



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

### **PARTICIPACIÓN DE LA PROTEÍNA ADAPTADORA LNK EN LA REGULACIÓN DE LA VÍA JAK/STAT EN CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Q.F.B. Manuel Alejandro Sánchez Carballido

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Leticia Rocha Zavaleta

[Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Rocío Ángeles García Becerra

[Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM](#)

Dra. Lorenza Díaz Nieto

[Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán](#)

Ciudad de México. Febrero, 2023



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.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y al Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, por permitirme llevar a cabo este proyecto y permitir la continuidad a mis estudios.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT – Clave IN206022) por el apoyo durante el proyecto.

A la Dra. Leticia Rocha Zavaleta por integrarme en su grupo de trabajo y apoyarme en todo momento para la realización de este proyecto.

A la M. en C. Ma. Cecilia Aguilar Zacarías, por el apoyo técnico brindado durante la realización de este trabajo.

# CONTENIDO

	Página
1. Resumen.....	1
2.Introducción.....	2
2.1 Cáncer de mama.....	2
2.1.1 Cáncer de mama triple negativo (TNBC).....	5
2.2 La vía JAK/STAT.....	7
2.2.1 La vía JAK2/STAT3 y el cáncer de mama.....	9
2.2.2 La vía JAK2/STAT3 y el TNBC.....	9
2.3 LNK (SH2B3) .....	10
2.3.1 LNK en tumores sólidos.....	12
3. Antecedentes.....	15
4. Justificación.....	15
5. Hipótesis.....	16
6. Objetivo.....	16
7. Objetivos particulares.....	16
8. Metodología.....	17
8.1 Cultivo celular.....	17
8.2 Western blot.....	18
8.3 Inmunofluorescencia.....	19
8.4 Extracción de RNA.....	20
8.5 Síntesis de cDNA.....	20
8.6 qPCR con SYBR GREEN.....	20

	<b>Página</b>
8.7 Extracción de DNA genómico.....	21
8.8 Secuenciación.....	21
8.9 Análisis de datos.....	22
9. Resultados.....	23
9.1 Análisis de la expresión del gen SH2B3 (LNK) utilizando bases de datos bioinformáticas.....	23
9.2 Determinación de la producción de LNK en líneas de TNBC.....	29
9.3 Determinación de la cantidad de mRNA de LNK en líneas celulares de TNBC .....	30
9.4 Estado basal de la vía JAK2/STAT3 en las líneas de TNBC .....	32
9.5 Determinación de la localización intracelular de la proteína LNK en líneas celulares de TNBC.....	33
9.5.1 Microscopía de fluorescencia.....	33
9.5.2 Microscopía confocal.....	35
9.6 Determinación de mutaciones del gen de LNK.....	37
10. Discusión.....	40
11. Conclusiones.....	50
12. Perspectivas.....	51
13. Referencias.....	52

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Incidencia y mortalidad del cáncer de mama en mujeres.
- Figura 2.** Clasificación molecular del cáncer de mama.
- Figura 3.** Vía de señalización de JAK/STAT.
- Figura 4.** Esquema de la organización estructural de la proteína adaptadora LNK (SH2B3).
- Figura 5.** Modulación de la vía de señalización JAK/STAT.
- Figura 6.** Expresión de SH2B3 en tejido del sistema reproductor masculino y femenino sano.
- Figura 7.** Supervivencia general de pacientes con cáncer de mama relacionada con la expresión de SH2B3.
- Figura 8.** Análisis de la supervivencia general de pacientes con cáncer de mama relacionada con la expresión de SH2B3.
- Figura 9.** Supervivencia general de pacientes con TNBC relacionada a la expresión de SH2B3.
- Figura 10.** Expresión de SH2B3 en líneas celulares de cáncer de mama.
- Figura 11.** Expresión de SH2B3 en grupos de líneas celulares de cáncer de mama.
- Figura 12.** Detección de la proteína LNK en las líneas de TNBC.
- Figura 13.** Cuantificación del mRNA de LNK en las líneas de TNBC.
- Figura 14.** Detección de las proteínas STAT3 y JAK2 en las líneas de TNBC.
- Figura 15.** Inmunofluorescencia para la detección de LNK en las líneas de TNBC.
- Figura 16.** Microscopía confocal para determinar la localización de la proteína LNK en las líneas de TNBC.
- Figura 17.** Comparación de posibles NLS en las secuencias de a.a de las proteínas SH2B1 y LNK.
- Figura 18.** Comparación de posibles NLS en las secuencias de a.a de la proteína LNK incluyendo las mutaciones reportadas para cáncer de mama.

## ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1.** Líneas celulares de TNBC del proyecto.

## ABREVIATURAS

<b>a.a.</b>	Aminoácidos
<b>AKT</b>	Proteína cinasa B
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino
<b>EPO</b>	Eritropoyetina
<b>ER</b>	Receptor estrógenos
<b>ERK</b>	Cinasa regulada por señales extracelulares
<b>FBS</b>	Suero fetal bovino
<b>GAPDH</b>	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
<b>GOBO</b>	Gene expression-based Outcome for Breast Cancer
<b>HER2</b>	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
<b>HPA</b>	Atlas de las Proteínas Humanas
<b>HRP</b>	Peroxidasa de rábano picante
<b>JAK</b>	Cinasa Jano
<b>NES</b>	Señal de exportación nuclear
<b>NLS</b>	Señal de localización nuclear
<b>nTPM</b>	Transcritos por millón normalizados
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PH</b>	Homología a pleckstrina
<b>PIAS</b>	Proteína inhibidora de STAT activado
<b>PR</b>	Receptor de progesterona
<b>PTPs</b>	Proteínas fosfatasas de tirosina
<b>PVDF</b>	Fluoruro de polivinilideno
<b>RTK</b>	Receptores con actividad de cinasa de tirosina
<b>SCF</b>	Factor de células troncales
<b>SH2</b>	Homología a Src 2
<b>SNP</b>	Polimorfismo de un solo nucleótido
<b>SOCS</b>	Supresores de señales de citocinas

**STAT** Proteína transductora de señales y activadora de la transcripción  
**TME** Microambiente tumoral  
**TNBC** Cáncer de mama triple negativo



## 1. Resumen

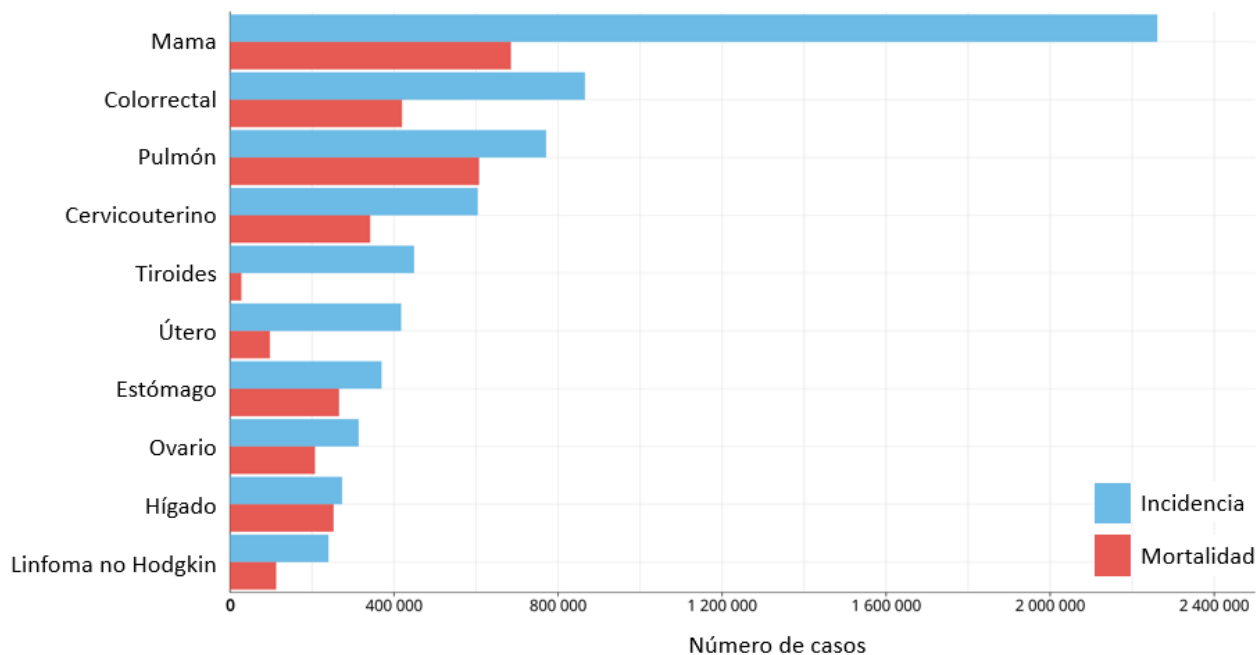
El cáncer de mama es el cáncer con la mayor prevalencia, incidencia y mortalidad en mujeres a nivel mundial. Dentro de este padecimiento existe un subtipo particular que abarca del 15 al 20% de los casos y es denominado cáncer de mama triple negativo (TNBC, por sus siglas en inglés). Si bien, el TNBC no es el subtipo de cáncer de mama más común, sí es el más agresivo y presenta una gran resistencia a las terapias dirigidas actuales. Las células que conforman a este tipo de cáncer también presentan una elevada supervivencia celular y una alta probabilidad de hacer metástasis y esto debido, principalmente, a la sobreactivación de la vía de señalización JAK2/STAT3. Una de las moléculas reguladoras negativas de esta vía es la proteína LNK, cuya expresión alterada se ha asociado con el desarrollo de cáncer hematológico, colorrectal y de ovario. Por tal motivo, el presente proyecto se encamina a determinar la presencia y participación de LNK en el TNBC, con la finalidad de sentar bases sólidas de la bioquímica particular que se presenta en las células tumorales de TNBC para la futura realización de estudios dirigidos a mejorar el pronóstico de los pacientes que presentan esta afección.

En este estudio se realizaron análisis bioinformáticos, Western blots y qPCR, con el fin de determinar la producción del mRNA de LNK y de la proteína LNK en diferentes tipos de tejido y líneas celulares, de humano. Teniendo en cuenta que LNK parece no presentar su función inhibitoria sobre la fosforilación de JAK2, se quiso determinar por medio de microscopía de fluorescencia y confocal si la proteína LNK se encontraba localizada cerca de la membrana citoplasmática; lugar en donde se encuentra JAK2 como su principal blanco molecular. Con todos estos experimentos se pudo determinar que la expresión y producción de LNK es diferente en los diversos tipos de tejido y células analizadas. En general, se pudo observar que la expresión y producción de LNK son mayores tanto en tejido como en líneas celulares provenientes de tumores de TNBC a comparación del tejido sano y de cáncer mama no triple negativo. Además, se pudo observar que en las líneas de TNBC evaluadas, la proteína LNK se encuentra “deslocalizada”. Esta última observación dirigió el estudio a la búsqueda de mutaciones que pudieran dar lugar a este fenómeno. Con el uso de secuenciación se pudo determinar que existen cambios en la secuencia de nucleótidos que dan lugar a modificaciones en la secuencia de aminoácidos de LNK, y estas a su vez podrían ser las causantes de la alteración de su localización.

## 2. Introducción

### 2.1 Cáncer de mama

El cáncer se puede presentar prácticamente en todas las partes del cuerpo, sin embargo, existen algunos sitios anatómicos en los que se presenta con mayor frecuencia, entre los que se encuentra la mama. De acuerdo con datos presentados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) es el cáncer de mama es el más común a nivel mundial [1]. Este cáncer se destaca por ser también el más común en mujeres, ya que cerca de una de cada doce mujeres presenta este padecimiento. Aun cuando la mayoría de los fallecimientos por esta enfermedad se producen en países de ingresos bajos y medianos [1], es la neoplasia que produce mayor número de muertes en las mujeres de todas las edades a nivel mundial [2]. En datos presentados en GLOBOCAN, se puede observar que el cáncer de mama ha presentado la mayor incidencia y mortalidad por cáncer en mujeres en los últimos 5 años (Figura1) [3, 5], lo que lo vuelve un problema de salud pública de gran importancia en la actualidad. Además de su alta incidencia, se ha visto que parte del incremento en padecer esta enfermedad se encuentra asociado a varios factores del estilo de vida que podrían ser modificados para su prevención [4].



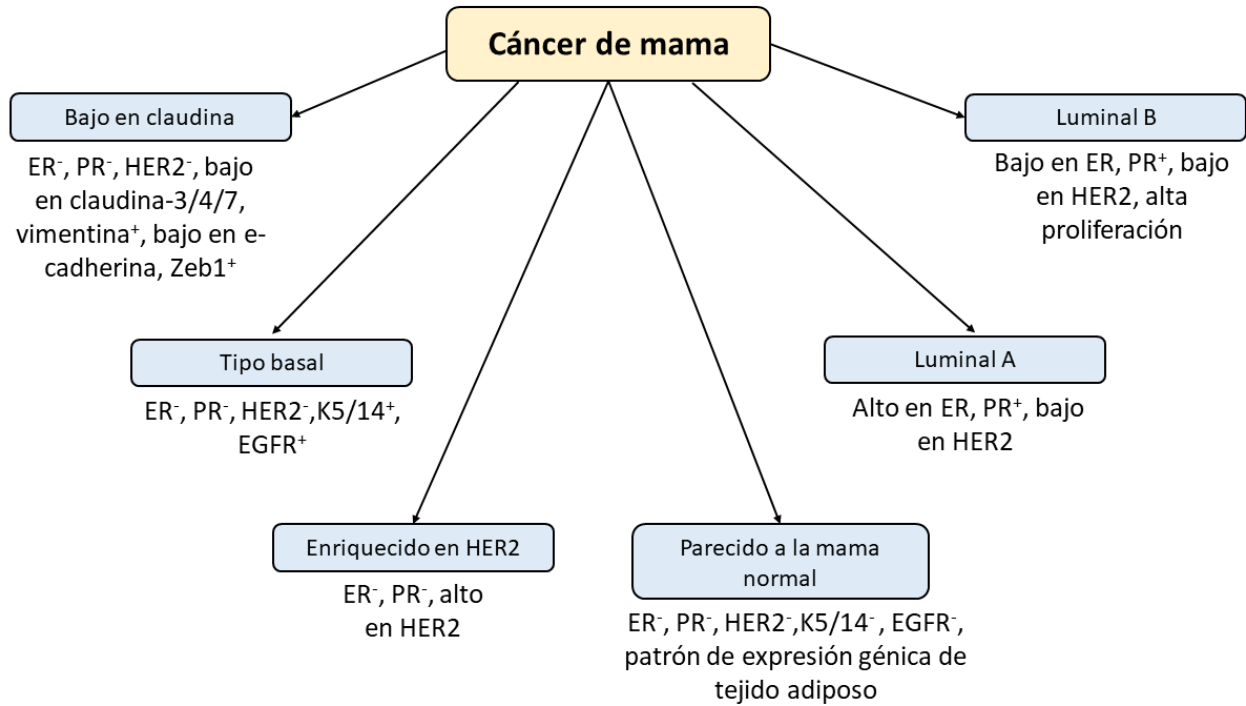
**Figura 1. Incidencia y mortalidad del cáncer de mama en mujeres.** Número de casos para la incidencia y mortalidad del cáncer de mama en mujeres de todas las edades a nivel mundial (Tomado y modificado de GLOBOCAN [5]).

El cáncer de mama se puede presentar en diferentes tejidos de la mama, entre los que se encuentran los lobulillos, conductos y tejido conectivo. La mayoría de los cánceres de mama se originan en los conductos o en los lobulillos [6], y comienzan con una proliferación *in situ* en el tejido que recubre a los conductos o en los lobulillos, pero fácilmente pueden progresar a ser infiltrantes, dando lugar a una proliferación de las células tumorales en otras partes del tejido mamario y finalmente si éstas llegan a entrar al sistema circulatorio o linfático puede generar metástasis [7] principalmente en huesos (en el 85% de los casos), hígado (en el 40 a 50 % de los casos), pulmón (en el 20% de los casos) y cerebro (en el 6 al 16 % de los casos) [8].

El cáncer de mama es una neoplasia que presenta gran heterogeneidad en las células que lo componen, por lo que se ha tratado de encontrar una forma de agruparlo en subtipos dependiendo la expresión de diferentes biomarcadores. Es necesario identificar el subtipo y estadio de cáncer que tiene cada paciente con el fin de determinar el pronóstico y poder elegir las estrategias terapéuticas a seguir que se consideren con mayor efectividad en cada caso particular. Primeramente, se realiza una clasificación histológica en la que se puede determinar qué tejido de la mama se encuentra afectado, así como si el cáncer se encuentra localizado o si este ya es un cáncer invasivo o metastásico. Asimismo, se divide en subgrupos dependiendo de la expresión de diferentes biomarcadores tumorales, entre los más importantes están la expresión del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) y los receptores hormonales de progesterona (PR) y de estrógenos (ER), ya que estos juegan un papel importante en la toma de decisiones en el ámbito clínico y en la respuesta a los tratamientos dirigidos actuales [9].

