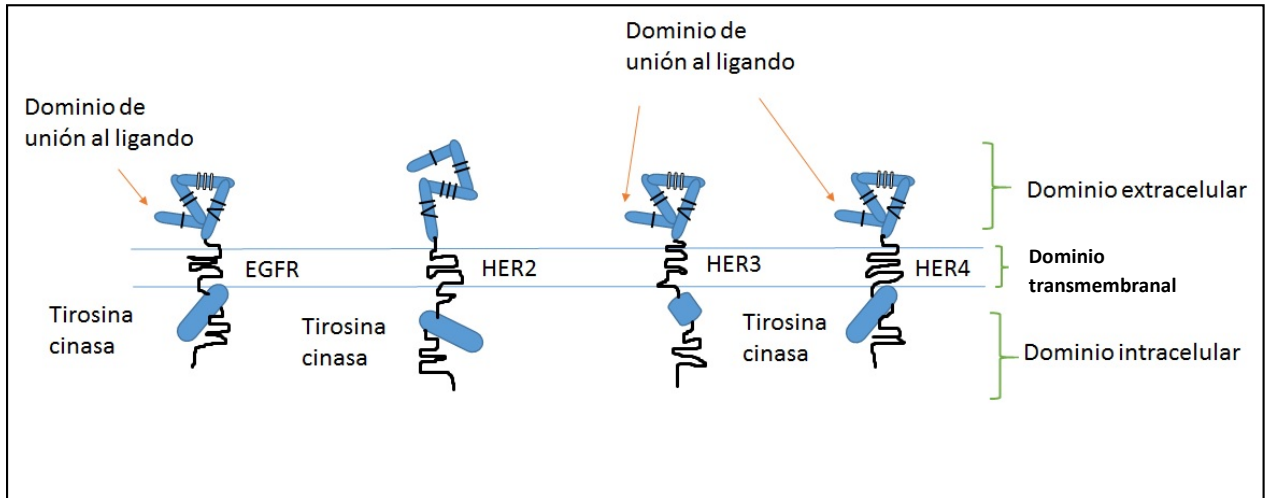


Figura.1 **Estructura de la familia de Receptores HER.** Se muestran los 4 miembros de la familia EGFR. Cada receptor contiene tres dominios, el dominio extracelular, el dominio transmembranal y el dominio intracelular; El dominio extracelular está dividido en 4 subdominios: I, II, III, IV, y contiene la zona de unión al ligando, con excepción de HER2. En el dominio intracelular se encuentra el dominio tirosina cinasa, con excepción de HER3.

Nota: Fuente: Modificado de Baselga Jose, Swain Sandra M. Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3, Nature Review, Julio de 2009.

2.2.1 HER1/EGFR/ErbB1

En humanos, el gen que codifica el EGFR (HER1) se encuentra en el brazo corto del cromosoma 7 (p13-p12). Este gen está compuesto por 28 exones que ocupan un segmento de 75 kb, el cual codifica a una proteína precursora de 1210 aminoácidos que posee una secuencia líder hidrofóbica corta en su extremo N-terminal usada para su inserción en la membrana, siendo posteriormente eliminada por un proceso proteolítico, y quedan finalmente 1186 aminoácidos, los que forman una sola cadena polipeptídica. El receptor maduro es una glicoproteína integral de membrana de aproximadamente 170 kDa que está constituida por tres dominios, uno extracelular en el amino-terminal donde se encuentra el sitio de unión al ligando, un único dominio transmembranal y un dominio citoplásmico hacia el carboxilo-terminal, en el que se localiza el dominio catalítico responsable de la actividad tirosina cinasa. Más de 20 % de la estructura del receptor está representado por residuos glicosilados. Las cadenas glicosílicas del receptor parecen estar implicadas en el correcto plegamiento del mismo, su transporte a la superficie celular y la adquisición de sus funciones (Arndt et. al, 2014).

La unión del EGF a su receptor induce una serie de eventos moleculares que conducen a la activación de los factores de transcripción nuclear y la división celular. La unión del ligando al receptor induce la dimerización de este último, con un consecuente cambio conformacional (Yarden et.al, 2001). La ruta de señalización mejor conocida por la activación de EGFR es la vía de las MAPKs (Miyamoto et. al, 2017). Ésta se inicia por el anclaje de la proteína adaptadora GRB2 (Del inglés Growth factor receptor-bound protein 2) que posee un dominio SH2 que interacciona con los residuos de fosfotirosina del receptor, y dos dominios SH3 (por Src homology domain 3), con los que interacciona con factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEFs, por guanine nucleotide exchange factors) tales como SOS1/2 (por Son of sevenless 1 y 2). Tras la formación del complejo GRB2/SOS, se estimula el intercambio de nucleótidos en Ras, transformando Ras-GDP (forma inactiva) en Ras-GTP (forma activa). Ras activo es capaz de interactuar y activar Raf-1, A-Raf y B-Raf (o más genéricamente denominadas MAPKKKs, por mitogen-activated protein kinase kinase kinases). Estas últimas a su vez fosforilan a las cinasas duales de tirosina/treonina MEK1/2 (del acronismo MAP/ERK kinases 1 y 2, también denominadas MAPKKs, por mitogen-activated protein kinase kinases), y éstas finalmente fosforilan a las serina/treonina cinasas ERK1/2 (por extracellular-regulated kinases 1 y 2, también denominadas MAPKs) (Wee, 2017). Una vez que las ERK1/2 son activadas, éstas pueden fosforilar a diferentes proteínas blanco localizadas en la membrana plasmática y en el citoplasma, dando lugar a la activación de otras vías de señalización o traslocarse al núcleo y fosforilar diversos factores de transcripción como son, c-Myc, c-Jun, c-Fos, Elk-1 y p62TCF, produciendo así la activación o la represión transcripcional de determinados genes (Miyamoto et. al, 2017). La señalización de EGFR también activa otras vías en la célula que incluyen la proteína cinasa C, las vías Janus cinasa (JAK)/ transductor de señales y activador de transcripción (STAT del inglés signal transducer and activator of trnscription) y la fosfoinositol-3-cinasa (PI3K, del inglés phospahtidyl-inositol 3-kinase) (Rokoski, 2014) (Fig. 2).