Gracias a los avances en la biología molecular, se ha tratado de crear una estratificación del cáncer de mama con base en patrones de expresión génica, para así tener un pronóstico más acertado y determinar los blancos moleculares que pueden ser utilizados para el tratamiento de cada paciente. La secuenciación para este objetivo, no es utilizada de manera cotidiana ya que el costo es muy elevado, por lo que actualmente se busca el patrón de expresión de 50 genes específicos por medio de qRT-PCR, los cuales se seleccionaron a partir de la evaluación de un conjunto de 189 muestras que presentaban patrones definidos, dando lugar a la estratificación denominada PAM50 [10]. Con este análisis, los perfiles de expresión de PR, ER y HER2, el índice de proliferación y marcadores basales es posible clasificar al cáncer de mama en 6

subgrupos (**Figura 2**), los cuales son útiles en combinación con la determinación de las variables clínicas para conocer mejor el pronóstico, el riesgo a una recaída, la respuesta patológica y la selección de la mejor terapia posible para cada paciente [9, 11].



**Figura 2. Clasificación molecular del cáncer de mama.** Tipos de cáncer de mama definidos por su perfil de expresión molecular. ER: Receptor de estrógenos, PR: Receptor de progesterona, HER2: Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano, Zeb1: Homeobox 1 de unión a la E-box con dedos de zinc, K5: queratina 5, K14: queratina 14, EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico. (Imagen tomada y modificada de: [9]).

Debido a la detección oportuna y desarrollo de terapias más eficaces, la supervivencia actual a más de 5 años es aproximadamente del 90% en países de ingresos elevados y de entre 40 a 66 % en países con ingresos menores [1]. Sin embargo, existen subtipos dentro de este tipo de cáncer que provocan que los pacientes que los padecen presenten una supervivencia a más de 5 años sumamente reducida aun con la detección precoz, debido a su baja respuesta favorable a los tratamientos actuales, como es el caso del TNBC.

### **2.1.1 Cáncer de mama triple negativo (TNBC)**

Dentro del cáncer de mama, existe un subtipo particular que abarca del 15 al 20% del total de casos y que es más común en personas hispanas y afroamericanas, denominado cáncer de mama triple negativo, el cual se caracteriza por la ausencia de ER y PR, así como una baja o nula presencia del HER2 en las células que lo componen. Si bien el TNBC, no es el subtipo de cáncer de mama mayoritario, sí es el subtipo con el peor pronóstico, con una mortalidad del 40% de las pacientes en los primeros 5 años después de su diagnóstico. Debido a su alta capacidad invasiva el 46% de los pacientes con TNBC presentan metástasis distante y la tasa de reincidencia es del 25%; el TNBC reincidente tiene una mortalidad del 75% de los pacientes durante los primeros 3 meses [12].

Este fenotipo celular provoca que varias de las opciones terapéuticas utilizadas actualmente para el cáncer de mama sean ineficaces, ya que se utilizan, principalmente, moléculas dirigidas a modular la actividad de PR, ER y HER2, y con ello mejorar el efecto antitumoral o provocar la eliminación directa de estas células. Por tal motivo, para el tratamiento del TNBC es necesario recurrir a cirugía, a radioterapia y al uso de quimioterapias sistémicas convencionales que impiden la proliferación celular, la síntesis de DNA y que poseen efectos citotóxicos, entre los que se pueden destacar taxanos, antraciclinas, ciclofosfamida, agentes de platino, fluorouracilo o la combinación de estos. Sin embargo, en muchos de los casos la efectividad de estos fármacos también es reducida debido a la heterogeneidad de las características de las células que componen el tumor y los efectos indeseados llegan a ser mayores a los efectos terapéuticos ya que son tratamientos inespecíficos que actúan sobre varios tipos celulares, incluyendo células sanas [13].

Tomando en cuenta los subgrupos en los que se divide el cáncer de mama en general, cerca del 70-80% del TNBC se considera “tipo basal” [14]. Sin embargo, con el fin de mejorar la elección de tratamientos para volverlos más específicos y efectivos, se ha tratado de subdividir el TNBC en distintos grupos basados en biomarcadores tumorales, actividad metabólica y patrones de expresión génica. Actualmente existen 3 clasificaciones del TNBC principales. En primer lugar, se encuentra la clasificación de Lehmann et al., en la que, a partir de la sensibilidad a quimioterapia, comportamiento clínico, supervivencia y perfiles genéticos de 587 muestras de pacientes, se clasificó al TNBC en 6 subtipos: tipo basal 1 (BL-1), tipo basal 2 (BL-2), mesenquimal (M), mesenquimal tipo trocal (MSL), inmunomodulador (IM) y luminal con receptor

de andrógenos (LAR) [12, 15]. La segunda clasificación es la planteada por Burstein et al., quienes mencionan que no fue posible reproducir la detección específica de los 6 subgrupos de la clasificación de Lehmann et al., y que aun cuando muestra una mayor cantidad de subtipos específicos por la alta heterogeneidad era necesario organizar al TNBC en subtipos más estables donde se debían considerar las características moleculares, con el fin de mejorar la detección de blancos terapéuticos. Por tal motivo, se plantearon 4 grupos más generales a partir del análisis de expresión de los ácidos ribonucleicos mensajeros (mRNA, por sus siglas en inglés) y perfiles genéticos de ácido desoxirribonucleico (DNA, por sus siglas en inglés) de 198 muestras. Estos grupos se denominaron: luminal/receptor de andrógenos (LAR), mesenquimal (MES), tipo basal inmunosuprimido (BLIS) y tipo basal inmunoactivado (BLIA) [16]. Finalmente, la clasificación más reciente es la planteada por Liu et al. (2016), la cual considera la correlación entre los perfiles de expresión de mRNA y la presencia de RNA largos no codificantes (lncRNA, por sus siglas en inglés), ya que en estudios recientes se ha demostrado que los lncRNAs están estrechamente correlacionados con procesos patológicos, incluido el desarrollo de cáncer, y consideran que con ello se pueden crear grupos aún más estables para la identificación y selección de blancos terapéuticos personalizados para los pacientes. Teniendo en cuenta lo anterior Liu et al. realizaron el análisis de 165 muestras de tumores de TNBC y los clasificaron en 4 subtipos, que son: inmunomodulador (IM), luminal con receptor de andrógenos (LAR), tipo mesenquimal (MES) y tipo basal junto con el inmunosuprimido (BLIS) [12,17].

Con todo lo anterior se puede observar que se han tratado de desarrollar diferentes clasificaciones para mejorar el diagnóstico, pronóstico y elección de tratamiento para los pacientes con TNBC, sin embargo, es evidente que aún es limitado su uso como modelo único de referencia. El tratamiento del TNBC sigue siendo un reto clínico, por lo que todavía se están llevando a cabo investigaciones para descubrir otras alteraciones moleculares que lleven a identificar nuevos blancos terapéuticos para desarrollar medicamentos con una mayor especificidad y efectividad.

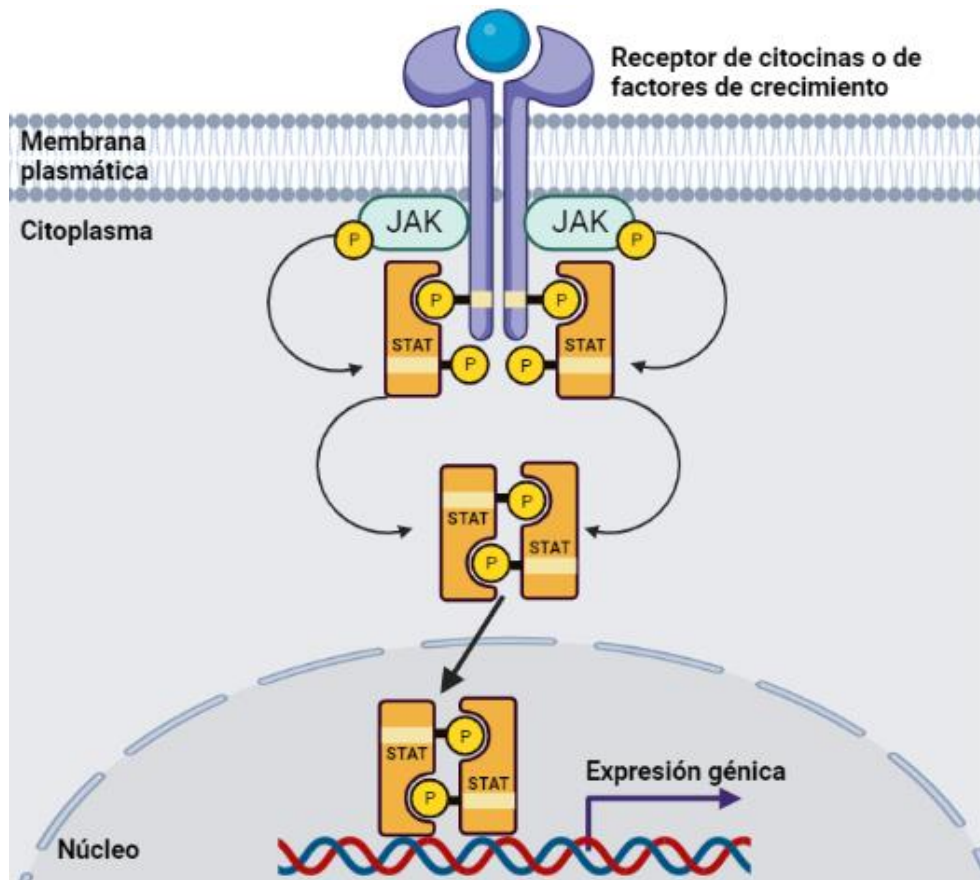
En el cáncer en general se presenta la alteración de diversas vías de señalización. En estudios recientes, particularmente en cáncer de mama, se ha determinado que entre las alteraciones principales que se presentan en el TNBC se encuentran en la vía de señalización de las cinasas Jano (JAK, por sus siglas en inglés) y las proteínas transductoras de señales y activadoras de

la transcripción (STAT, por sus siglas en inglés), la cual se encuentra activa constitutivamente y es una de las vías involucradas fuertemente en carcinogénesis, progresión de ciclo celular, efectos anti-apoptóticos, supervivencia celular, migración, quimioresistencia, mantenimiento del cáncer, invasividad, angiogénesis y metástasis [18, 19].

## **2.2 La vía JAK/STAT**

La vía de señalización de JAK/STAT está altamente conservada evolutivamente y se encuentra involucrada principalmente en la respuesta a citocinas. También es bien sabido que puede ser activada a través de algunos receptores con actividad de cinasa de tirosina (RTK, por sus siglas en inglés) de: factores de crecimiento, de hormonas y algunos acoplados a proteínas G [20, 21]. Gracias a estas múltiples formas de activación y dependiendo de la señal, el tejido y el contexto celular, esta vía puede generar repuestas de proliferación, diferenciación, migración, apoptosis y supervivencia celular. Además, se ha visto que esta vía de señalización es esencial en algunos procesos de desarrollo y homeostasis, incluyendo la hematopoyesis, desarrollo de las células del sistema inmunológico, mantenimiento de las células troncales, crecimiento del organismo y el desarrollo de la glándula mamaria. [21]

Esta vía utiliza la fosforilación secuencial de residuos de tirosina como mecanismo de transmisión de señal. Comienza con la activación de un receptor de citocinas por la unión de su ligando, lo que promueve al interior de la célula la fosforilación de JAK, la cual se encuentra asociada a la parte citoplásmica de estos receptores. Las proteínas JAK al fosforilarse se activan y provocan el reclutamiento y la fosforilación de las proteínas STAT, las cuales al encontrarse fosforiladas pueden formar dímeros que tienen la capacidad de translocarse al núcleo y unirse con elementos de respuesta del DNA y modular la transcripción de genes involucrados los procesos biológicos anteriormente descritos (**Figura 3**) [20, 21, 22].



**Figura 3. Vía de señalización de JAK/STAT.** Esquema general de la vía de señalización de JAK/STAT activada por un receptor de citocinas o de factores de crecimiento (Imagen creada con BioRender.com, tomada y modificada de [23])

Aun con su aparente simplicidad en componentes, la vía JAK/STAT, se encuentra incluida entre las 12 vías de señalización principales en el desarrollo del cáncer [20]. Sumado a esto, la vía JAK/STAT se encuentra implicada en el desarrollo del tejido mamario, por tal motivo se planteó que podría estar involucrada en el desarrollo de cáncer de mama. En diversos estudios se pudo observar que la proteína STAT3 se encuentra constitutivamente activa en las células de los tumores mamarios a diferencia del tejido sano que no presenta esta característica [21, 22].



### **2.2.1 La vía JAK2/STAT3 y el cáncer de mama**

La familia de las proteínas JAK comprende a las proteínas JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2, y la familia de las proteínas STAT está conformada de 7 miembros: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b, y STAT6. Sin embargo, las más estudiadas han sido JAK2 y STAT3, ya que son las que particularmente se han visto que están involucradas en más procesos biológicos incluyendo la formación de tumores. Se ha observado frecuentemente la activación constitutiva de JAK2/STAT3 en tumores sólidos y se ha asociado al incremento de la supervivencia celular, proliferación, angiogénesis, evasión del sistema inmunológico, carcinogénesis, resistencia a quimioterapéuticos, resistencia a la apoptosis y metástasis. Varios reportes indican que esta activación constitutiva de JAK2/STAT3 se presenta en gran parte de las muestras de diferentes subtipos de cáncer de mama [24, 25].

En el cáncer de mama se ha observado que las proteínas JAK2 y STAT3 presentan una alta tasa de mutación que da lugar a proteínas truncas y varias de estas mutaciones se encuentran relacionadas con la activación sostenida de la vía JAK2/STAT3 y son más frecuentes cuando se presenta metástasis distante [26].

### **2.2.2 La vía JAK2/STAT3 y el TNBC**

En el caso particular de TNBC, al no haber terapias dirigidas efectivas se han buscado nuevos blancos terapéuticos a través de perfiles genómicos y se han descubierto múltiples alteraciones en la señalización celular, entre las cuales se puede destacar la sobreexpresión y sobre activación de STAT3 que a su vez se encuentra íntimamente relacionado con el inicio, la progresión, la metástasis, la resistencia a la quimioterapia y las bajas tasas de supervivencia del TNBC [19].

Se ha visto que JAK2, contribuye a la fosforilación y activación de STAT3 de forma dependiente o independiente de los receptores que la activan de manera canónica y el uso *in vitro* de inhibidores de JAK2, como la silibinina [27] y el ácido ganodérico A [28], han generado efecto de inhibición en la viabilidad, migración e invasión de las células TNBC, así como la inducción de la apoptosis mediante la inhibición de la vía de señalización JAK2/STAT3 [19].

Conociendo todos los efectos que la alteración de la vía JAK2/STAT3 puede provocar en las células tumorales del TNBC y teniendo en cuenta que la inhibición de esta vía podría disminuir el crecimiento tumoral y la metástasis en TNBC [19], surge el interés en conocer cuáles son y

que actividad presentan, en el proceso de carcinogénesis, las moléculas que normalmente intervienen regulando esta vía, entre las que se puede destacar a la proteína LNK.

### **2.3 LNK (SH2B3)**

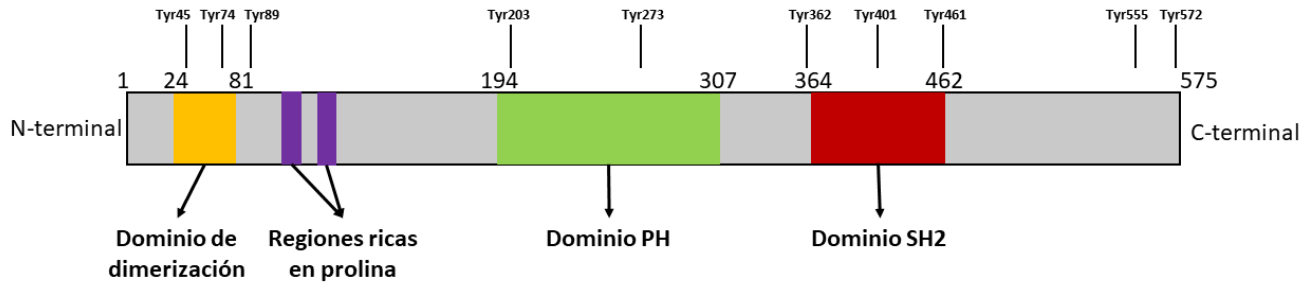
La proteína LNK es parte de la familia de proteínas adaptadoras SH2B, conformada por 3 miembros, SH2B1 (PSM), SH2B2 (APS), SH2B3 (LNK). Las proteínas de esta familia poseen 4 dominios principales (**Figura 4**):

- Un dominio de dimerización: Consiste en aproximadamente 60 residuos de aminoácidos (a.a.) cerca del extremo amino terminal que presentan un motivo de cremallera de fenilalanina en el centro, con el cual puede formar homodímeros y heterodímeros con otros integrantes de la familia SH2B.

- Una región rica en prolina: que es un motivo que contiene un mayor porcentaje de residuos de prolina que de otro aminoácido y que tiene una secuencia consenso mínima “Pro-X-X-Pro”, la cual favorece las interacciones proteína-proteína y que puede ser reconocida por dominios SH3 de otras proteínas [29, 30].

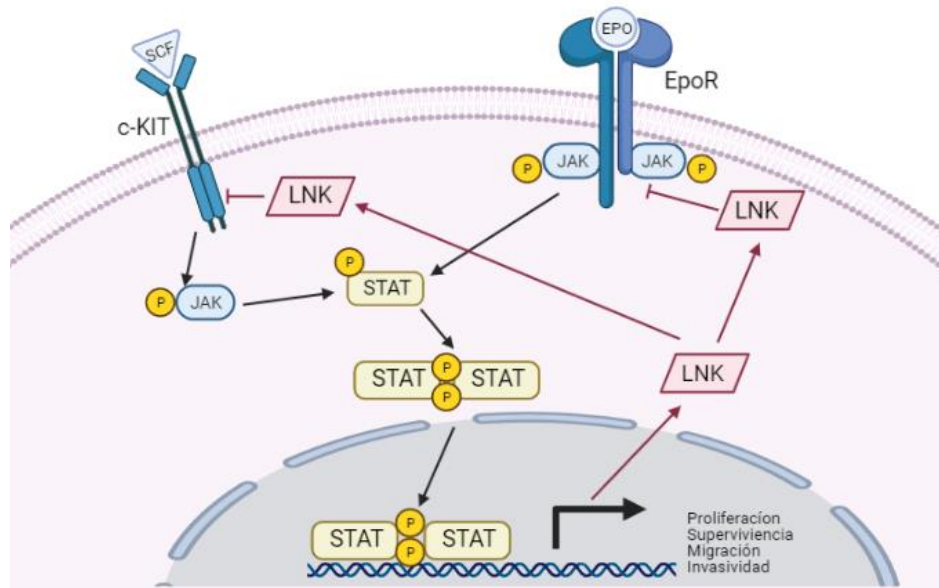
- Un dominio de homología a pleckstrina (PH): consiste en aproximadamente 120 residuos de a.a. que le confieren una afinidad con lípidos de fosfatidilinositol de las membranas biológicas y algunos receptores. Este dominio favorece la interacción con la membrana celular, donde se encuentran los blancos moleculares de esta proteína, por lo que se considera que es el encargado de dirigirla a la membrana y facilitar su función como reguladora de la vía de señalización [29, 30, 31].

- Un dominio de homología a Src 2 (SH2): que consiste en aproximadamente 100 residuos de a.a. identificados por primera vez en la oncoproteína Src, los cuales tienen la capacidad de reconocer de manera selectiva tirosinas fosforiladas y permiten que se una a proteínas que contienen esta marca y sirviendo generalmente para dirigir a LNK hacia sus sustratos, para regular su actividad [29, 30].



**Figura 4. Esquema de la organización estructural de la proteína adaptadora LNK (SH2B3).** Representación de la estructura de la proteína LNK mostrando los sitios más relevantes donde hay un residuo de tirosina y los dominios principales representados con diferentes colores, señalando los aminoácidos donde empiezan y terminan. PH: dominio de homología a pleckstrina, SH2: dominio de homología a Src 2, Tyr: sitios de tirosina. (Imagen tomada y modificada de [29, 30, 32])

En estudios previos se ha caracterizado a LNK como un regulador negativo de la señalización de algunas citocinas, como el factor de células troncales (SCF) y la eritropoyetina (EPO), debido principalmente a la modulación de la vía de señalización JAK2/STAT3. Interesantemente, el gen que codifica para LNK es blanco de STAT3, por lo que la transcripción de LNK se induce con la activación de la vía JAK2/STAT3. Posteriormente a su producción, LNK debe dirigirse hacia la membrana celular para interactuar con JAK2. Una vez que esto sucede, se impide la fosforilación de JAK2, provocando la inhibición de su actividad de cinasa, inhibiendo así la transducción de la señal cascada abajo de esta vía, por lo que se forma un circuito de autorregulación (**Figura 5**) [29, 30, 32, 33]. En trabajos realizados por Oh y colaboradores [34] se ha visto que mutaciones de LNK que afectan el dominio PH impiden que esta proteína se dirija hacia la membrana, evento que previene que LNK ejerza su efecto inhibitorio sobre la señalización JAK2/STAT3.



**Figura 5. Modulación de la vía de señalización JAK/STAT.** Representación de la participación de LNK como un regulador negativo de la señalización de citocinas por medio de la modulación de la vía de señalización JAK/STAT. Imagen creada con BioRender.com con base en: [29, 30, 32, 33].

Las modificaciones en la expresión de LNK, así como la presencia de mutaciones en esta proteína se han visto asociadas con una proliferación descontrolada y la transformación en células hematopoyéticas [32]. También se ha determinado que la expresión alterada de esta molécula está relacionada con padecimientos autoinmunes y cardiovasculares, así como con la formación de otros tipos de tumores [32].

### 2.3.1 LNK en tumores sólidos.

La investigación sobre la participación de esta proteína, particularmente en tumores sólidos, se encuentra en desarrollo. Sin embargo, se ha encontrado una expresión de LNK disminuida en el cáncer colorrectal. Además, se ha determinado que esta disminución está asociada con el incremento, *in vitro*, de la capacidad invasiva de las células de este tipo de cáncer [35]. En investigaciones en cáncer de ovario se ha podido observar una sobreexpresión de LNK en el tejido tumoral, que se encuentra relacionada con la resistencia a la muerte que presentan estas células *in vitro* y la promoción del crecimiento tumoral *in vivo* en modelos murinos, lo que sugiere que LNK puede actuar como un regulador positivo de la transducción de señales que favorecen a la carcinogénesis en este tipo de cáncer [36].

En varios estudios previos, se ha tratado de asociar el incremento del riesgo a presentar diversos tipos de cáncer, entre ellos el de mama, con la presencia del polimorfismo de un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés) rs3184504, en el que el gen SH2B3 presenta una sustitución de una citocina (alelo C) por una timina (alelo T) en la secuencia que codifica para el dominio PH de la proteína LNK, dando lugar a un cambio de una arginina por un triptófano en el residuo de aminoácido 262 [37, 38, 39, 40]. Sin embargo, estos resultados siguen siendo controversiales debido a que las asociaciones no son constantes en todos los trabajos.

En estudios *in silico* realizados por Palomero y colaboradores [41], se buscaron asociaciones entre el riesgo a padecer distintos tipos de cáncer y la presencia de poblaciones celulares del sistema inmune en microambiente tumoral (TME, por sus siglas en inglés). En el caso particular del cáncer de mama, se pudo observar que el riesgo a padecerlo disminuye mientras mayor sea la infiltración de células del sistema inmune. También se encontraron asociaciones de la alteración en la expresión de LNK y la presencia de sus variantes, con la modificación de la función, cantidad y poblaciones de células del sistema inmune que se encuentran en el TME, y estas alteraciones a su vez se encontraban asociadas con el aumento del riesgo de padecer cáncer de mama. Se pudo observar que la expresión del gen SH2B3 era mayor en las células de cáncer de mama comparadas con el tejido mamario sano, y que se presentaba una correlación positiva entre la expresión de SH2B3 y la edad a la que fue diagnosticado el cáncer de mama. Además, se logró establecer una correlación positiva entre la edad de las pacientes que padecían cáncer de mama con la cantidad de basófilos, leucocitos y monocitos presentes en sangre periférica. Los autores mencionan que gracias a que la proteína LNK es crucial para el correcto desarrollo y funcionamiento de las células del sistema inmune, estas asociaciones pueden estar relacionadas con una deficiencia en la función de esta proteína, e incluso proponen que el aumento farmacológico de la función de LNK podría disminuir el riesgo de padecer cáncer de mama, pero que esto debe de ser estudiado con mayor profundidad. [41].

Existe un único reporte en el que se menciona a LNK asociada a TNBC, en el cual se relaciona la sobreexpresión de LNK con el aumento de la proliferación y migración de las células tumorales *in vitro* e *in vivo*, y con el incremento de la activación de las proteínas AKT, ERK1/2, STAT3 y STAT5, que están involucradas en la promoción de la carcinogénesis en diversos tipos de cáncer [42]. Sin embargo, ninguno de los estudios anteriormente mencionados describe lo que

podría estar sucediendo con la proteína LNK en las células de TNBC que dé lugar a la promoción del cáncer. Por lo tanto, es necesario investigar sobre la participación de LNK en la bioquímica particular de TNBC, con fin de encontrar la causa de la alteración de su función y establecer si esta proteína adaptadora podría ser utilizada en el futuro como un biomarcador tumoral o incluso como blanco terapéutico.

### **3. Antecedentes**

En la caracterización bioquímica de las células MDA-MB-468, MDA-MB-231, HCC70, HCC1937 y HCC1806, provenientes de TNBC, un hallazgo de nuestro grupo de investigación fue la identificación de la expresión del receptor c-KIT, del cual se sabe que es una de las proteínas que participa en el inicio de la señalización JAK2/STAT3 por la estimulación del factor de células troncales (SCF, por sus siglas en inglés).

En estudios preliminares de nuestro equipo de trabajo, se determinó, por medio de secuenciación, que las líneas celulares MDA-MB-468, MDA-MB-231, HCC70, HCC1937 y HCC1806, son homocigotas al alelo C en el SNP rs3184504, que se encuentra en la región del gen SH2B3 que codifica para el dominio PH de la proteína LNK.

### **4. Justificación**

Dada la importancia epidemiológica que presenta el TNBC y la falta de tratamientos dirigidos para este padecimiento, este proyecto se encaminó a identificar nuevos biomarcadores y analizar la participación de proteínas que pudieran estar modulando el proceso de carcinogénesis en este tipo de cáncer.

Los antecedentes del papel de LNK en cáncer hematológico y algunos tumores sólidos, incluyendo las pocas investigaciones que hay sobre esta proteína en el TNBC, indican que, si bien LNK es un regulador negativo natural de la vía JAK2/STAT3, únicamente la expresión anormal de esta proteína o la presencia de una variante en específico no explica por completo la desregulación que se presenta en este tipo de cáncer. Por lo tanto, sería importante corroborar la expresión y presencia de LNK en el TNBC, al igual que conocer la localización intracelular y el papel que juega la proteína LNK en el TNBC, para favorecer a futuros estudios de posibles blancos terapéuticos y desarrollo de fármacos que mejoren el pronóstico de los pacientes que presentan esta afección.

## **5. Hipótesis**

La proteína LNK presente en células de cáncer de mama triple negativo se encontrará deslocalizada y no podrá regular negativamente a JAK2.

## **6. Objetivo**

Determinar la expresión, presencia y localización subcelular de la proteína adaptadora LNK en el tejido y células provenientes de cáncer de mama triple negativo.

## **7. Objetivos particulares**

- Utilizar bases de datos bioinformáticas para conocer la expresión de LNK, en tejido humano sano y tumoral, y en diferentes líneas celulares derivadas de cáncer de mama.
- Determinar la cantidad de mRNA de LNK y la producción de la proteína LNK en líneas celulares de cáncer de mama triple negativo con el uso de qPCR y Western blot.
- Determinar la localización intracelular de la proteína LNK en líneas celulares de cáncer de mama triple negativo por medio de técnicas de inmunofluorescencia.
- Determinar el estado basal de la vía JAK2/STAT3 en líneas celulares de TNBC.
- Determinar si existe alguna mutación en el gen que codifica a la proteína LNK en las líneas celulares de TNBC que pudiera ocasionar la deslocalización de la proteína al interior de la célula.



## 8. Metodología

### 8.1 Cultivo celular

Las líneas celulares utilizadas en el proyecto fueron: HCC1806 (ATCC CRL-2335), HCC1937 (ATCC CRL-2336), HCC70 (ATCC CRL-2315), MDA-MB-468 (ATCC HTB-132) y MDA-MB-231 (ATCC CRM-HTB-26). Todas estas fueron derivadas de tumores mamarios triple negativos y obtenidas de la *American Type Culture Collection (ATCC)*. Las características de cada línea celular se muestran en la **Tabla 1**.

Línea celular	Etapas clínicas	Tipo de carcinoma	Características
HCC1806	Grado 2, etapa IIB	Carcinoma de células escamosas	-Adherentes -Tumor primario -Morfología tipo basal
HCC1937	Grado 3, etapa IIB	Carcinoma primario de ducto mamario	-Adherentes -Tumor primario -Morfología tipo basal
HCC70	Grado 3, etapa IIIA	Carcinoma primario de ducto mamario	-Adherentes -Tumor primario -Morfología tipo basal
MDA-MB-231	Metástasis	Adenocarcinoma	-Adherentes - Derivado de Glándula mamaria / drenado pleural -Morfología tipo basal
MDA-MB-468	Metástasis	Adenocarcinoma	-Adherentes - Derivado de Glándula mamaria / drenado pleural -Morfología tipo basal

**Tabla 1. Líneas celulares de TNBC del proyecto.** Nombre y principales características de las líneas de cáncer de mama triple negativas utilizadas en este proyecto.

Adicionalmente se utilizó la línea celular MCF-10A (CRL-10317) como un control debido a que es no tumorigénica y fue aislada de tejido epitelial de la glándula mamaria.

Todas las líneas celulares de TNBC se mantuvieron en medio RPMI 1640 con glutamina estable (Biowest) suplementado con 8% de suero fetal bovino (FBS, por sus siglas en inglés) inactivado,

y solución de antibiótico-antimicótico al 1X (10,000 unidades/ml de penicilina, 10,000 µg/ml de estreptomicina y 25 µg/ml de anfotericina B, de marca Gibco). Se mantuvieron en una Incubadora ELITE II (REVCO) a 37°C con una atmósfera húmeda con 5 % de CO<sub>2</sub>.

## 8.2 Western blot

Para evaluar la producción de las proteínas, así como su fosforilación, se utilizó la técnica de Western blot (WB). Se sembraron las líneas celulares de TNBC en cajas de 6 pozos y se expandieron hasta una confluencia del 80%, a continuación, se desprendieron de manera mecánica con ayuda de un raspador de células. La suspensión de células se centrifugó a 14,000 rpm (6000 xg), durante 15 min a 4°C. Posteriormente se lisaron las células incubándolas 20 min con buffer RIPA (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, SDS al 0.1%, deoxicolato de sodio al 0.5 %, Nonident P-40 al 1%) y añadiendo inhibidores de proteasas (cOmplete Tablets, Mini EASYpack marca Roche) e inhibidores de fosfatasa (cóctel Halt marca Thermo Scientific). Se cuantificó la proteína presente en cada lisado celular por el método explicado por el proveedor del kit “DC Protein Assay” (BioRad), utilizando albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés) para realizar una curva patrón y se midió la absorbancia con un espectrofotómetro Elx800 (BIO-TEK). Con una cámara de electroforesis vertical Mini-PROTEAN Tetra Vertical (BioRad) se realizó una electroforesis SDS-PAGE en geles de acrilamida al 10%, con 30 µg de las muestras de proteínas, previamente desnaturalizadas durante 5 min en calentamiento a 96°C y en buffer de muestra (Tris 0.5 M, SDS al 10%, glicerol al 15%, Azul de Bromofenol al 0.1%, mercaptoetanol al 1%, disueltos en agua), y se corrió a 120 V constantes durante 1.5 h. Una vez que fueron separadas las proteínas se transfirieron durante 2 h a 250 mA constantes en una cámara de transferencia semi-húmeda Owl HEP-3 (Thermo Scientific) a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF, por sus siglas en inglés) de tamaño de poro de 0.45 µm (Millipore), utilizando amo de transferencia (Tris base 25 mM, Glicina 190 mM). Posteriormente, las membranas se bloquearon durante 2 h utilizando una solución de leche sin grasa al 5 u 8% disuelta en buffer TBS-T (Tris base 20 mM, NaCl 0.137 M, TWEEN 20 al 0.2%), una vez bloqueadas, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario: anti-LNK (A-12 sc-393709, monoclonal de ratón, marca Santa Cruz) 1:1000, anti-STAT3 fosfo Y705 (B-7 SC-8059, monoclonal de ratón, marca Santa Cruz) 1:500, anti-STAT3 (GTX108630, policlonal de conejo, marca GeneTex) 1:800, anti-JAK2 (ab108596, monoclonal de conejo, marca Abcam) 1:800,

anti-JAK2 fosfo Y1007 + Y1008 (ab32101, :monoclonal de conejo, marca Abcam) 1:800 y anti-GAPDH (GTX100118, policlonal de conejo, marca GeneTex) 1:5000 , durante toda la noche a 4°C. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 10 min con buffer TBS-T y se adicionó el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón (GTX77315, policlonal de cabra, marca GeneTex) 1:20000 y anti-IgG de conejo (GTX213110-01, policlonal de cabra, marca GeneTex) 1:20000, acoplados a la peroxidasa de rábano picante (HRP, por sus siglas en inglés) y se incubó durante 2 h, para luego realizar 3 lavados de 10 min con buffer TBS-T . Por último, se realizó la detección en placas fotográficas por medio de quimioluminiscencia utilizando el reactivo “Clarity Western ECL Substrate” (BioRad) o con el reactivo “SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate” (Thermo Scientific).