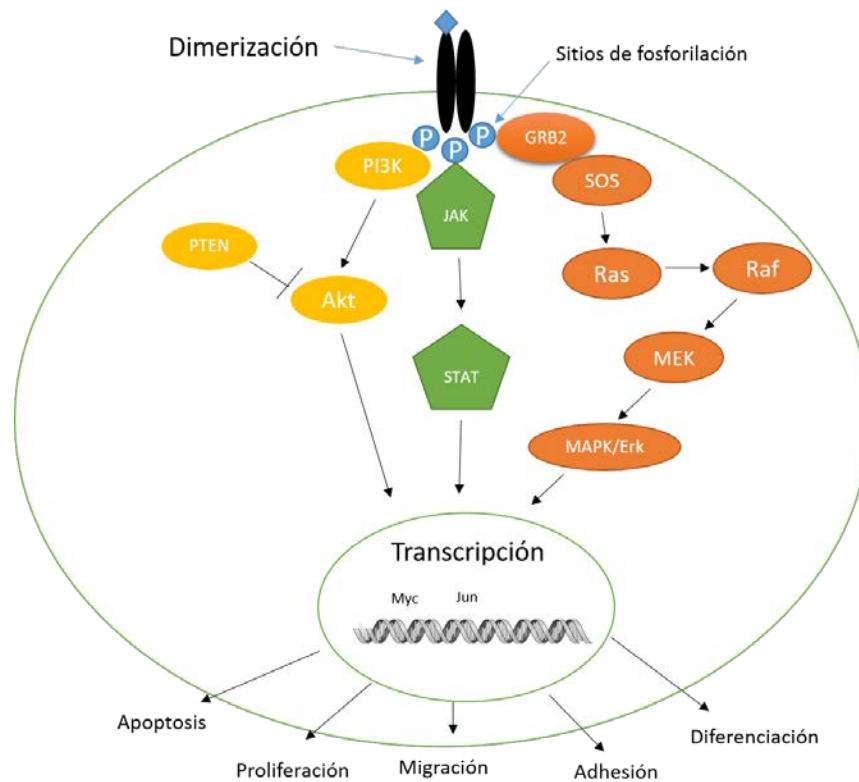


Fig. 2 Transducción de señales de HER/EGFR. La señalización por la familia HER consta de diferentes etapas. Los ligandos se unen a los receptores promoviendo su dimerización. Para simplificar se muestra un solo dímero unido a su ligando representativo de las combinaciones posibles. Tras la dimerización se fosforilan los residuos de tirosina de los receptores que reclutan diferentes proteínas adaptadoras que activan cascadas de señalización, segundos mensajeros y factores de transcripción, esto resulta en una gran variedad de respuestas celulares incluyendo apoptosis, migración, crecimiento, adhesión o diferenciación.

Nota: Tomado y Modificado de Ray M. Salgia R. Everette E. The role of EGFR Inhibition in the treatment of non-small cell lung cancer. VOKES the oncologist lung cancer. The oncologist 2009; 14:1116-1130.

Al igual que en otros factores de crecimiento y sus receptores implicados en la tumorigenesis, los posibles mecanismos de activación de la vía del EGFR incluyen sobreexpresión y/o disminución del recambio del receptor, presencia excesiva del ligando, disminución de la actividad de fosfatasa y desarrollo de receptores con actividad constitutiva de tirosina cinasa o unión al ligando aberrante que viene a contribuir en muchos procesos de la carcinogénesis: proliferación y migración celular aumentada, evasión de la apoptosis, invasión tumoral y metástasis (Eroqlu et. al, 2014).

2.2.2 HER2/erbB2/Neu

El gen *HER2/erbB2* se encuentra localizado en el cromosoma 17, en la posición 17q21, que codifica para una glicoproteína transmembranal de 185 KDa con actividad intrínseca tirosina cinasa. HER2 fue descrito por primera vez en 1984 en tumores neurales inducidos por carcinógeno en ratas. Se le denominó a este oncogén como *neu* y tenía la característica de presentar una mutación en la zona que correspondía al dominio transmembranal de la proteína. En 1985 se identificó el mismo gen en células de cáncer humanas al cual se le llamó *erbB2* (Slamon, 1987). Posteriormente, se demostró que el gen *neu* y el oncogén *HER2* eran homólogos al EGFR. Se identificó una mutación inducida en un aminoácido en el dominio transmembranal que causa la dimerización y la activación espontánea de HER2. Poco después se describió que algunas líneas celulares cancerosas, en particular, en varias líneas celulares de cáncer de mama, presentan sobreexpresión de HER2 como consecuencia de una amplificación génica. Por otra parte, se observó que las muestras de tejidos provenientes de adenocarcinomas humanos contienen también copias amplificadas del gen *HER2*. Estudios posteriores sugirieron una correlación entre la amplificación de HER2 y el pronóstico desfavorable en las pacientes con cáncer de mama en estadios tempranos (Zercero et al., 2012). A diferencia de otros receptores tirosina cinasa, HER2 carece de ligando, pero si tiene la capacidad de formar heterodímeros con los otros miembros de la familia HER, de tal manera que su actividad se modula por transfosforilación mediante HER1, HER3 o HER4 activados (Singh et. al, 2016). La heterodimerización parece ser esencial para la función eficaz del receptor. Existe evidencia que la co-expresión de HER2 y HER1 inducen transformación de fibroblastos, mientras que la co-expresión de HER2 y HER3 promueven la transformación de las células epiteliales mamarias (Bland, 2007). Los avances en Biología Molecular han llevado al desarrollo de terapias blanco anti-HER2. El anticuerpo humanizado, Trastuzumab, fue aprobado para el tratamiento de cáncer de mama metastásico a finales de los 90's. En el 2006, la FDA aprobó el uso de Lapatinib para el tratamiento de cáncer de mama metastásico, Lapatinib es una molécula pequeña que inhibe a HER1 y HER2. Finalmente, en el 2012 aparece otro anticuerpo humanizado anti-HER2, llamado Pertuzumab, el cual se utiliza en combinación con Lapatinib (Loibl et. al, 2016, Xu et. al, 2017).

2.2.3 HER3

El gen *HER3/erbb3* está localizado en el cromosoma 12, en la posición 12q13.2 y codifica una glicoproteína de 160 kDa. A diferencia del EGFR y HER2, los cuales se expresan durante la morfogénesis ductal, HER3 parecen expresarse de forma preferencial durante la morfogénesis alveolar y la lactancia (Zerecero et. al, 2012). Estos receptores interactúan con las herregulinas, lo que da como resultado la formación de los heterodímeros HER2-HER3 y HER2-HER4 y la posterior fosforilación de HER2 (Rokoski, 2014). En particular, se ha encontrado que HER3 es el socio de dimerización preferido para HER2 y juntos forman el heterodímero más mitogénico entre todos los miembros de la familia (Weitsman et. al, 2016). Varios investigadores implicaron a HER3, HER4 y las herregulinas en la patogenia y en la respuesta terapéutica del cáncer de mama. A pesar de su similitud estructural con la familia de ligandos similares al EGF, las herregulinas se unen exclusivamente al HER3 y al HER4, esto se contrapone con otros péptidos similares al EGF como el EGF-HB que une heparina, la betacelulina y epirregulina (EPR), que constituyen proteínas similares al EGF que interactúan con el HER4 y EGFR (Singh et. al, 2016). Por último, los activadores neurales y derivados del timo para las cinasas ERBB (NTAK) se obtienen por corte y empalme alternativo e interactúan con el HER3 y el HER4 para transactivar EGFR y HER2 mediante la formación de heterodímeros. Estos péptidos son capaces de estimular el crecimiento de cultivos de células cancerosas mamarias (Bland, 2007).