### **8.3 Inmunofluorescencia**

Se sembraron las líneas celulares en “chamber slides” especiales para este ensayo marca Thermo Scientific, y se incubaron 24 h a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> para permitir su adherencia a la superficie. A continuación, se fijaron las células con una solución de paraformaldehído (PFA) al 1% disuelto en medio RPMI + 10 % de FBS, durante 10 min a temperatura ambiente. Se lavaron 3 veces con PBS (NaCl 0.137 M, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.01 M y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.8 mM en agua), se permeabilizó la membrana utilizando Tritón X-100 al 0.05 % diluido en PBS durante 5 min, se realizaron 3 lavados con PBS, 3 lavados con PBS + glicina 0.1 M y 3 lavados con PBS. Posteriormente, se incubaron con TBS (Tris base 20 µM, NaCl 0.13 M en agua) durante 20 min y de hicieron 3 lavados con PBS. Se añadió solución de bloqueo (PBS + 3 % BSA) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, se adicionó el anticuerpo primario anti-LNK a una concentración de 1:50 diluido en PBS + 3% de BSA y Tritón X-100 al 0.05 %, y se dejó incubando toda la noche a 4°C. Se realizaron 3 lavados de 5 min con PBS. Se procedió a añadir el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado a AlexaFluor555 (A31570, policlonal de burro, marca Invitrogen) a una concentración de 1:200 diluido en PBS + 5 % de BSA y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente en oscuridad, nuevamente se realizaron 3 lavados con PBS de 5 min. Finalmente se añadió 5 µL de solución de montaje VECTASHIELD (VECTOR Laboratories) con una concentración de 1.5 µg/mL de DAPI a cada pozo con células y se colocó un cubreobjetos sobre las muestras, y para terminar el montaje se selló la laminilla con esmalte para uñas. Finalmente, para determinar cualitativamente la localización subcelular de LNK, se

tomaron fotografías con el uso de un microscopio invertido de fluorescencia IX71 (Olympus) y con un microscopio confocal A1R+STORM (Nikon) y se realizó un análisis visual de las imágenes obtenidas.

#### **8.4 Extracción de RNA**

Para obtener el RNA total de las líneas celulares, se sembraron en botellas de cultivo y se desprendieron con el uso de tripsina (Gibco) o verseno (Tris base 25 mM, NaCl 0.137 M, KCl 5.4 mM y EDTA 1.4 mM en agua). De cada línea celular se tomaron 350  $\mu\text{L}$  de una suspensión celular a una concentración suficiente para tener más de  $1 \times 10^7$  células, y con esta muestra se procedió a hacer la extracción como indica el protocolo del kit “RNeasy Mini” (QIAGEN), eluyendo al final el RNA con 35  $\mu\text{L}$  del buffer indicado por el proveedor. Para corroborar la integridad del RNA extraído se realizó una electroforesis con un gel de agarosa al 1% + 1  $\mu\text{L}$  de bromuro de etidio y se visualizó con un transiluminador UV Slimline Series (Spectroline).

#### **8.5 Síntesis de cDNA**

Para obtener el DNA complementario (cDNA) del RNA previamente extraído, se utilizó el kit “Maxima First Strand cDNA Synthesis for RT-qPCR” (Thermo Scientific). Los reactivos se agitaron utilizando vortex por 3 segundos y se centrifugaron 5 segundos a 10,000 rpm (3000 xg). Se preparó el master mix como lo indica el protocolo, añadiendo por cada muestra a analizar: 4  $\mu\text{L}$  del “Reaction Mix (x5)”, 2  $\mu\text{L}$  de “Maxima Enzyme Mix”. Posteriormente, se colocaron 6  $\mu\text{L}$  del master mix y se añadió 0.9  $\mu\text{g}$  del RNA extraído y purificado previamente de cada línea celular, y agua para completar los 20  $\mu\text{L}$  de volumen total. Finalmente, los tubos se colocaron en el Termociclador T100 (BioRad) y se incubaron durante 10 min a 25°C, 15 min a 50°C y 5 min a 85°C. El cDNA obtenido se cuantificó y almacenó a -70°C para su posterior uso en qPCR.

#### **8.6 qPCR con SYBR GREEN**

Para evaluar la cantidad producida del mRNA de LNK y de GAPDH, se utilizó el kit “Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)” (Thermo Scientific). Los reactivos se agitaron utilizando el vortex por 3 segundos y se centrifugaron 5 segundos a 10,000 rpm (3000 xg). Se preparó el master mix como lo indica el protocolo, adicionando por cada muestra a analizar:

12.5  $\mu\text{L}$  del “Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)”, 1 $\mu\text{L}$  del oligonucleótido Sec LNKF (5'-GCAGTTCACCGACCTCTTCCA-3') a una concentración de 10  $\mu\text{M}$ , 1 $\mu\text{L}$  del oligonucleótido Sec LNKR (5'-GGGGTCTCAGCAGCCTCTCC-3') a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  y 8.5  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas. Posteriormente en una placa fría se colocaron los tubos para PCR que se iban a utilizar y se dispensó 23  $\mu\text{L}$  del master mix en cada uno. Se añadió 500 ng del cDNA obtenido previamente, se cerró el tubo, se mezcló suavemente. Finalmente, se introdujeron los tubos al termociclador para qRT-PCR QuantStudio5 de 0.2mL (Applied Biosystems) y se realizó el siguiente programa: una desnaturalización inicial de 10 min a 95°C y 40 ciclos de 15 s de desnaturalización a 95°C, 30 s de alineamiento a 60°C y 30 s de extensión a 72°C. De igual manera se realizó una qPCR para detectar la expresión de GAPDH para utilizarlo como gen de control interno de expresión, para ello se utilizaron por cada muestra a analizar: 12.5  $\mu\text{L}$  del “Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)”, 1 $\mu\text{L}$  del oligonucleótido GAPDH MR FWR (5'- CAGCCTCAAGATCATCAGC-3') a una concentración de 10  $\mu\text{M}$ , 1 $\mu\text{L}$  del oligonucleótido GAPDH MR REV (5'-ATGATGTTCTGGAGAGCCCC-3') a una concentración de 10  $\mu\text{M}$ , 8.5  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas, 500 ng de cDNA obtenido previamente y se realizó el mismo programa del termociclador mencionado anteriormente. Todos los datos de fluorescencia fueron adquiridos durante los pasos de extensión.

### **8.7 Extracción de DNA genómico**

Con el fin de obtener DNA genómico para su posterior secuenciación, se sembraron las líneas celulares en botellas de cultivo y se desprendieron con el uso de tripsina o verseno. De cada línea celular se tomó una alícuota de la suspensión celular a una concentración suficiente para tener  $5 \times 10^6$  células, y con esta muestra se procedió a hacer la extracción como indica el protocolo del kit “QIAamp DNA Mini” (QIAGEN), eluyendo al final el DNA con 24  $\mu\text{L}$  del buffer indicado por el proveedor. Para corroborar la integridad del DNA extraído se realizó una electroforesis con un gel de agarosa al 1% y 1  $\mu\text{L}$  de bromuro de etidio, y se visualizó con un transiluminador de luz UV.

### **8.8 Secuenciación**

Para la obtención de la secuencia de los nucleótidos comprendida entre el nucleótido 195 al 518 del gen SH2B3, se requirieron los servicios proporcionados por el laboratorio Langebio-

Cinvestav y fue realizada con secuenciación por el método de Sanger, utilizando los oligonucleótidos: Sec LNKF (5'-GCAGTTCACCGACCTCTTCCA-3') y Sec LNKR (5'-GGGGTCTCAGCAGCCTCTCC-3').

### **8.9 Análisis de datos**

Los resultados de WB se analizaron con el software ImageJ. Las gráficas muestran el promedio de tres repeticiones independientes de cada experimento. La significancia estadística se estableció realizando una prueba de T de Student de dos colas utilizando Excel.

Los resultados de inmunofluorescencia directa y confocal se analizaron con los programas ImageJ y Fiji, con los cuales se obtuvieron las imágenes correspondientes.

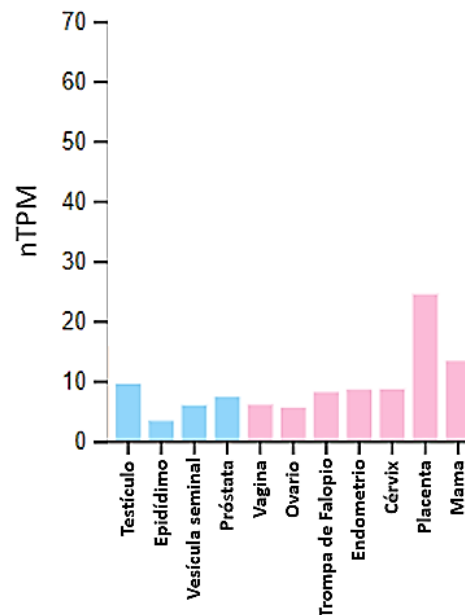
Los resultados obtenidos para la qPCR fueron analizados con el software "QuantStudio Design and Analysis". Utilizando Excel se pudo obtener la variación de expresión al realizar el método de análisis denominado delta delta Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ).

Los resultados de secuenciación se analizaron con el programa DNASIS Max, y las páginas: BLAST del NIH (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), Translate de Expasy (<https://web.expasy.org/translate/>), Translate de Bioinformatics (<https://www.bioinformatics.org/sms2/translate.html>), NLStradamus de Moses Lab (<http://www.moseslab.csb.utoronto.ca/NLStradamus/>) .

## 9. Resultados

### 9.1 Análisis de la expresión del gen SH2B3 (LNK) utilizando bases de datos bioinformáticas.

Con la finalidad de determinar la expresión del gen SH2B3 en tejido mamario sano, se realizó el análisis en la base de datos Atlas de las Proteínas Humanas (HPA, por sus siglas en inglés). En los datos presentados en la base HPA se puede observar que el tejido mamario sano es uno de los tejidos del sistema reproductivo que presenta la mayor expresión de SH2B3 (**Figura 6**) [43].

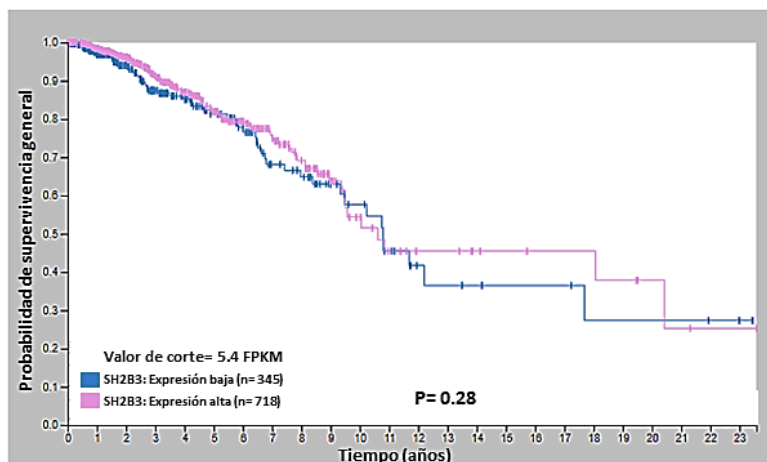


**Figura 6. Expresión de SH2B3 en tejido del sistema reproductor masculino y femenino sano.** Nivel de expresión del gen SH2B3 en tejido del sistema reproductor masculino (barras azules) y sistema reproductor femenino (barras rosas). nTPM: transcritos por millón normalizados (por sus siglas en inglés). Gráfica tomada y modificada de:[43].

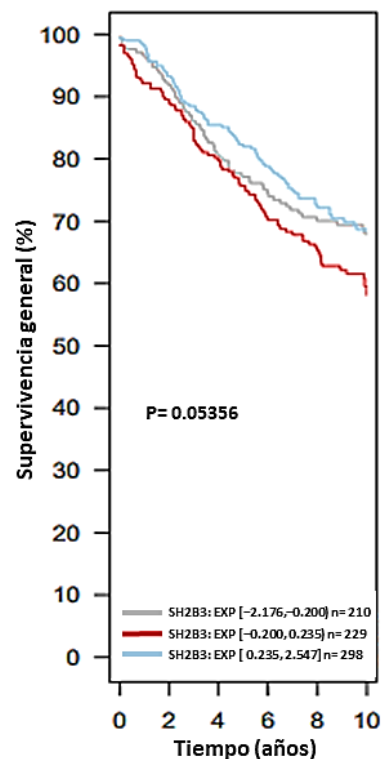
Adicionalmente, se revisaron los datos de la base HPA obtenidos mediante el análisis de célula única, y se observó que la mayor expresión de SH2B3 se presenta en células del sistema inmune presentes en el tejido mamario analizado, y en segundo lugar en las células endoteliales del tejido mamario sano [43].

Al revisar los datos en el HPA y en la base especializada en cáncer de mama, GOBO (Gene expression-based Outcome for Breast Cancer), se pudo observar que la expresión de SH2B3 puede encontrarse alterada en algunos pacientes con cáncer de mama, por lo tanto, para determinar si la alteración de la expresión de SH2B3 impacta en la supervivencia de los pacientes, se realizó inicialmente una búsqueda de datos de supervivencia en ambas bases. En la base del HPA se encontró que no existe una diferencia significativa en la supervivencia de los pacientes con una alta expresión de SH2B3 comparados con los que tenían una baja expresión (**Figura 7-A**). En la base GOBO, con los intervalos de expresión asignados por los autores, sí se notó una tendencia de mayor supervivencia en los pacientes que presentaban un aumento y disminución de la expresión de SH2B3 en comparación de los que tenían una expresión media (**Figura 7-B**). Sin embargo, esta última observación tampoco presentó una diferencia estadísticamente significativa.

**A**



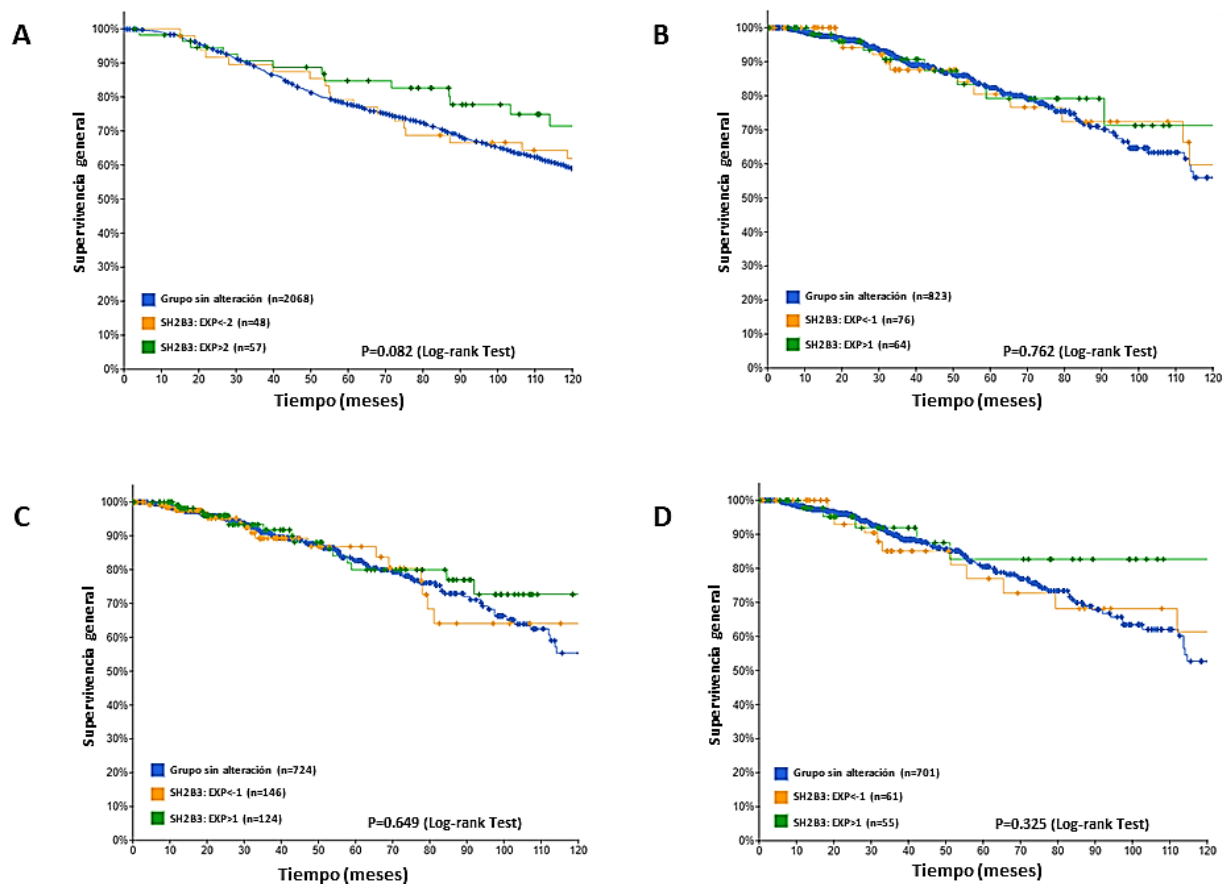
**B**



**Figura 7. Supervivencia general de pacientes con cáncer de mama relacionada con la expresión de SH2B3.** **A)** Probabilidad de supervivencia general en pacientes con cáncer de mama con relación a la expresión de SH2B3 obtenidos de la base HPA (n=1063). **B)** Porcentaje de supervivencia general en todos los pacientes que presentan cáncer de mama, analizados para la base GOBO, con relación a la expresión de SH2B3 (n=737). Graficas tomadas y modificadas de: [43 Y 44].

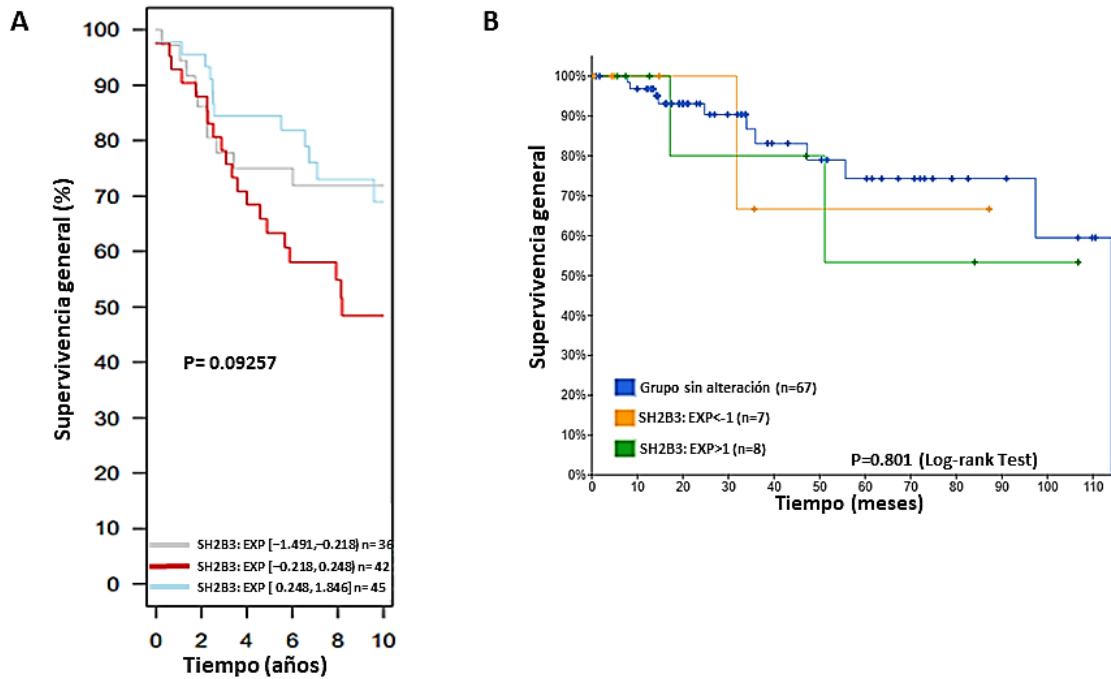


Para profundizar más en la búsqueda de posibles asociaciones de supervivencia con la expresión de SH2B3, en la plataforma denominada cBioPortal se realizaron los análisis de 4 conjuntos de datos de diversos estudios sobre la expresión de SH2B3 y su relación con la supervivencia en cáncer de mama en general. En las gráficas de la **Figura 8** se puede observar que en ninguno de los análisis se encontró una correlación positiva significativa entre la alteración de la expresión de SH2B3 con la disminución o aumento de la supervivencia de los pacientes con cáncer de mama. Únicamente en el primer y cuarto conjunto de datos analizados (**Figura 8-A y 8-D**) se aprecia una tendencia de que en los pacientes con un aumento en la expresión de SH2B3 se presenta una mayor supervivencia, comparados con los pacientes que no presentan alteración en la expresión o que presentan una baja expresión de SH2B3, aunque esta no alcanzó la significancia estadística.



**Figura 8. Análisis de la supervivencia general de pacientes con cáncer de mama relacionada con la expresión de SH2B3.** **A)** Supervivencia general en pacientes con cáncer de mama con relación a la expresión de SH2B3, obtenido del análisis de los estudios: [45, 46, 47] (n=2173). **B)** Supervivencia general en pacientes con cáncer de mama invasivo con relación a la expresión de SH2B3, obtenido del análisis de datos de la base TCGA, para el proyecto Firehose Legacy (n=963). **C)** Supervivencia general en pacientes con cáncer de mama invasivo con relación a la expresión de SH2B3, obtenido del análisis de datos de la base TCGA, para el proyecto PanCancer Atlas (n=994). **D)** Supervivencia general en pacientes con cáncer de mama invasivo con relación a la expresión de SH2B3, obtenido del análisis de datos de la base TCGA obtenidos del estudio: [48] (n=817). Graficas tomadas y modificadas de: [49].

Finalmente se quiso averiguar si la expresión de SH2B3 podría tener impacto en la supervivencia de los pacientes con TNBC, para ello se utilizó la base de datos GOBO y la plataforma cBioPortal. En la base de datos GOBO no se permitía el análisis conjunto de todos los datos de TNBC y se realizó el análisis únicamente con los datos de los pacientes que presentaron cáncer de mama tipo basal, que como ya fue mencionado en la introducción este tipo de cáncer representa el 80% del TNBC y es la categoría de la que se podían aislar los datos. El análisis de los datos de cáncer de mama tipo basal de la base GOBO (**Figura 9-A**), no mostró una diferencia significativa de supervivencia general entre los pacientes con alta, media o baja expresión de SH2B3, pero de igual manera que en los datos para cáncer de mama en general, se podía ver una tendencia con el paso de los años, de una mayor supervivencia en los pacientes que presentaban una expresión alterada de SH2B3. En el análisis realizado en cBioPortal (**Figura 9-B**), se pudo delimitar a los pacientes con TNBC únicamente del estudio realizado por Perou y colaboradores [48] y en este conjunto de datos se pudo observar que pocas muestras entraban en la categoría de TNBC y que además no presentaba ninguna diferencia significativa en la supervivencia de los pacientes que tenían alta, media o baja expresión de SH2B3.



**Figura 9. Supervivencia general de pacientes con TNBC relacionada a la expresión de SH2B3. A)** Porcentaje de supervivencia general en pacientes con cáncer de mama tipo basal (clasificación de PAM50) con relación a la expresión de SH2B3 obtenidos del análisis de los datos de la base GOBO [17] (n=123). **B)** Supervivencia general en pacientes con TNBC con relación a la expresión de SH2B3 obtenidos del análisis de datos de la base TCGA, para el artículo: [48] (n=82). Graficas tomadas y modificadas de: [44 y 49].

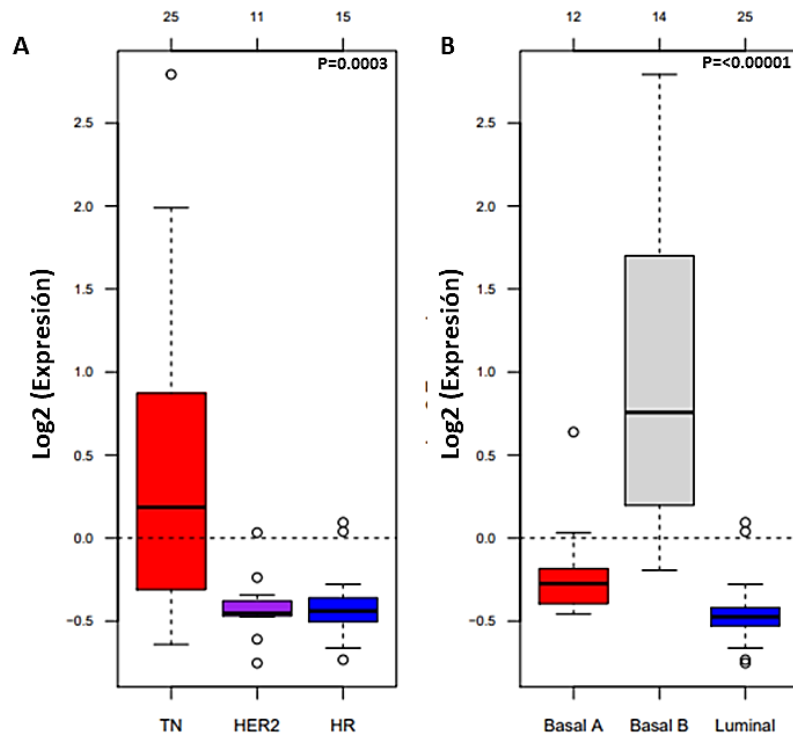
En conjunto, los datos obtenidos a través de todos los análisis sugieren que no existe una relación directa entre la alteración de la expresión de SH2B3 y el aumento o disminución de la supervivencia de los pacientes.

Luego de estos análisis se quiso determinar si existían datos sobre la expresión de SH2B3 en líneas celulares específicamente de TNBC. Se encontraron datos en la base HPA sobre las 5 líneas utilizadas en este proyecto, y se pudo ver que todas presentan expresión de SH2B3. En la **Figura 10** se puede observar que particularmente la línea MDA-MB-231 presenta una expresión de SH2B3 significativamente mayor que las demás, seguida de la HCC1806, HCC1937, HCC70 y finalmente la MDA-MB-468.



**Figura 10. Expresión de SH2B3 en líneas celulares de cáncer de mama.** Nivel de expresión del gen de la proteína LNK en líneas celulares derivadas de tumores en tejido mamario. Los datos de las líneas celulares de TNBC que se utilizaron en el proyecto se encuentran señalados con una flecha roja. nTPM: transcritos por millón normalizados. Imagen tomada y modificada de: [43]

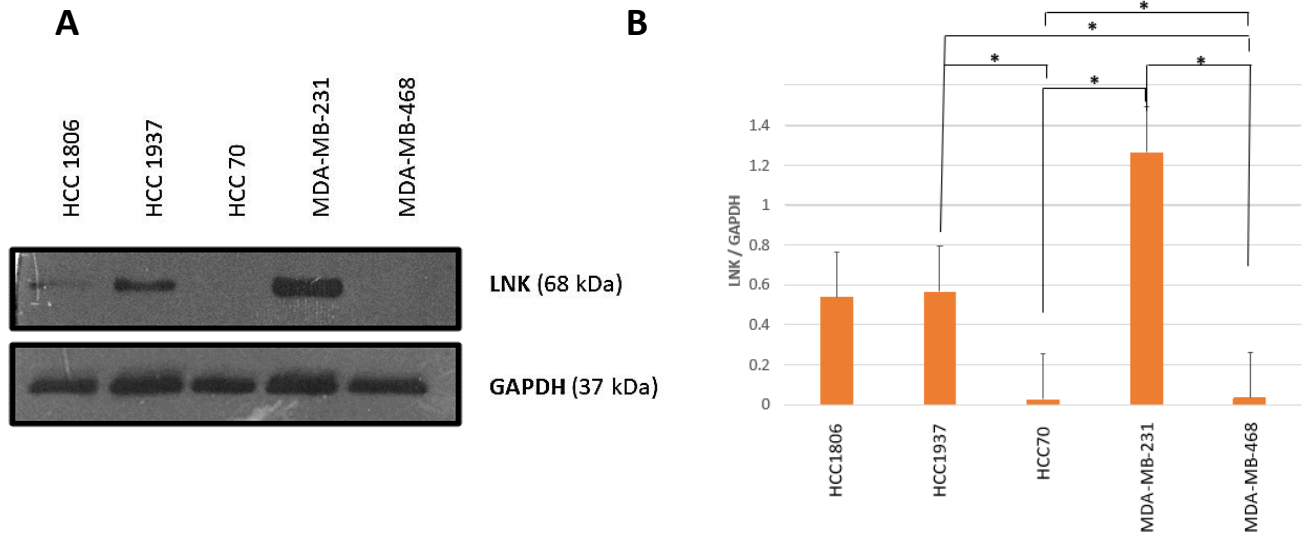
Para el caso de la expresión de SH2B3 en las líneas celulares de TNBC en la base GOBO, se pudo observar que, al agrupar las líneas celulares de cáncer de mama en subtipos clínicos, las líneas celulares de TNBC presentan una expresión significativamente mayor que las demás líneas. Al separar las líneas en subtipos de cáncer de mama tipo basal A, tipo Basal B y luminal, se pudo observar que las líneas del cáncer de mama tipo basal A y B tienen una mayor expresión de SH2B3 que las luminales, además de que el conjunto de líneas de cáncer de mama tipo basal B tenían una expresión significativamente mayor que todas las demás (**Figura 11**).



**Figura 11. Expresión de SH2B3 en grupos de líneas celulares de cáncer de mama.** **A)** Nivel de expresión del gen de la proteína LNK en líneas celulares de cáncer de mama derivadas de tumores pertenecientes a diferentes subgrupos clínicos, en la gráfica se puede ver a los subgrupos TN: células de TNBC (caja roja, n=25), HER2: células HER2+ (caja morada, n=11) y HR: células positivas a receptores de hormonas (caja azul, n=15) **B)** Nivel de expresión del gen de la proteína LNK en líneas celulares de cáncer de mama dividido en tipo basal A (caja roja, n=12), tipo basal B (caja gris, n=14) y luminal (caja azul, n=25). Gráficas tomadas y modificadas de: [44]

## 9.2 Determinación de la producción de LNK en líneas de TNBC

Para corroborar la presencia de la proteína LNK en las líneas celulares de TNBC utilizadas en el proyecto, se realizó un WB. En este experimento se pudo determinar que la proteína LNK se encontraba presente en todas las líneas de TNBC, y se encontró una abundante presencia de LNK en las líneas HCC1806, HCC1937 y MDA-MB-231 y una escasa presencia de LNK en las líneas HCC70 y MDA-MB-468. Realizando la cuantificación relativa de LNK por medio de densitometría, se pudo observar que existían diferencias significativas entre la cantidad de LNK presente en las líneas HCC1937, HCC70, MDA-MB-468 y MDA-MB-231, siendo MDA-MB-231, la línea con mayor cantidad de LNK (**Figura 12**).



**Figura 12. Detección de la proteína LNK en las líneas de TNBC. A)** Western blot para determinar la presencia de la proteína LNK en las líneas celulares HCC1806, HCC1937, HCC70, MDA-MB-468 y MDA-MB-231 **B)** Cuantificación de la abundancia relativa de LNK, mediante densitometría en las líneas celulares HCC1806, HCC1937, HCC70, MDA-MB-468 y MDA-MB-231. (t de student, n=3, \*p≤0.05).

### 9.3 Determinación de la cantidad de mRNA de LNK en líneas celulares de TNBC

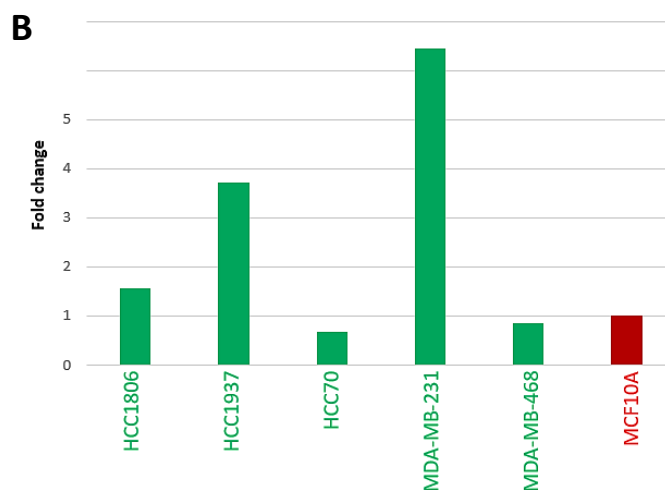
El análisis de la presencia de la proteína LNK mostró que las líneas celulares presentan diferentes niveles de la misma. Con el fin de determinar si la diferencia en la producción de la proteína LNK entre las líneas celulares está asociada con una variación a nivel transcripcional e incluyendo a la línea no tumoral MCF10A como control, se realizó una qPCR evaluando al mRNA de LNK y al mRNA de la proteína gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH, por sus siglas en inglés). Con este ensayo fue posible determinar que todas las líneas presentaban producción de mRNA de LNK. Se observó que, para las líneas de TNBC, los datos obtenidos de la cuantificación del mRNA de LNK presentaban la misma tendencia que los obtenidos por medio de WB. La línea MDA-MB-231 presentó una mayor cantidad de mRNA de LNK que las demás líneas, seguida de las líneas HCC1937, HCC1806, MDA-MB-468 y en último lugar la línea HCC70.