2.2.4 HER4

El gen *HER4/erbb4* se encuentra en el cromosoma 2 en la posición q34 y codifica a una glicoproteína de 180 kDa. Esta proteína contiene múltiples dominios ricos en cisteína, un dominio transmembranal, un dominio de tirosina cinasa, un sitio de unión de fosfatidilinositol-3 quinasa. La proteína se une y se activa por neuregulinas y otros factores e induce una variedad de respuestas celulares incluyendo mitogénesis, diferenciación, transcripción génica, proliferación celular, migración y apoptosis (Sartor et. al, 2001). Tiene un papel importante en el desarrollo del corazón, el sistema nervioso central y la glándula mamaria. Es requerido para la diferenciación normal del músculo cardíaco durante el desarrollo embrionario. HER4 juega un papel importante para el desarrollo normal del sistema nervioso central embrionario, especialmente para la migración normal de la cresta

neural y la orientación axonal. Por otro lado, es de suma importancia para la inducción de proteínas de la leche y la lactancia en la glándula mamaria (Matta et. al, 2006). Sus ligandos son las neuregulinas NRG1 (Del inglés Neuregulin 1), NRG2 (Del inglés Neuregulin 2), NRG3 (Del inglés Neuregulin 3) y NRG4 (Del inglés Neuregulin 4) y los miembros de la familia EGF- BTC (Del inglés epidermal growth factor – betacellulin), EREG (Del inglés Epiregulin) y HBEGF (Singh et. al, 2016). La unión de cualquiera de estos ligandos desencadena la dimerización del receptor y la autofosforilación en residuos de tirosina específicos que luego sirven como sitios de unión para las proteínas. La especificidad de los ligandos y la señalización se modulan mediante el empalme alternativo, el procesamiento proteolítico, y mediante la formación de heterodímeros con otros miembros de la familia EGFR, creando así múltiples combinaciones de fosfotirosinas intracelulares que activan respuestas celulares específicas. Mediante la fosforilación de SHC1 (Del inglés src homology 2 domain-containing transforming protein C1) y la activación de MAP quinasas MAPK1 / ERK2 y MAPK3 / ERK1 la isoforma JM-A (del inglés juxtamembrane domain A) CYT-1 (del inglés cytoplasmic domain 1) y la isoforma JM-B (del inglés juxtamembrane domain B) CYT-1 (del inglés cytoplasmic domain 1) fosforilan PIK3R1 (Del inglés Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit alpha), dando lugar a la activación de fosfatidilinositol 3-quinasa y AKT1 (AKT serine/threonine kinase 1) y protegen a las células contra la apoptosis (Sweeney et. al, 2000). La isoforma JM-A CYT-1 y la isoforma JM-B CYT-1 median la reorganización del citoesqueleto de actina y promueven la migración celular en respuesta a NRG1 mientras que la isoforma JM-A CYT-2 y JM-B CYT-2 carecen de la fosfotirosina que media la interacción con PIK3R1, y por lo tanto no fosforilan PIK3R1, no protegen a las células contra la apoptosis y no promueven la reorganización del citoesqueleto de actina y la migración celular (Sweeney, 2000). El procesamiento proteolítico de la isoforma JM-A CYT-1 y JM-A CYT-2 da lugar a los correspondientes dominios intracelulares solubles (4ICD) que se translocan al núcleo promoviendo la importación nuclear y activación de STAT5A, la diferenciación del epitelio mamario, proliferación y activación de la expresión génica. Los dominios intracelulares solubles en ERBB4 (4ICD) se co-localizaron con STAT5A en el promotor CSN2 para regular la transcripción de proteínas de la leche durante la lactancia (Sundvall et. al, 2007). Los dominios intracelulares solubles

en ERBB4 también pueden trasladarse a las mitocondrias y promover la apoptosis. Las mutaciones en este gen se han asociado con el cáncer (Sundvall et. al, 2007).

En la presente tesis el objetivo es caracterizar la expresión de receptores de factores de crecimiento de la familia HER y su asociación con la proliferación celular en cultivos primarios de cáncer de mama proveniente de distintos pacientes. Los resultados muestran la presencia de 4 patrones de expresión diferentes en los cultivos analizados; las células MBCD3 y MBCD23 presentaron el patrón que fue asignado como 1A el cual se caracteriza por la expresión de HER1, la presencia de la forma truncada de HER2, HER3 y HER4; los cultivos MBCDF-D5 y MBCDF-B3 fueron asignados con el patrón 1B que a diferencia del patrón 1A presentan una mayor expresión de HER1; el patrón asignado como 2A corresponde a los cultivos MBCDF, MBCD11, MBCD20 y MBCD24 y se caracteriza por la expresión de HER2, HER3 y HER4; por ultimo está el patrón 2B, el cual difiere del patrón 2A por tener una mayor expresión de HER2, los cultivos que presentan este patrón son MBCD17 y MBCD25. Referente a estos patrones de expresión encontramos una asociación interesante entre la expresión de HER1, HER2, y la forma truncada de HER2, en donde HER1 y HER2 tienen una asociación mutuamente excluyente, pero la presencia de la forma truncada de HER2 se co-expresa con HER1. La expresión de receptores de la familia HER tuvo tasas de proliferación variadas por lo que no se observó impacto sobre este último. En conclusión, la expresión únicamente fue heterogénea para HER1 y HER2, además existe una relación con respecto a la expresión de HER1, HER2 y la forma truncada de HER2. Estos patrones podrían sugerir nuevos marcadores pronósticos y predictivos de esta neoplasia.

3. JUSTIFICACION

Actualmente la investigación básica acerca de cáncer de mama se llevan a cabo principalmente *in vitro* con líneas celulares comerciales en condiciones estandarizadas, su comportamiento y biología es bien conocida, por lo que surge la interrogante de si estas líneas celulares que han sido cultivadas por muchos años se comportan de la misma manera que las células del tumor que les dio origen dado que las líneas celulares son mantenidas *in vitro* por largos periodos de tiempos con lo cual pueden ocurrir cambios genéticos y epigenéticos, en consecuencia pueden diferir del tumor que les dio origen. Por esta razón, surge la necesidad de establecer cultivos primarios provenientes de tumores de cáncer de mama extraídos de pacientes con este tipo de neoplasia y caracterizarlas en cuanto a la expresión de diferentes marcadores, como son los receptores de factores de crecimiento de la familia HER para conocer su comportamiento y utilizarlas como herramientas de estudio de la biología del cáncer de mama y así poder proponer nuevos marcadores pronóstico y predictivos de respuesta al tratamiento. Esto contribuirá a establecer una herramienta de estudio del cáncer de mama, que se encuentre lo más cercano esta patología.

4. HIPOTESIS

Cultivos primarios de diferentes pacientes de cáncer de mama presentarán patrones diferentes en la expresión de receptores de la familia HER de acuerdo a su subtipo molecular, estas diferencias tendrán efecto sobre la proliferación celular de cada cultivo.

5. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION

Objetivo General.

Caracterizar la expresión de receptores de factores de crecimiento de la familia HER y su asociación con la proliferación celular en cultivos primarios de cáncer de mama proveniente de distintos pacientes.

Objetivos particulares.

- Analizar los niveles de expresión de los receptores de la familia HER (HER1, HER2, HER3, HER4) por Western blot.
- Evaluar la proliferación de distintos cultivos primarios de cáncer de mama por la técnica colorimétrica del MTT y asociarlo con la expresión de la familia de receptores HER.

6. MATERIALES Y METODOS.

6.1 Cultivos Celulares:

Los cultivos celulares MBCD25, MBCD3, MBCDF-D5, MBCD23, MBCD17, MBCDF-B3, MBCD11, MBCD24, MBCD20 y MBCDF (MBCDF-B3 y MBCDF-D5 son subclonas del cultivo MBCDF) se obtuvieron previamente a partir de biopsias de distintas pacientes con cáncer de mama metastásico del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (protocolo aprobado por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán Ref. 1549, BQO-008-06/9-1). La línea celular MCF7 fue donada por el departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Estos se han caracterizado de acuerdo a la clasificación molecular como se puede observar en la tabla 2. Los cultivos fueron mantenidos en medio RPMI (GIBCO® invítrogen, Life Technologies, California, USA) suplementado con 10% de suero fetal de bovino (SFB), antibióticos (Penicilina G sódica) y antimicóticos (Anfotericina B) a 37°C, en una atmósfera de 5% de CO₂ y 95 % de humedad relativa (Esparza et. al, 2016). Es importante mencionar que la resiembra de cultivos fue menor a 50.

CULTIVO CELULAR	SUBTIPO MOLECULAR	RECEPTORES QUE EXPRESAN
MBCDF	Luminal B	HER2+
MBCD25	Luminal B	RP/HER2+
MBCDF-B3	Luminal B	RP/HER2+
MBCDF-D5	Luminal B	RP/HER2+
MBCD17	Luminal B	RP/HER2+
MBCD24	Luminal B	RP/HER2+
MBCD3	HER2+	HER2 +++
MBCD23	HER2+	HER2 +++
MBCD11	HER2+	HER2 +++
MBCD20	HER2+	HER2 +++
MCF7	Luminal A	RE y RP

Tabla 2. Caracterización de los 10 cultivos primarios estudiados y una línea celular en donde se muestra la clasificación según el subtipo molecular y que receptores expresan.

6.2 Ensayos de proliferación celular.

Los ensayos de proliferación se realizaron por el método colorimétrico del MTT (Bromuro de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol]) (Mossan 1983) para lo cual se sembraron 5,000 células/cm² en una placa de 24 pozos (Corning, NY, USA) para cada cultivo primario en medio RPMI suplementado con 10% de SFB, las células se cultivaron durante 6 días a 37°C, en una atmósfera de 5% de CO₂ y 100% de humedad relativa. La tasa de proliferación se evaluó adicionando 40 µl de MTT a cada pozo dejándolo incubarse 2 horas con el reactivo y después se retiró el sobrenadante. Este procedimiento se realizó a los días 0, 2, 4 y 6, al sexto día las sales de formazan que precipitan al adicionar el MTT se disolvieron con isopropanol acidulado. Por último, la absorbancia se midió a 570 nm en un lector de microplaca (Opsys MR, Dynex Technologies, Chantilly, VA, USA). Los resultados se expresaron como el incremento de la densidad óptica con respecto al día cero. El ensayo se realizó tres veces de manera independiente por triplicado. El aumento de la proliferación se obtuvo mediante la estandarización de la densidad óptica de los días 2, 4 y 6 con respecto a la del día cero, reportándose el promedio y el error estándar.

6.3 Extracción y cuantificación de proteína.

Para extraer la proteína total se retiró el medio en el que se encuentran las células y se lavaron con 3 ml de PBS frío, se aspiró el PBS y se adicionaron 0.5 ml de PBS, después las células fueron raspadas y recolectadas en un tubo eppendorf estéril. Las células se centrifugaron a 14000 rpm por 2 min a 4°C., El sobrenadante se desechó y se adicionaron 30 µl de buffer de lisis (50mM de HEPES (pH 7.4), 1mM EDTA, 250 mM de NaCl, 1% de Nonidato P-40, 10 mM NaF, 1 mM Vanadato de sodio y 1X mezcla de inhibidores de proteasa (Complete, EDTA-free, Roche) resuspendiendo perfectamente el botón celular. Se incubó en hielo 15' y después se centrifugaron a 4°C a 14000 r.p.m. El sobrenadante se puso en un tubo eppendorf nuevo (Feng G, 2003). Para la cuantificación de proteína se realizó una curva patrón de albumina sérica bovina (MP. Biomedicals, California, USA) en un rango de 0 a 15 µg de proteína y 1 µl de nuestra proteína de interés en cada cubeta de lectura que contenía reactivo de Bradford 1X (Bio-Rad, California, USA). Se leyeron las muestras en un espectrofotómetro (DU-65, Beckman Coulter, Pasadena, California, USA) a 595 nm (Bradford, 1976).

6.4 Electroforesis y Electro-transferencia

Se prepararon geles de poliacrilamida al 7.5% en los cuales se sometieron a electroforesis 25 µg de proteína. Una vez que terminó la electroforesis, los geles de poliacrilamida se pasaron el gel se transfirió a una membrana de Immobilon-P PVDF (Millipore Corp Bedford, MA, USA) previamente activada en metanol absoluto. La cámara de transferencia se llenó con buffer de transferencia (25 mM de Tris, 190 mM de Glicina y 20% de Metanol), se transfirió a 100 V durante 1 hora (Boulwood J, 2002).

6.5 Western Blot:

Una vez terminada la transferencia, las membranas se bloquearon con leche descremada al 5% en PBS Tween 20, durante 1 hora en agitación. Se puso el anticuerpo primario anti HER1, HER2, HER3, HER4, y tubulina-α (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) en BSA al 2% en PBS Tween toda la noche en agitación a 4°C. Posteriormente, se lavaron las membranas con PBS-Tween durante 10 min, 3 veces. Una vez finalizando el lavado se puso el anticuerpo secundario anti-conejo o anti-raton según corresponda (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA) marcado con HRP en leche al 5% en PBS-Tween por 1 hora. Una vez terminado este paso se lavaron 3 veces por 10 min cada uno con PBS Tween 20. Finalmente, las membranas se expusieron al agente de quimioluminiscencia (GE-Healthcare, Marlborough, MA, USA) durante 5 min. y se revelaron con placas radiográficas.

6.6 Revelado

El revelado se realizó en un cuarto oscuro; la membrana se colocó en una cubierta con plástico y se expuso a una película radiográfica por diferentes tiempos. Después se pasó por tres recipientes, el primero con revelador, el segundo agua y el tercero fijador.

6.7. Método estadístico.

Se. Utilizo la prueba t de student estableciendo una significancia estadística con un valor de $p < 0.05$. Las gráficas y el análisis estadístico se realizaron con el programa Minitab 17.