Posteriormente, se realizó un análisis  $\Delta\Delta C_t$  (Figura 13) para conocer la variación la cantidad de mRNA de LNK entre las líneas de TNBC comparadas contra la línea no tumorigénica, con este análisis se pudo determinar que las líneas HCC1937, HCC1806, MDA-MB-231, presentaban

una mayor cantidad de mRNA de LNK que la línea MCF10A, y las líneas HCC70 y MDA-MB-468, presentaban una menor cantidad que el control no tumorigénico. Lo cual tiene relación lo observado en las bases de datos y en el WB presentado en la **Figura 12**.

**A**

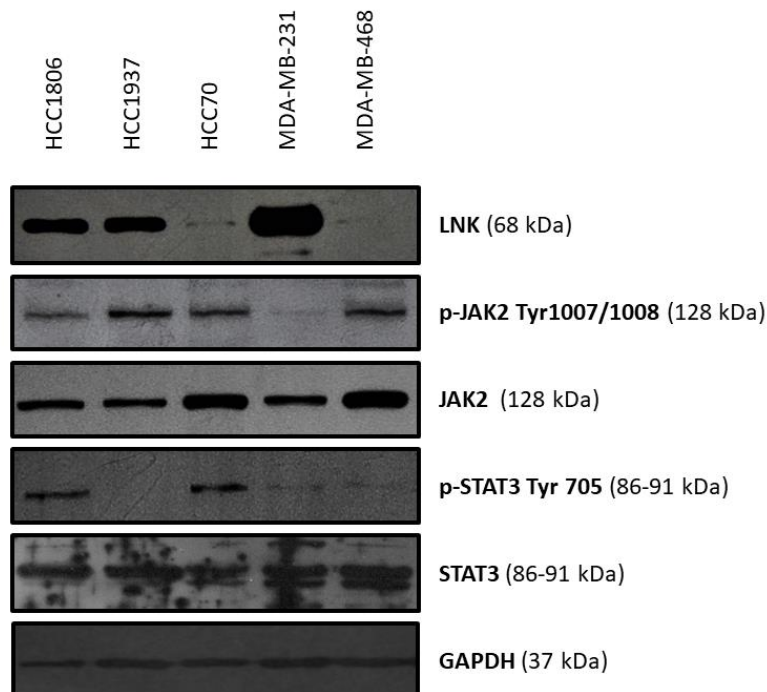
Línea celular	Ct LNK	Ct GAPDH	$\Delta Ct = Ct \text{ del gen blanco} - Ct \text{ del gen constitutivo}$	$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ de la muestra} - \Delta Ct \text{ del control}$	Fold change $= 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$
HCC1806	29.18	16.04	13.14	-0.64	1.56
HCC1937	26.82	14.94	11.88	-1.89	3.72
HCC70	30.23	15.88	14.35	0.57	0.67
MDA-MB-231	26.16	15.07	11.09	-2.69	6.44
MDA-MB-468	30.35	16.35	14.00	0.23	0.85
MCF10A	29.75	15.97	13.78	0	1



**Figura 13. Cuantificación del mRNA de LNK en las líneas de TNBC.** **A)** Tabla de valores de Ct obtenidos en la qPCR para el mRNA de LNK y GAPDH junto con el análisis  $\Delta\Delta Ct$  para las líneas celulares HCC1806, HCC1937, HCC70, MDA-MB-468, MDA-MB-231 y MCF10A **B)** Variación de la cantidad de mRNA de LNK entre las líneas de TNBC comparadas contra la línea MCF10A. Las líneas celulares de TNBC se encuentran representadas por columnas de color verde y la línea no tumorigénica utilizada como control se encuentra representada por una columna roja.

#### 9.4 Estado basal de la vía JAK2/STAT3 en las líneas de TNBC

Para obtener más información sobre las proteínas integrantes de la vía que regula LNK se utilizó la técnica de WB para determinar la presencia de STAT3 y JAK2, así como su fosforilación basal (**Figura 14**). Con estos WB, se determinó que todas las líneas tienen un nivel de STAT3 similar, pero su fosforilación es diferente. Las líneas HCC1806 y HCC70 presentan una mayor fosforilación de STAT3, seguidas de las líneas MDA-MB-468 y MDA-MB-231, y en el caso de la línea HCC1937 no se alcanza a apreciar que STAT3 se encuentre fosforilado. La proteína JAK2 se encuentra mayormente fosforilada en las líneas MDA-MB-468, HCC1937 y HCC70 seguida de la línea HCC1806 y en último lugar, la línea MDA-MB-231. Al observar los WB de la línea MDA-MB-231, sugieren que LNK puede estar ejerciendo su función reguladora sobre la vía ya que se puede observar una disminución en la fosforilación de JAK2 y STAT3, posiblemente asociada a la gran cantidad de LNK presente. Para el caso de la línea HCC70, podría asociarse la fosforilación constitutiva de JAK2 y STAT3, con la baja expresión de LNK, que como ya se ha mencionado es un regulador negativo de la activación de esta vía. En el caso de las líneas HCC1806, HCC1937 y MDA-MB-468, pareciera no haber relación entre la expresión de LNK y la activación o inhibición de la vía JAK2/STAT3.



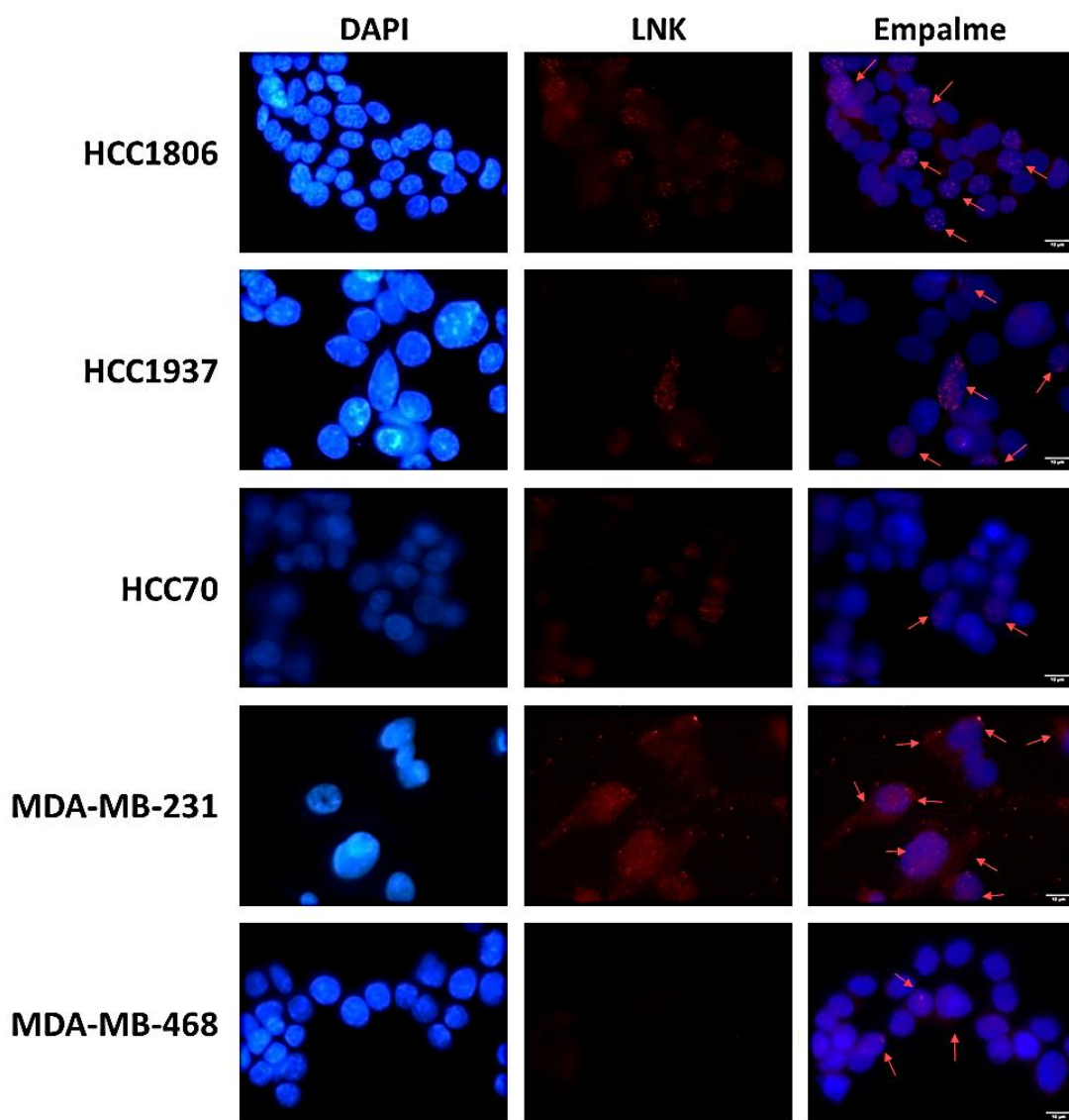


**Figura 14. Detección de las proteínas STAT3 y JAK2 en las líneas de TNBC.** Western blot para determinar la presencia de las proteínas STAT3 y JAK2, así como su nivel de fosforilación basal en las líneas celulares HCC1806, HCC1937, HCC70, MDA-MB-468 y MDA-MB-231.

## **9.5 Determinación de la localización intracelular de la proteína LNK en líneas celulares de TNBC**

### **9.5.1 Microscopía de fluorescencia**

Los anteriores resultados, sugieren que la variación de la expresión de LNK no es el factor determinante que ocasiona una alteración en su actividad regulatoria sobre la vía JAK2/STAT3. Tomando en cuenta que la localización celular de LNK es crucial para su correcta función regulatoria, se quiso determinar si la proteína LNK se encontraba localizada cerca de la membrana celular en cada una de las líneas de TNBC, ya que la membrana celular es el lugar en donde se encuentran sus blancos moleculares. Para poder determinar la localización subcelular, se realizó un marcaje fluorescente de la proteína LNK y del núcleo. Posteriormente, las células se visualizaron con un microscopio de fluorescencia. Con ello, se pudo observar que todas las líneas celulares presentaban marca positiva de la proteína LNK (**Figura 15**). Sin embargo, se pudo ver que la línea celular MDA-MB-231 presenta una mayor señal fluorescente correspondiente a LNK en comparación con las demás líneas, seguida de las líneas HCC1937 y HCC1806, y finalmente las líneas HCC70 y MDA-MB-468. Estos datos coinciden con los obtenidos por medio de WB.



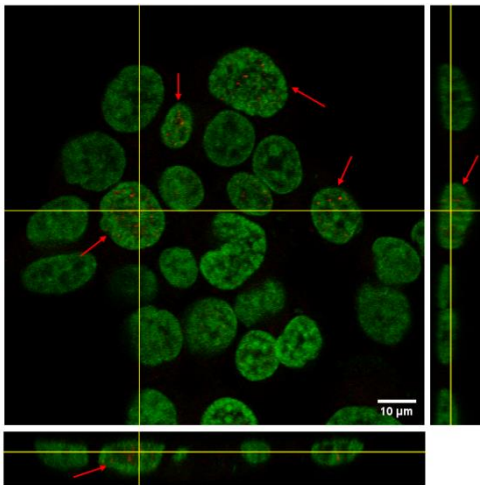
**Figura 15. Inmunofluorescencia para la detección de LNK en las líneas de TNBC.** Marcaje nuclear (DAPI) y de LNK (Alexa flúor 555, señalado con flechas rojas) en las líneas celulares HCC1806, HCC1937, HCC70, MDA-MB-468 y MDA-MB-231. Aumento: 60x. Barra de escala equivalente a 10  $\mu$ m.

Una vez realizado el empalme de las imágenes de la tinción de núcleo y de LNK, se pudo apreciar que en las líneas celulares HCC70, HCC1937 y HCC1806, la marca de la proteína LNK se encontraba concentrada en la zona del núcleo. En el caso de las líneas MDA-MB-468 y MDA-MB-231 se observó una distribución de LNK posiblemente citoplasmática y nuclear.

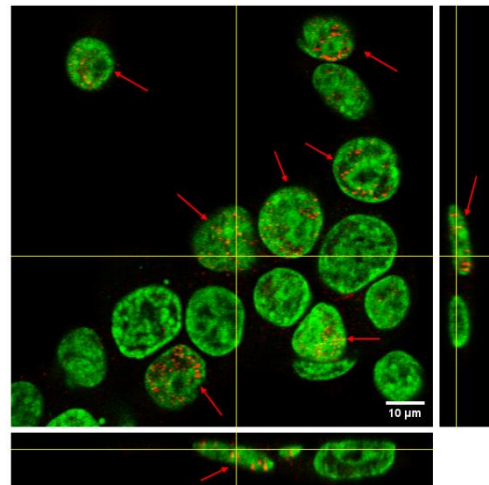
### 9.5.2 Microscopía confocal

Para determinar la localización exacta de LNK dentro de las células, se procedió a utilizar microscopía confocal para la obtención de imágenes tridimensionales. Con los resultados obtenidos se determinó que la proteína LNK, se encontraba principalmente dentro del núcleo de las células HCC1937 y HCC1806, y que en las células HCC70, MDA-MB-468 y MDA-MB-231 se encontraba en citoplasma y una pequeña cantidad dentro del núcleo (**Figura 16**). Sin embargo, ninguna de las líneas celulares presentó el patrón de distribución membranar esperado.