7. RESULTADOS

Expresión de Receptores de la Familia de Factores de Crecimiento Epidérmico (HER1, HER2, HER3 y HER4) en cultivos primarios de cáncer de mama.

Se realizó un análisis descriptivo de los resultados obtenidos. Para determinar cómo es la expresión de los miembros de la familia de HER (HER1, HER2, HER3 y HER4) en el cáncer de mama, se analizaron 10 cultivos primarios y la línea celular MCF7 como control positivo, por medio de la técnica de Western blot, utilizando anticuerpos específicos, se utilizó tubulina como control de carga. Se encontró que HER1 se expresa exclusivamente en los cultivos MBCDF-D5, MBCD3, MBCDF-B3 y MBCD23, pero pudimos notar que en las células MBCDF-D5 y MBCDF-B3 presentan mayor expresión de HER1 comparado con las células MBCD3 y MBCD23 (Figura 3). Cuando analizamos la expresión de HER2 observamos que aparecen dos bandas, una de 185 kDa y otra de 95 kDa, esta última representa la forma truncada de HER2 e interesantemente hallamos que cuando está presente la forma truncada de HER2 se expresa HER1; contrariamente, cuando la forma completa de HER2 se expresa, no detectamos HER1 (Figura 3). HER3 está expresada de manera indistinta en todos los cultivos analizados, aunque en los cultivos MBCD20 y MBCD24 hay una menor expresión (Figura 3). De igual manera que HER3, HER4 también se encuentra de manera indistinta en todos los cultivos analizados, pero en las células MBCD24 observamos que existe un aumento en la expresión de HER4. Estos resultados demuestran que la expresión de HER1 y HER2 se expresan de manera excluyente en población de cultivos primarios de cáncer de mama analizados, HER3 y HER4 se encuentran de forma indistinta, también demostramos que existe una relación entre la expresión de HER1, HER2 y la presencia de la forma truncada de HER2.

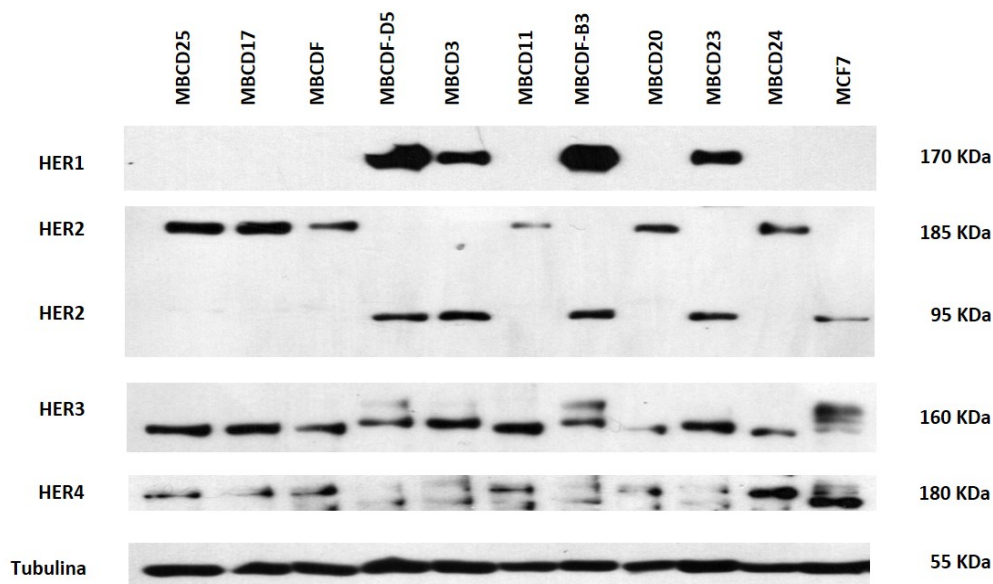


Fig. 3 Expresión de Receptores de Factores de Crecimiento de la familia HER en 10 cultivos primarios de cáncer de mama y la línea celular MCF7. Se separaron 25 µg de proteína en geles de poliacrilamida desnaturalizantes. Se realizó Western Blot con anticuerpos específicos para cada receptor, y como control de carga se utilizó tubulina.

El análisis de la expresión de receptores de la familia HER nos permitió identificar 4 diferentes patrones de expresión; patrón 1A, patrón 1B, patrón 2A y patrón 2B. En la tabla 2 se muestra a los cultivos primarios divididos según el patrón de expresión que presentan; podemos observar que el patrón 1A se caracteriza por la expresión de HER1, la presencia de la forma truncada de HER2, HER3 y HER4, a este patrón corresponden los cultivos MBCD3 y MBCD23. El patrón que asignamos como 1B, difiere del patrón 1A, por una mayor expresión de HER1, los cultivos MBCDF-D5 y MBCDF-B3 corresponden al patrón 1B. El patrón 2A se caracteriza por la expresión de HER2, HER3 y HER4 y los cultivos con este patrón son MBCDF, MBCD11, MBCD20 y MBCD24. El patrón 2B presenta una mayor expresión de HER2 comparado con el patrón 2A, los cultivos que corresponden este grupo son MBCD17 y MBCD25 (Tabla 3).

CULTIVOS PRIMARIOS	EXPRESION DE RECEPTORES DE LA FAMILIA HER					
	GRUPOS DE PATRONES DE EXPRESIÓN	HER1	HER2	HER2 TRUNCADO	HER3	HER4
MBCD3	1A	XX	-	XX	XX	X
MBCD23		XX	-	XX	XX	X
MBCDF-D5	1B	XXX	-	XX	XX	X
MBCDF-B3		XXX	-	XX	XX	X
MBCDF	2A	-	XX	-	XX	X
MBCD11		-	XX	-	XX	X
MBCD20		-	XX	-	X	X
MBCD24		-	XX	-	X	XX
MBCD25		-	XXX	-	XX	X
MBCD17	2B	-	XXX	-	XX	X
MCF7	Control			X	X	X

Tabla 3. Análisis cualitativo (intensidad relativa) de las características fenotípicas de 10 cultivos primarios de cáncer de mama según su expresión de Receptores de la familia HER y la línea celular MCF7 como control. Se presentan 4 patrones diferentes; patrón 1A que se caracteriza por la presencia HER1, de la forma truncada de HER2, HER3 y HER4; Patrón 1B, se caracteriza por altos niveles de HER1, la presencia de la forma truncada de HER2, HER3 y HER4; Patrón 2A que expresa HER2, HER3 y HER4 y por ultimo está el patrón 2B que expresa HER3 y HER4 y altos niveles de HER2.

Proliferación celular y su asociación con los niveles de expresión de la familia de receptores HER.

Para determinar cuál es la influencia de los diferentes patrones de expresión de la familia HER, los cultivos primarios fueron sometidos a ensayos de proliferación mediante la técnica colorimétrica de MTT, la línea celular MCF7 se utilizó como control. En la figura 4, se muestra únicamente el día 6 del ensayo que fue en donde se encontraron diferencias significativas; podemos observar que los cultivos MBCD23, MBCD25, MBCD17, tuvieron una mayor capacidad proliferativa en comparación al resto de los cultivos celulares mostrando un comportamiento similar a pesar de presentar distintos patrones de expresión de receptores HER (MBCD23 presenta el patrón 1A, MBCD17 y MBCD25 el 2B). Por el contrario, tenemos al cultivo MBCDF-D5 que presenta la tasa de proliferación más baja considerando que muestra el patrón de expresión 1B. Para el resto de las líneas celulares (MBCD3, MBCDF-B3, MBCD11, MBCD24, MBCD20 y MBCDF) observamos que tienen una tasa de proliferación media en comparación con los cultivos mencionados anteriormente. Estos resultados nos sugieren que no existe asociación entre la expresión de la familia de receptores HER y la proliferación celular ya que todos los cultivos expresan patrones

diferentes y por cada patrón se expresan niveles distintos en cuanto a intensidad de las bandas observadas en el western blot de HER1, HER2, HER3 y HER4 y estas tienen tasas de proliferación variada.

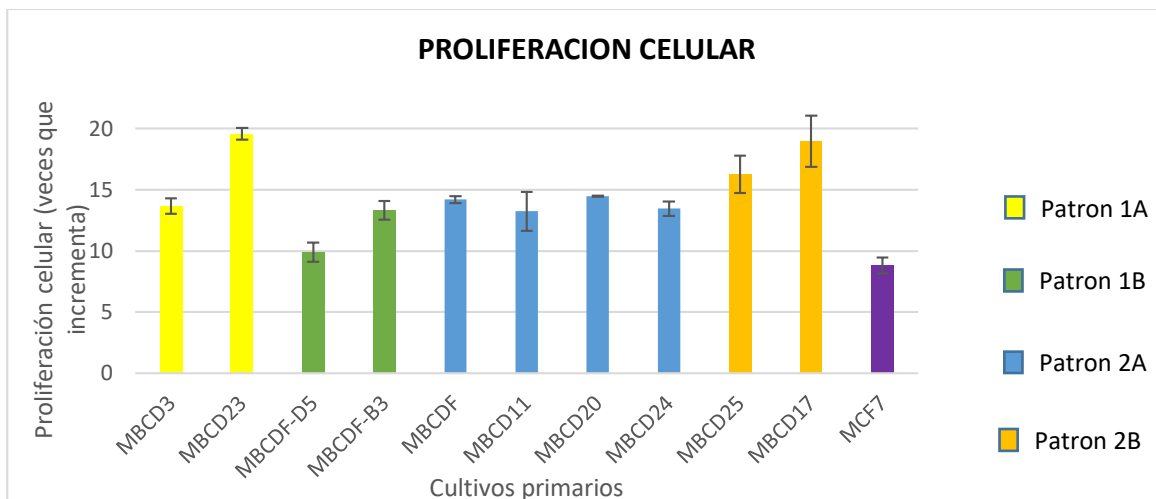


Figura 4. Proliferación celular de los cultivos analizados. Se presenta únicamente el día 6 del ensayo que fue en donde se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) con un valor p de 0.0001. Se muestra en colores los distintos patrones de expresión para cada cultivo celular. Se puede observar que la proliferación es variada en todos los cultivos primarios de cáncer de mama a pesar de mostrar un mismo patrón de expresión.

CULTIVO CELULAR	PROLIFERACIÓN	PATRON DE EXPRESIÓN
MBCD3	MEDIA	1A
MBCD23	ALTA	1A
MBCDF-D5	MEDIA	1B
MBCDF-B3	MEDIA	1B
MBCDF	MEDIA	2A
MBCD11	MEDIA	2A
MBCD20	MEDIA	2A
MBCD24	MEDIA	2A
MBCD25	ALTA	2B
MBCD17	ALTA	2B
MCF7	BAJA	Control

Tabla 4. Correlación cualitativa entre la proliferación y patrón de expresión de receptores HER en los cultivos primarios MBCD3, MBCD23, MBCDF-D5, MBCDF-B3, MBCDF, MBCD11, MBCD20, MBCD24, MBCD25, MBCD17 y MCF7 como control. En donde se asigna como baja, media y alta con respecto al control. También se muestra el patrón de expresión que presentan

8. DISCUSIÓN

El cáncer de mama es la neoplasia más frecuente en mujeres a nivel mundial, a pesar de toda la información científica relacionada con su origen, nuevos métodos diagnósticos y tratamientos que se ha obtenido en las últimas décadas, la tasa de mortalidad debida a este tipo de cáncer sigue en aumento. Los avances de la biología molecular han llevado a una mejor comprensión de la biología básica del cáncer de mama. Se ha logrado la identificación biomarcadore, entre los que destacan HER2 y los receptores hormonales, para los cuales se han desarrollado terapias dirigidas y estos han permitido identificar a las mujeres que se beneficien de estos tratamientos, predecir el pronóstico de las pacientes que presentan estos biomarcadores (Tallquist et. al, 2004).

Aunque los receptores HER parecen un papel en el desarrollo del cáncer y son blancos terapéuticos contra las que se han diseñado diversos fármacos, aún hay aspectos de su biología que no se entienden. Por lo que en el presente trabajo caracterizamos la expresión de los receptores de la familia HER, se relacionó a estos receptores con la proliferación celular. El modelo que utilizamos fueron 10 cultivos primarios de cáncer de mama provenientes de diferentes pacientes previamente establecidos y caracterizados en el laboratorio, la línea celular MCF-7 se usó como control. Los cultivos MBCDF, MBCD25, MBCDF-B3, MBCDF-D5, MBCD17 y MBCD24 son del subtipo Luminal B, expresan RP/HER2+; los cultivos MBCD3, MBCD23, MBCD11 y MBCD20 se clasifican en el subtipo HER2+ y la línea celular MCF7 es un modelo celular Luminal A que expresa RE y RP. En el presente trabajo al analizar la expresión de los cuatro receptores de la familia HER pudimos detectar 4 patrones de expresión diferentes en los cultivos analizados. La comparación de los patrones de expresión nos permitió observar un hallazgo interesante, la relación que existe entre la expresión de HER1 y la forma truncada de HER2, donde la expresión de HER1 correlaciona con la forma truncada de HER2, pero excluye a la forma completa de HER2. Estos datos apoyan la participación que tiene esta forma truncada de HER2 en la resistencia a terapias blanco anti-HER2 en el cáncer de mama (Scaltriti, 2007). Lipton y colaboradores sugieren la existencia de múltiples subtipos pronósticos del cáncer de mama HER2-positivo, caracterizados por la expresión de HER2, HER3 y / o p95 al cual resaltan como un marcador de resistencia a Trastuzumab, midieron cuantitativamente en 89 pacientes de cáncer de mama tratados con Trastuzumab a HER3 total, p59HER2 y HER2

total, y correlacionaron estos niveles de expresión con la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia en general; observaron que dentro de la subpoblación de pacientes que sobre expresaron HER2, altos niveles de expresión de proteína HER3 y / o p95 se asociaron significativamente con malos resultados clínicos en la terapia con Trastuzumab (Lipton et al, 2013). Esto podría estar relacionado con la asociación que encontramos en cuanto a la expresión de HER1, HER2 y la forma truncada de HER2, pero en este caso encontramos la expresión con HER1, sería de gran interés observar si esta asociación entre los receptores antes mencionados tiene algún impacto sobre la resistencia a fármacos dirigidos en contra de estos receptores. Nuestros datos sugieren una asociación entre la expresión de los receptores HER1, HER2 y la forma truncada de HER2 como un nuevo marcador pronóstico y predictivo para los subtipos Luminal B y HER2+.