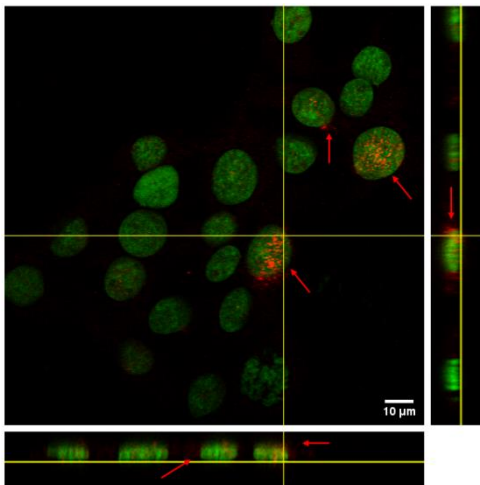
HCC1806



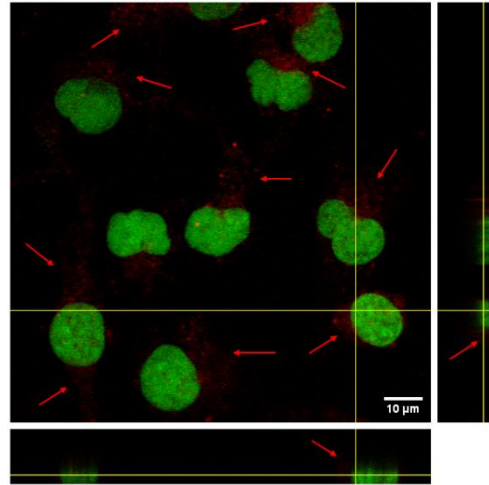
HCC1937



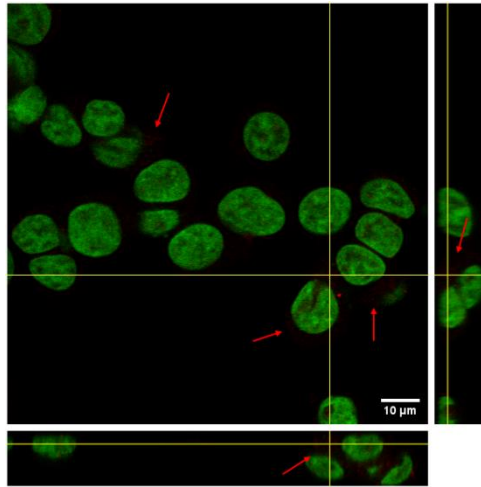
HCC70



MDA-MB-231



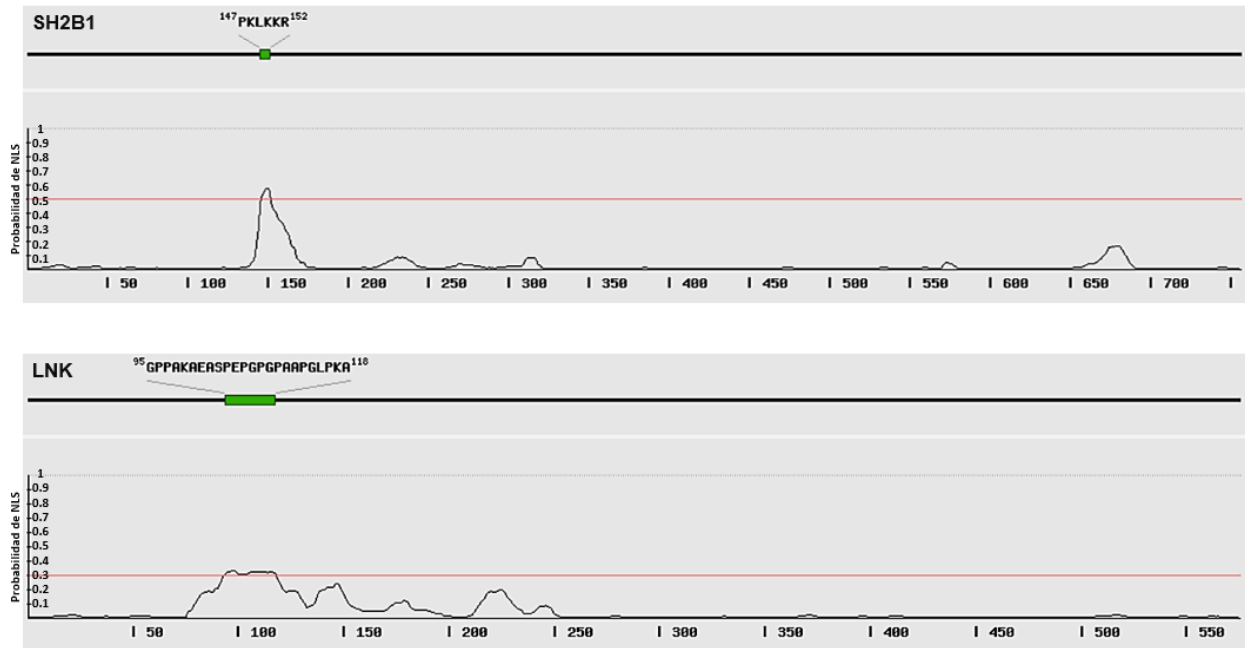
**MDA-MB-468**



**Figura 16. Microscopía confocal para determinar la localización de la proteína LNK en las líneas de TNBC.** Marcaje nuclear (Verde: DAPI) y de LNK (Rojo: Alexa flúor 555, señalado con flechas rojas) en las líneas celulares HCC1806, HCC1937, HCC70, MDA-MB-468 y MDA-MB-231. Aumento: 60x.

## 9.6 Determinación de mutaciones del gen de LNK.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos sobre la localización de LNK, se observó que la proteína LNK no se encuentra en la cara interna de la membrana citoplasmática. La cara interna de la membrana citoplasmática es el lugar donde se esperaría encontrar localizada a la proteína LNK, por ser el espacio subcelular en el que se encuentran sus proteínas blanco. En estudios previos sobre la secuencia de a.a. de las 3 proteínas de la familia SH2B, se determinó que la secuencia proteica de la proteína SH2B1 comprendida entre los a.a 147 al 152 funciona como señal de localización nuclear (NLS, por sus siglas en inglés). Sin embargo, en este mismo estudio se reporta que LNK no presenta esta secuencia [50]. Tomando en cuenta lo anterior, se realizó el análisis de las posibles señales de localización nuclear en la secuencia de a.a de las proteínas SH2B1 y LNK con el programa NLStradamus para poder comparar los sitios de mayor probabilidad de presentar un péptido señal de entrada al núcleo y obtener el porcentaje de probabilidad de que estos sean funcionales. Al analizar la secuencia de la proteína SH2B1, con la herramienta NLStradamus, nos da como resultado la misma secuencia previamente reportada como NLS y esta zona de la secuencia tiene una probabilidad del 50% de funcionar como péptido señal de entrada al núcleo. Sin embargo, al analizar y comparar la secuencia de la proteína LNK, si bien se puede ver un pico de mayor probabilidad de tener un a posible NLS en la misma zona que lo obtenido para la proteína SH2B1, la probabilidad de funcionar como péptido señal de entrada al núcleo es de únicamente de 30% (Figura 17).



**Figura 17. Comparación de posibles NLS en las secuencias de a.a de las proteínas SH2B1 y LNK.** Predicción de las posibles NLS en las secuencias de a.a. obtenidas para las proteínas SH2B1 y LNK, y su probabilidad de funcionar como péptido señal de entrada al núcleo. El eje “x” indica la posición de los a.a. en la secuencia proteica. El eje “y” indica la probabilidad de funcionar como NLS. El umbral de probabilidad se encuentra marcado por la línea roja. Los rectángulos verdes indican la parte de la secuencia que rebasa el umbral de probabilidad asignado, y en la parte superior se indica con letras la secuencia que corresponde a estos sitios. Imágenes obtenidas con la plataforma NLStradamus [52].

En otros estudios de diversas patologías, incluyendo algunos tipos de cáncer hematológico, se ha reportado que la proteína LNK presenta mutaciones que disminuyen su afinidad por la membrana celular, impidiendo su movilización hacia este lugar donde se encuentran sus blancos moleculares. También se han reportado mutaciones de LNK que impiden directamente la modulación de la actividad de sus proteínas blanco, debido a que se ve alterada su capacidad de interacción [33, 34, 63]. Por tal motivo, realicé una búsqueda sobre las mutaciones de LNK que se reportan para cáncer de mama. En esta búsqueda no hubo datos de mutaciones reportadas específicamente para TNBC. Sin embargo, en un reporte previo se describe una mutación relacionada particularmente con cáncer de mama, la mutación descrita es de cambio de sentido y da lugar a una proteína con la modificación: p.Pro129Ser [29]. En la plataforma cBioPortal realicé el análisis de todos los conjuntos de datos de las mutaciones de LNK reportadas en cáncer de mama en general y encontré que en el residuo de a.a 122 de la

secuencia proteica se reporta una mayor acumulación de mutaciones que en el resto de la proteína, destacando una mutación con cambio de sentido p.Glu122Lys y una mutación sin sentido p.Glu122\*. Con los resultados del anterior análisis surgió el interés en determinar si estas mutaciones reportadas para cáncer de mama pueden dar lugar a la aparición de un potencial péptido señal de entrada al núcleo. En este análisis se pudo observar que la única mutación que aumentaba la probabilidad de que LNK presentara una NLS funcional, fue la mutación con cambio de sentido p.Glu122Lys, este cambio da lugar a una posible NLS con una probabilidad de un 60% de que funcione como un péptido señal de entrada el núcleo (**Figura 18**).



**Figura 18. Comparación de posibles NLS en las secuencias de a.a de la proteína LNK incluyendo las mutaciones reportadas para cáncer de mama.** Predicción de las posibles NLS en las secuencias de a.a. obtenidas para LNK luego de incluir las mutaciones reportadas para cáncer de mama, y su probabilidad de

funcionar como péptido señal de entrada al núcleo. El eje “x” indica la posición de los a.a. en la secuencia proteica. El eje “y” indica la probabilidad de funcionar como NLS. El umbral de probabilidad se encuentra marcado por la línea roja. Los rectángulos verdes indican la parte de la secuencia que rebasa el umbral de probabilidad asignado, y en la parte superior se indica con letras la secuencia que corresponde a estos sitios. Imágenes obtenidas con la plataforma NLStradamus [52].

Cabe destacar, que todas las mutaciones mencionadas anteriormente se encontraban presentes en la parte de la secuencia original de a.a. en las que se presentaba la zona con mayor probabilidad de encontrar una NLS. Con el fin de determinar si existía algún cambio genético que dieran lugar a la aparición de una NLS clásica en las líneas de TNBC estudiadas y con ello sustentar la observación previa que se obtuvo por medio de microscopia, decidí realizar la secuenciación de la sección del DNA correspondiente a la secuencia de a.a. comprendida entre el residuo del aminoácido 65 al 173, ya que en esta parte de la secuencia de a.a. es donde se encuentran los cambios generados por las mutaciones de los reportes de cáncer de mama, previamente mencionados, y también en esta parte de la secuencia se engloba a los a.a que funcionan como NLS en la proteína SH2B1. Al realizar esta secuenciación no se encontró ningún cambio en la secuencia de nucleótidos, por lo que no se ve alterada la secuencia de aminoácidos, logrando determinar que al menos en esta parte de la secuencia no existen alteraciones genéticas que provoquen la aparición de un péptido señal de entrada al núcleo en estas líneas celulares de TNBC.

## **10. Discusión**

Es bien sabido que la expresión génica en células tumorales comparada con células sanas se encuentra alterada, y este evento a su vez da lugar a un proteoma diferente. La expresión desregulada de algunos genes puede contribuir al proceso de transformación de las células, por lo que el conocer los patrones de expresión proteica en las células cancerígenas puede ser de gran ayuda para conocer nuevos biomarcadores tumorales y nuevos blancos terapéuticos. En el caso particular del TNBC, la ausencia de PR, ER y HER2 ha limitado el uso de tratamientos dirigidos contra estas moléculas, sumado a la quimioresistencia que se presenta en este tipo de cáncer, evidencia la gran importancia en determinar la existencia de variaciones en la expresión de otras proteínas que pudieran estar modulando el proceso de la carcinogénesis o que podrían ser utilizadas en un futuro como nuevos biomarcadores o posibles blancos terapéuticos.



Al realizar una búsqueda de las vías que presentan más alteraciones en tumores sólidos se pudo observar que la activación constante de la vía JAK2/STAT3 está implicada en el desarrollo y progresión de neoplasias malignas, y el cáncer de mama no es la excepción [24]. En el cáncer de mama en general y en el TNBC, hay diversos reportes que indican que existe una alteración de la vía de señalización JAK2/STAT3 y que esta alteración es una de las principales que se encuentra involucrada en la progresión del cáncer, además de que se relaciona con una baja supervivencia en los pacientes [19, 24, 25]. Se ha visto que en TNBC la vía JAK2/STAT3 se encuentra constitutivamente activa y que esta señalización aberrante es ocasionada por alteraciones moleculares en distintos puntos de la cascada de señalización, principalmente mutaciones y amplificaciones de las proteínas JAK2 y STAT3 [24]. Sin embargo, no se descartan alteraciones en otras proteínas integrantes de esta vía, ya que el descubrimiento de nuevas alteraciones y su participación en la carcinogénesis se encuentran en investigaciones en desarrollo.

Para el cáncer de mama en general se han probado *in vitro* algunos inhibidores de la vía JAK2/STAT3 y se ha visto que la inhibición de esta vía promueve la apoptosis y disminuye la viabilidad celular, migración y la capacidad invasiva, pero se ha determinado que es necesaria la optimización de las estructuras moleculares de estos inhibidores para así evitar la citotoxicidad en las células normales y aumentar la estabilidad para mejorar el tratamiento [24, 53, 54].

Debido a que STAT3 juega un papel crítico en el inicio, progresión, resistencia a la quimioterapia, metástasis y baja supervivencia en el TNBC se ha planteado la posibilidad de desarrollar terapias dirigidas a la modulación de la activación de esta proteína para el tratamiento del TNBC. Se han planteado el uso de fármacos que modulen su fosforilación, que impidan la expresión de STAT3, que impidan la unión de STAT3 al DNA o que se unan directamente a las proteínas STAT3 modulando su unión con otras proteínas que lo activan o promoviendo su degradación [19].

Otros de los rumbos que ha seguido la investigación sobre la modulación de STAT3 se basan en: 1) La regulación de inhibidores intrínsecos de STAT3, incluyendo a proteínas fosfatasa de tirosina (PTPs, por sus siglas en inglés), los supresores de señales de citocinas (SOCS, por sus siglas en inglés) y la proteína inhibidora de STAT activado (PIAS, por sus siglas en inglés). 2)

La modulación aguas arriba de STAT3 incluyendo a la regulación de proteínas que contribuyen directamente a su activación, como es el caso de la proteína JAK2. Sin embargo, la regulación de STAT3 solo es considerada aun como una forma potencial de tratamiento, ya que aun cuando se han descubierto estos efectos benéficos no se ha logrado aumentar la especificidad de estos inhibidores y tampoco se ha logrado aumentar la efectividad en TNBC de estos tratamientos *in vitro* e *in vivo* [19].

Por tal motivo es importante seguir investigando que sucede con algunos de los moduladores naturales que presenta la vía, tal es el caso de la proteína LNK, de la cual se conoce que es uno de los principales inhibidores de la fosforilación de JAK2, y gracias a ello impide su activación, así como la progresión de la señalización en vía JAK2/STAT3, además se sabe que principalmente la activación misma de la vía JAK2/STAT3 da lugar a la producción de LNK, lo que genera un ciclo cerrado de autorregulación [29, 30, 32, 33].

Teniendo en cuenta la necesidad de conocer más sobre el papel que tienen las proteínas reguladoras de la vía JAK2/STAT3, la modulación que provoca la proteína LNK en la modulación de la vía JAK2, así como el uso potencial de estos moduladores aguas arriba de STAT3 como blancos terapéuticos en TNBC, surge el interés en conocer cómo se encuentra expresada y la función de la proteína LNK en el TNBC. Inicialmente se analizaron los datos en bases bioinformáticas sobre la presencia de la proteína LNK en diferentes tejidos y líneas celulares. La proteína LNK se encuentra presente en mayor cantidad en tejido mamario sano en comparación con otros tejidos del sistema reproductor femenino y se pudo observar que las células que presentaban una mayor presencia de LNK eran los macrófagos presentes en el tejido mamario y las células epiteliales de dicho tejido. La presencia abundante de macrófagos en el tejido mamario es entendible ya que son parte fundamental del estroma de la glándula mamaria, además de que permiten el desarrollo normal de esta glándula [55], y es bien sabido que LNK es una de las principales proteínas encargada de regular la proliferación en la hematopoyesis [56] por lo que se puede explicar la abundancia de LNK en tejido mamario debido a la numerosa presencia de estas células del sistema inmune.

En el caso de las células epiteliales, la abundancia de LNK podría indicarnos una fuerte participación en procesos biológicos que ocurren en este tipo de tejido y teniendo en cuenta que la mayoría de los diferentes tipos de cáncer de mama inician con la transformación de

células epiteliales [57], podrían sugerir una participación importante de LNK en procesos carcinogénicos en el cáncer de mama. Por tal motivo es que se quiso conocer a partir del análisis bioinformático, que relación podría tener la expresión de LNK con la supervivencia de los pacientes con cáncer de mama y con TNBC. Se pudo observar una ligera tendencia entre una mayor expresión de LNK y una mayor sobrevivida, esto podría entenderse ya que LNK es un regulador de la vía JAK2/STAT3, la cual está fuertemente involucrada en procesos de carcinogénesis en este tejido y si esta proteína se encuentra en cantidades abundantes y funcional, podría estar modulando la vía JAK2/STAT3, impidiendo el progreso del cáncer de mama. Sin embargo, en ningún resultado de estos análisis se muestra una diferencia significativa supervivencia entre los pacientes con alta, media y baja expresión de LNK, lo que podría indicar que la expresión de la proteína LNK no está relacionada directamente en el aumento o disminución de la supervivencia.

Dada la importancia que tiene la falta de respuesta a tratamientos específicos para TNBC y el impacto que tienen las alteraciones de proteínas reguladoras de la vía JAK2/STAT3, es que nace el interés en determinar lo que está sucediendo con LNK al interior de las células. Por ello, para comenzar con el estudio de la proteína LNK en TNBC, se seleccionaron 5 líneas celulares, HCC1806, HCC1937, HCC70, MDA-MB-231 y MDA-MB-468, todas ellas de TNBC, pero con diferencias en etapa clínica o en tumores de procedencia. Inicialmente, se realizó una búsqueda en bases bioinformáticas sobre la expresión de LNK en las líneas celulares y se encontró que en todas las líneas se presentaba expresión de LNK. Al realizar un análisis más profundo de las características bioquímicas de las 50 líneas celulares de cáncer de mama presentadas en la gráfica de expresión de LNK de la base HPA (**Figura 10**) se pudo observar la presencia de 2 grupos, el primer grupo de líneas celulares comprendía todas las líneas celulares con un valor de nTPM de SH2B3 $\geq$ 3 (a partir de la línea CAL-120), en este grupo conformado por 30 líneas celulares se podía observar una mayor proporción de líneas de TNBC (20 líneas celulares de TNBC de las 30 líneas celulares del grupo) y el segundo grupo de líneas celulares comprendía las 20 líneas celulares con un valor de nTPM de SH2B3 $\leq$ 2.9 (a partir de la línea HCC1428), para este grupo se pudo observar únicamente la presencia de 2 líneas reportadas como TNBC (CAL-148, HCC2157) [58, 59]. Luego de revisar la base HPA, se procedió a revisar los datos de expresión del gen SH2B3 en líneas celulares de la base especializada GOBO, y en ella se pudo observar que al formar grupos con las líneas celulares analizadas para la expresión del

gen SH2B3 (**Figura 11-A**), el grupo de células de TNBC presenta una expresión significativamente mayor a las no TNBC. El análisis de estos datos nos indica que, si bien la expresión del gen SH2B3 es mayor en TNBC, esta proteína reguladora parece no poseer su función biológica esperada.