Por otra parte, al asociar la expresión de los receptores de la familia HER con la proliferación celular no encontramos que tengan relación alguna, ya que todos los cultivos presentan tasas de proliferación variadas a pesar de presentar patrones de expresión similares. El comportamiento proliferativo en los cultivos MBCD25 y MBCD17 que expresan el patrón 2B caracterizado por niveles altos de HER2 se ha demostrado en la literatura, en donde se reporta que la sobreexpresión de HER2 confiere a las células un aumento en la proliferación celular. Por otra parte es importante mencionar que los cultivos MBCDF-B3 y MBCDF-D5 son subclonas de las células MBCDF que provienen de un mismo tumor esto pudiera ser un factor importante en los resultados obtenidos ya que el resto de los cultivos provienen de distintos tumores, de hecho existe un estudio en donde caracterizan a estas subclonas y observan que además de expresar receptores de la familia EGFR también expresan c-Met y VEGFR y que la presencia de estos receptores de factores de crecimiento tienen implicaciones en varios procesos biológicos (Esparza, et. al 2016). Por lo anterior sería de gran utilidad evaluar en esta población la presencia de otros factores de crecimiento y observar su posible participación en los procesos biológicos implicados.

Por otro lado, este es uno de los pocos trabajos realizados con cultivos primarios de cáncer de mama, ya que gran parte de la investigación básica acerca de cáncer de mama por lo regular se realiza utilizando líneas celulares comerciales, las cuales su comportamiento y biología puede haber variado a la del tumor primario, debido a los largos periodos de tiempos

en cultivo, lo que da pie a que sufran cambios genéticos y epigenéticos y en consecuencia pueden diferir del tumor que les dio origen. Una de las fortalezas de este trabajo es que se realizó con cultivos primarios de cáncer de mama y que todos los experimentos se realizaron con un número corto de pases de células (menos de 50), esto nos permite que nuestros resultados se aproximen al comportamiento de un tumor recién extraído.

9. CONCLUSIONES

Se demostró la presencia de cuatro diferentes patrones de expresión de receptores de la familia HER en 10 cultivos primarios de cáncer de mama de diferentes pacientes. Mostramos que existe una relación negativa con respecto a la expresión de HER1 y HER2, además la forma truncada de HER2 se co-expresa con HER1. La expresión de HER3 y HER4 fue homogénea. Estos patrones podrían sugerir nuevos marcadores pronósticos y predictivos de esta neoplasia. Por último, los patrones de expresión de los receptores de la familia HER no tuvieron impacto en la proliferación celular.

10. BIBLIOGRAFIA

1. Arrechea Irigoyen M.A, F., Vicente García, A., Córdoba Iturriaga Goitia, B., Ibáñez Beroiz, M., Santamaría Martínez, F., Guillén Grima. 2011. *Molecular subtypes of breast cancer: prognostic implications and clinical and immunohistochemical characteristics*. Anales del Sistema Sanitario de Navarra, España. 34(2):219-233.
2. Arndt-Jovin, D.J., Botelho, M.G., Jovin, T.M. 2014. *Structure-function relationships of ErbB RTKs in the plasma membrane of living cells*. Cold Spring Harb Perspect Biol. Apr 1;6(4).
3. Barbacci, E.G., Guarino, B.C., Stroh, J.G., Singleton, D.H., Rosnack K.J., Moyer, J.D., Andrews, G.C. 1995. *The structural basis for the specificity of epidermal growth factor and heregulin binding*, J. Biol. Chem. 270 (16):9585-9589.
4. Bland Copeland, III. 2007. *La mama: manejo multidisciplinario de las enfermedades malignas y benignas*. Editorial Panamericana 3^a edición, Argentina.
5. Baselga, J., Swain Sandra M. 2009. *Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3*. Nature Review. 463-75.
6. Bradford, M. M. 1976. *A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding*. Analytical Biochemistry. 72: 248-254.
7. Boultonwood, J., Filder, C. 2002. *Molecular Analysis of Cancer*. Editorial Human Press, New Jersey. pag. 118-119.
8. Eliyatkin, N., Yalçın, E., Zengel, B., Aktaş, S., Vardar, E. 2015. *Molecular Classification of Breast Carcinoma: From Traditional, Old-Fashioned Way to A New Age, and A New Way*. J. Breast Health. 11(2):59-66.
9. Eroqlu, Z., Taqawa, T., Somlo, G. 2014. *Human Epidermal Growth Factor Receptor (HER) Family-Target therapies in the treatment of HER2- Overexpressing Breast Cancer*. Oncologist, January 16.
10. Esparza-López José, Pier A. Ramos-Elías, Andrea Castro-Sánchez, Leticia Rocha-Zavaleta, Elizabeth Escobar-Arriaga, Alejandro Zentella-Dehesa, Eucario León-Rodríguez, Heriberto Medina-Franco, María de Jesus Ibarra-Sánchez, 2016. *Primary*

- breast cancer cell culture yields intra – tumor hetererogeneous subpopulations expressing exclusive patterns of receptor tyrosine kinases*, BMC cancer; 16: 740.
11. Fackental, J.D., Olopade, O.L. 2007. *Breast Cancer Risk associated with BRCA1 and BRCA2 in diverse populations*. Nat. Rev. Cancer. 007;7(12):937-48.
 12. Feng, G.U., Dube, N., Wook Kim J., Cheng, A., Ibarra-Sanchez, Ma. De J., L. Tremblay, M., Boisclair, Y. R. 2013. *Protein Tyrosine Phosphatase 1B Attenuates Growth Hormone-Mediated JAK2-ST*. Molecular and cellular Biology. June, p. 3753–3762.
 13. Ferlay J¹, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. 2015. *Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012*. Int J Cancer. 1;136(5):E359-86.
 14. Gerson – Cwilich, R., Serrano – Olvera A. 2008. *Pronostico en cancer de mama temprano con relacion a la expression de HER2 y receptors Hormonales*. GAMO; 7:45-51.
 15. Goldhirsch, A., Wood, W.C., Coates, A.S., Gelber, R.D., Thurlimann, B., Senn, H.J. 2011. *Strategies for subtypes – dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of early breast cancer*. Ann Oncology, August: 22(8):1736-47.
 16. Harbeck, N. 2011. *Struggling with subtypes: trying to bridge the gap between molecular Breast Cancer subtypes and clinical management*. Breast Cancer Res Treat, Nov; 130(2):421-3.
 17. Imigo, G., Mancilla, F., Edgardo, S. 2011. *Clasificación Molecular del cancer de mama*, Cuad. Cir; 25: 67-74.
 18. INEGI; <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/contenidos/estadisticas/2001/cancer11.asp?s=inegi&c=2780&ep=50>.
 19. Labidi, S., Mejri, N., Lagha, A., Daoud, N., El Benna, H., Afrit, M., Boussen, H. 2016. *Targeted Therapies in HER2-Overexpressing Metastatic Breast Cancer*, Breast Care (Basel). Dec;11(6):418-422.
 20. Lahera Sanchez, T., Gonzalez Hernandez, Juan O. 2010. *El Receptor del Factor de Crecimiento Epidermico y su papel en el desarrollo tumoral*. Revista Habanera de Ciencias Médicas, Vol. 9.

21. Lipton, A., Goodman, L., Leitzel, K. 2013. *HER3, p95HER2, and HER2 protein expression levels define multiple subtypes of HER2-positive metastatic breast cancer*, *Breast Cancer Res Treat.* 141: 43.
22. Loibl, S., Gianni, L. 2016. *HER2-positive breast cancer*. *Lancet*, Dec 6:S0140-6736(16).
23. Maatta, J.A., Sundvall, M., Junttila, T.T., Peri, L., Laine, V.J., Isola, J., Egeblad, M., Elenius, K. 2006. *Proteolytic cleavage and phosphorylation of a tumor-associated ErbB4 isoform promote ligand-independent survival and cancer cell growth*, *Mol. Biol. Cell* 17:67-79.
24. Miyamoto, Y., Suyama, K., Baba, H., 2017. *Recent Advances in Targeting the EGFR Signaling Pathway for the Treatment of Metastatic Colorectal Cancer*. *Int J Mol Sci.*, 18(4).
25. Mosmann, T. 1983. *Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays*. *J Immunol Methods.* Dec 16; 65 (1-2): 55-63.
26. Nair, P. 2005. *Epidermal growth factor receptor family and its role in cancer progression*. *Current Science.* 88(6): 890-898.
27. Paik, S., Liu, E. T. 2000. *HER2 a predictor of therapeutic response in breast cancer*. *Breast Dis*, 11:91-102.
28. Prigent, S.A., Gullick, W.J. 1994. *Identification of c-erbB-3 binding sites for phosphatidylinositol 3'-kinase and SHC using an EGF receptor/c-erbB-3 chimera*. *EMBO J.* 13:2831-2841.
29. Ray, M., Salgia, R., Everette, E. 2009. *The role of EGFR Inhibition in the treatment of non-small cell lung cancer. VOKES the oncologist lung cancer*. *The oncologist*, 14:1116-1130.
30. Roskoski, Robert Jr. 2014. *The ERBB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer*. *Farmacological Research*, Vol. 79, page 34-74.
31. Saez. 2006. *p95HER2 predicts worse outcome in patients with HER2-positive breast cancer*. *Clinical Cancer Research*, Vol. 12, págs. 424-431.
32. Sartor, C.I., Zhou, H., Kozłowska, E., Guttridge, K., Kawata, E., Caskey L., Harrelson, J., Hynes, N., Ethier, S., Calvo, B., Earp, H.S. 2001. *Her4 mediates*

- ligand-dependent antiproliferative and differentiation responses in human breast cancer cells.* Mol. Cell. Biol. 21:4265-4275.
33. Scaltriti. 2007. *Expression of p95HER2, a truncated form of the HER2 Receptor, and response to anti-HER2 therapies in breast cancer.* Journal of National Cancer Institute. Págs. 628-368.
 34. Scaltriti, M., Baselga, J. 2006. *The epidermal growth factor receptor pathway: A model for targeted therapy.* Clin Cancer, 12:5268–5272.
 35. Singh, B., Carpenter, G., Coffey, R.J. 2016. *EGF_receptor ligands: recent advances.* F1000 Res., Faculty Rev-2270.
 36. Singletary, S.E., Connolly, J.L. 2006. *Breast Cancer Staging: working with the sixth edition of the AJCC Cancer Staging Manual.* CA Cancer J Clin., 56(1):37-47.
 37. Slamon DL, Clark GM, Wong SG et al. 1987. *Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of her-2/neu oncogene.* Science, 235, pp. 177-82.
 38. Soto Peres de Celis, E., Chavarria, Y. 2016. *National and regional breast cancer incidence and mortality trends in Mexico 2001-2011: Analysis of a population-based database.* Cancer Epidemiol. 41:24-33.
 39. Stuckey, A. 2011. *Breast Cancer: epidemiology and risk factor.* Clin Obstet Gynecol, 54(1):96-102.
 40. Sundvall, M., Peri, L., Maatta, J.A., Tvorogov, D., Paatero, I., Savisalo, M., Silvennoinen, O., Yarden, Y., Elenius, K. 2007. *Differential nuclear localization and kinase activity of alternative ErbB4 intracellular domains.* Oncogene 26:6905-6914.
 41. Sundvall, M., Iljin, K., Kilpinen, S., Henri, S., Kalioniemi, O.P., Elenius, K. 2008. *Role of ErbB4 in breast cancer.* J Mammary Gland Biol Neoplasia, pp. 259-268.
 42. Sweeney, C., Lai, C., Riese, D.J. II, Diamonti, A.J., Cantley, L.C., Carraway, K.L. III. 2000. *Ligand discrimination in signaling through an ErbB4 receptor homodimer.* J. Biol. Chem. 275:19803-19807.
 43. Tallquist, M., Kazlaushas, A. 2004. *Signaling in breast cancer.* Cytokine Growth Factor Rev., 15:205-2013.

44. Wee P, Wang Z, *Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways*, 2017. *Cancers* (Basel). 17;9(5).
45. Weitsman, G., Barber, P.R., Nguyen, L.K., Lawler, K., 2016. *HER2-HER3 dimer quantification by FLIM-FRET predicts breast cancer metastatic relapse independently of HER2_IHC status*. *Oncotarget*. 7(32):51012-51026.
46. Wells, A. 2000. *The epidermal growth factor receptor (EGFR)—a new target in cancer therapy*. *Signal*. 1:4–11.
47. Xu, Z.Q., Zhang, Y., Li, N., Liu, P.J., Gao, L., Gao, X., Tie, X.J. 2017. *Efficacy and safety of lapatinib and trastuzumab for HER2-positive breast cancer: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials*, *BMJ Open*. 7(3):E013053.
48. Yarden, Y., Sliwkowski, M.X. 2001. *Untangling the ErbB signalling network*. *Mol Cell Biol*. 2(2): 127-37.
49. Zerecero, Octavio., Valle, A., Weiss, B., Soto, I. 2012. *El receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y su relación con el cáncer*. *Revista Especializada en Ciencias de la Salud*. 15(1):15-25.
50. Zhiyuan, Hu., Cheng, Fan. 2006. *The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms*. *BMC Genomics*. 7(96):1-12.