Conociendo los datos presentados en las bases de datos, se decidió comenzar la investigación *in vitro* evaluando la presencia de la proteína LNK y cuantificando el mRNA de LNK en las líneas celulares de TNBC. Primeramente, se realizó un WB para determinar la presencia de LNK en las líneas de TNBC seleccionadas para el estudio, en este se pudo observar que únicamente en 3 de las líneas (HCC1806, HCC1937 y MDA-MB-231) era evidente la presencia de LNK, en las líneas HCC70 y MDA-MB-468 se podía observar una presencia muy ligera de la proteína LNK, incluso en algunas de las repeticiones del WB parecía no haber presencia de LNK en estas últimas 2 líneas. Resultados que concuerdan con los datos de expresión de las bases HPA y GOBO, pero que no concuerda con la observación hecha por Jianxin Lv y colaboradores, en la que se aprecia una mayor presencia de LNK en la línea MDA-MB-468 que en la línea HCC1937 [42]. Sin embargo, esto puede ser explicado debido a que la metodología empleada, los reactivos utilizados son diferentes. Jianxin Lv y colaboradores, utilizaron un anticuerpo primario anti-LNK policlonal y para este proyecto se utilizó un anticuerpo monoclonal. El uso de un anticuerpo monoclonal puede incrementar la precisión de marcaje de LNK y reducir señales inespecíficas en el WB. Jianxin Lv y colaboradores, utilizaron BSA para realizar el bloqueo, un tiempo menor de incubación con el anticuerpo secundario y un reactivo de menor sensibilidad para la detección quimiolumincente, factores que podrían modificar de manera significativa la detección de la proteína LNK por medio de WB.

Sumado a esto, en el WB, las líneas de TNBC fueron acomodadas en orden creciente de la etapa clínica de la que fueron obtenidas, para determinar si existía alguna asociación entre la etapa clínica y el nivel de expresión de LNK. Contrario a lo esperado, se pudo observar que si bien entre las líneas HCC1806, HCC1937 y MDA-MB-231 se podía ver una tendencia creciente de expresión LNK relacionada con el avance de la etapa clínica, en la línea HCC70 de una etapa intermedia y en la MDA-MB-468 de una etapa metastásica no había grandes cantidades de esta proteína, con lo que fue posible descartar esta asociación.

Consultando nuevamente las bases bioinformáticas, se buscó la expresión de LNK en líneas de cáncer de mama no triple negativo y se pudo ver que la mayoría presentaban una menor expresión que las de TNBC, se realizó un experimento preliminar de WB utilizando las líneas MCF-7, BT474 y HCC1954, y se pudo observar la ausencia de la proteína LNK, lo que coincidiría con los resultados publicados en la base HPA, ya que si bien expresan LNK en bajas cantidades la sensibilidad de la técnica ni siquiera permitió visualizar la proteína en las líneas de TNBC con menor expresión. Sin embargo, se vuelve a presentar una contradicción con lo publicado por Jianxin Lv y colaboradores, en donde se puede observar que la línea BT474 tiene una expresión proteica de LNK superior a todas las líneas de TNBC [42]., contrario a lo descrito en la base HPA y lo obtenido en este WB preliminar.

Continuando con la búsqueda de LNK en las líneas de TNBC, se cuantificó el mRNA de LNK por medio de qPCR en todas las líneas y se comparó con cantidad presente en la línea celular no tumorigénica (MCF10A). En este ensayo fue posible determinar que todas las líneas producían mRNA de LNK en diferentes cantidades, y estos datos obtenidos presentaban la misma tendencia que los obtenidos por medio de WB así como lo descrito en la base HPA [43]. Se pudo observar que únicamente las líneas HCC1806, HCC1937 y la MDA-MB-231 presentaban una mayor cantidad de mRNA de LNK que la línea MCF10A, y para el caso de las líneas HCC70 y MDA-MB-468 se podía ver una cantidad menor a la del control no tumorigénico. Los datos obtenidos para las líneas HCC70, MDA-MB-468 y MDA-MB-231 coinciden con lo reportado en la base de datos GOBO y lo publicado por Jianxin Lv y colaboradores [42, 44].

Otro de los aspectos a destacar fue que tanto en los datos presentados en la base HPA, como los resultados obtenidos por medio de WB y qPCR, la línea MDA-MB-231 presenta la mayor expresión de LNK. Al realizar una investigación más a fondo sobre las características de las líneas de TNBC utilizadas, se pudo encontrar que la línea MDA-MB-231 pertenece a la subclasificación de cáncer de mama “tipo basal B” y las líneas HCC1806, HCC1937, HCC70 y MDA-MB-468 pertenecen a la subclasificación de cáncer de mama “tipo basal A” [59]. Los datos obtenidos experimentalmente en la cuantificación del mRNA de LNK en células de TNBC coinciden con lo presentado en la **Figura 11-B**, en la que se observa que el grupo de líneas celulares de cáncer de mama “tipo basal B” tienen una mayor expresión del LNK que el “tipo basal A”.

Posteriormente se quiso conocer el estado basal de fosforilación de las proteínas STAT3 y JAK2. La abundante fosforilación de la proteína JAK2 presente en las líneas MDA-MB-468 y HCC70 y la escasa fosforilación de JAK2 en la línea MDA-MB-231, puede ser explicada por baja y alta expresión de LNK, respectivamente, ya que LNK es el regulador principal de la activación de JAK2. Contrario a lo esperado, la fosforilación de JAK2 en las líneas HCC1806 y HCC1937 parece no tener relación con la presencia de LNK, por lo que nos podría indicar una disminución de su función en estas líneas. La fosforilación disminuida de STAT3 en la línea MDA-MB-231 asociada a la escasa fosforilación de JAK2 y la aumentada fosforilación de STAT3 relacionada con la abundante fosforilación de la proteína JAK2 en la línea HCC70 parece indicarnos que el funcionamiento del circuito de autorregulación es correcto en estas líneas, pero también se observa que en la línea MDA-MB-231 aun con la presencia más abundante de LNK no termina por inhibir toda la activación de la vía JAK2/STAT3. En lo observado para la fosforilación de STAT3 en las líneas HCC1806, HCC1937 y MDA-MB-468, parece no tener relación con la abundancia de LNK, ni con la activación de JAK2, lo que podría indicarnos una posible disminución de la función de la proteína LNK ya que no se observa su actividad inhibitoria esperada.

Tomando en cuenta que la proteína LNK se encuentra abundantemente en las células de TNBC, pero que en líneas HCC70 y MDA-MB-468 no existe una abundancia mayor que el control no tumorigénico y la falta de relación entre su abundancia y el aumento o disminución de la supervivencia en los pacientes, se puede sugerir que la sola expresión de LNK no explica su funcionamiento aberrante, por ello se planteó la búsqueda de algún otro fenómeno que pudiera estar involucrado en la disminución de su función. Diversos estudios han propuesto que la expresión disminuida o aumentada de una proteína puede no ser el factor determinante en la falta de su función, y que una amplia gama de condiciones médicas y enfermedades se encuentran relacionadas únicamente con la localización aberrante de múltiples proteínas. Se ha planteado que el contexto espacio temporal fisiológico juega un papel importante en la función normal de las células y que la localización subcelular de las proteínas es crucial para su funcionamiento adecuado [60, 61].

La deslocalización de diversas proteínas se ha relacionado con la ganancia o pérdida de función, fenómeno que se ha asociado al desarrollo de múltiples enfermedades incluyendo al cáncer de mama [61, 62]. Tomando en cuenta la importancia de la localización de las proteínas para su correcto funcionamiento, la posible presencia de un SNP en la secuencia que codifica al dominio PH que puede modificar su afinidad por la membrana citoplasmática y la necesidad que tiene LNK de encontrarse en la membrana citoplasmática para interactuar con sus blancos moleculares para ejercer su función inhibitoria, se dio lugar al planteamiento de la hipótesis de este trabajo. Por tal motivo es que, se quiso determinar si la proteína LNK, sea abundante o no, se encontraba en la localización adecuada para su correcto funcionamiento, por lo que se procedió a realizar la microscopía de fluorescencia y confocal. En los resultados de microscopía de fluorescencia se pudo observar que la proteína LNK se ubicaba tentativamente en el núcleo en las líneas celulares HCC1806, HCC1937 y HCC70, y que en las MDA-MB-468 y MDA-MB-231 se podía observar una posible distribución de LNK posiblemente citoplasmática y nuclear, resultado que necesitaba ser corroborado por medio de microscopía confocal. En las imágenes tridimensionales obtenidas con el microscopio confocal se pudo determinar su localización exacta de la marca de LNK, con ello se comprobó que LNK se encontraba principalmente en el núcleo en las células HCC1937 y HCC1806 y que en las células HCC70, MDA-MB-468 y MDA-MB-231 se podría encontrar en citoplasma y una pequeña cantidad dentro del núcleo.

En estudios realizados sobre la razón por la que LNK pierde la función regulatoria sobre la vía de JAK2/STAT3 en neoplasias mieloproliferativas y en otros trastornos hematológicos, han arrojado datos sobre la existencia de mutaciones en el gen de LNK, que generan una proteína deficiente que no posee la capacidad de dirigirse hacia la membrana, ni de interactuar con sus blancos moleculares, por lo que la pérdida del circuito de autorregulación de la vía JAK2/STAT3 da lugar a la progresión de estas neoplasias [33, 34, 63]. Al no presentarse el patrón de distribución membranar esperado y encontrar que la proteína LNK se encontraba deslocalizada, podría explicarse la falta de función inhibitoria sobre la vía JAK2/STAT3, así como indicamos que la deslocalización de esta proteína podría jugar un papel importante en el progreso del TNBC.

Existen pocos reportes donde la proteína LNK se encuentre en el núcleo. En la base HPA existen imágenes de inmunofluorescencias para detectar LNK en donde se ha logrado encontrar

esta proteína en el nucleoplasma de las líneas celulares U-2 OS (de sarcoma de tibia) y U-251 MG (de glioblastoma), y en espermatoцитos justo antes de comenzar la meiosis [43]. También en estudios sobre el rol que juega LNK en el cáncer de ovario, se ha visto que algunas proteínas nucleares pueden interactuar con LNK y se ha encontrado una pequeña cantidad de LNK localizada dentro del núcleo. Lo que sugiere que LNK puede tener alguna función biológica en el núcleo que no ha sido caracterizada a la fecha [36].

Al ver estos datos y los resultados de la inmunofluorescencia en las células de TNBC, se procedió a investigar sobre la posible presencia de pequeñas secuencias de a.a. denominadas NLS y señales de exportación nuclear (NES, por sus siglas en inglés) dentro de la secuencia completa de a.a. de la proteína LNK, las cuales son secuencias conservadas que le confieren a las proteínas la capacidad de entrar y salir del núcleo de la célula. En los estudios mencionados anteriormente sobre la secuencia de a.a. de las proteínas de la familia SH2B, se determinó que SH2B1 presentaba una NLS en entre los a.a. 146 al 152 y también se determinó que SH2B1 presenta una NES, además de que ambos péptidos señal son completamente funcionales. En este mismo estudio, se pudo determinar que la entrada y salida de SH2B1 al núcleo juega un papel importante sobre la modulación de la expresión génica en la diferenciación neuronal. En este mismo estudio se realizó el alineamiento de las secuencias de a.a. de las 3 proteínas integrantes de la familia SH2B, y se pudo observar que la proteína SH2B2 compartía similitud en la presencia de secuencias con alta similitud a las NLS y NES de la proteína SH2B1. Sin embargo, para el caso de la proteína LNK (SH2B3) no se encontraron secuencias consenso que le permitan funcionar como péptido señal para la entrada o salida al núcleo [50].

La localización errónea de proteínas puede deberse principalmente a la alteración en el nivel de expresión de la proteína, mutaciones en los péptido señal, alteraciones de las modificaciones postraduccionales o a la desregulación de la maquinaria de tráfico de proteínas [60]. En caso particular de LNK, se reporta diversos estudios realizados en varios tipos de cáncer hematológico, que una de las principales causas de la pérdida de función de la proteína LNK es la presencia de mutaciones que modifican directamente la secuencia de a.a. que la conforma dando lugar a una proteína que incapaz de dirigirse a la localización adecuada e interactuar con



sus blancos moleculares por el cambio de la secuencia de a.a. en sus dominios funcionales y en sus péptidos señal, o por la producción de una proteína trunca [33, 34, 63].

Posteriormente se realizó el análisis *in silico* de la presencia de posibles NLS en la proteína LNK con el uso de la plataforma denominada NLStradamus, que predice que parte de la secuencia de a.a de las proteínas presentan una mayor probabilidad de funcionar como NLS [52, 64], en este análisis se pudo observar que en la secuencia de a.a. de LNK no existe la presencia de péptidos señal con alta probabilidad de funcionar como NLS. Sin embargo, se pudo observar que la secuencia comprendida entre los a.a. 95 al 118 es la que tiene una mayor probabilidad de actuar como una NLS comparado con el resto de la proteína. Además, se pudo observar que las mutaciones reportadas en el artículo de S. Gery y H. P. Koeffler [29] y en la plataforma cBioPortal [49] se encontraban cerca de esta zona de la secuencia de aminoácidos que tiene mayor probabilidad de funcionar como una NLS. Al hacer la conjunción de toda esta información, sumado a que las NLS generalmente son secuencias pequeñas que contienen residuos de a.a. básicos [65] y que el cambio de un único aminoácido no básico por uno básico puede dar lugar a la aparición de una NLS, surgió el interés por conocer si estas mutaciones o mutaciones similares en las líneas de TNBC pueden aumentar la probabilidad de la entrada de LNK al núcleo. Al realizar la comparación de las secuencias luego de incluir las mutaciones reportadas para cáncer de mama, se observó que la mutación que provocaba el cambio p.Glu122Lys aumentaba significativamente la probabilidad de que se presentara una NLS funcional, esto se puede relacionar con que esta modificación provoca el cambio de un a.a. cargado negativamente por una lisina, que es un aminoácido básico en un sitio de mayor probabilidad de encontrar una NLS. Para determinar si existían mutaciones similares de LNK en las líneas de TNBC se realizó la secuenciación de los nucleótidos que dan lugar a la secuencia de a.a comprendida entre los residuos 65 al 173, ya que como se mencionó con anterioridad, era la parte de la secuencia que parecía indicarnos una mayor probabilidad de encontrar cambios que dieran lugar a la aparición de una posible NLS. Con el análisis de la secuenciación, se determinó que la secuencia de todas las líneas de TNBC evaluadas se encuentran inalterada. Sin embargo, esto debe de corroborarse con el uso de la secuenciación completa del gen de LNK, para poder descartar la presencia de mutaciones que ocasionen la aparición de NLS clásicas que le permitan a LNK entrar al núcleo.

## 11. Conclusiones

- Se encontró que la proteína LNK se expresa en el tejido mamario sano en mayor medida que en la mayoría de los tejidos de los sistemas reproductivos masculino y femenino.
- Se pudo determinar que las variaciones en la expresión de LNK entre el tejido sano y el tumoral no tienen una asociación con la supervivencia de los pacientes que presentan cáncer de mama.
- Se corroboró que todas las líneas de TNBC evaluadas expresan LNK, presentándose la mayor cantidad en las líneas celulares MDA-MB-231, HCC1806 y HCC1937. Sin lograr establecer alguna asociación entre la producción de LNK con la etapa del cáncer de la cual fueron obtenidas las líneas evaluadas.
- Se corroboró que existe una menor cantidad LNK presente en las líneas de TNBC basal A (HCC1806, HCC1937, HCC70 y MDA-MB-468), comparada con la línea de tipo basal B (MDA-MB-231). Sumado a esto, se puede sugerir que LNK no presenta una función normal en estas líneas ya que no se observó una inhibición de la vía JAK2/STAT3 proporcional a la cantidad presente de LNK.
- Contrario a lo esperado, LNK no se encuentra localizada cerca de la membrana citoplasmática, en cambio presentó una distribución citoplásmica, y en menor medida nuclear, en las líneas HCC70, MDA-MB- 231 y MDA-MB- 468, mientras que la proteína se localizó dentro del núcleo preferencialmente en las células HCC1937 y HCC1806. La deslocalización de la proteína LNK dentro de las líneas celulares de TNBC podría sugerir una asociación con la disminución de la función normal de LNK.
- No fue posible detectar mutaciones en la parte del gen de LNK analizada, en las líneas de TNBC evaluadas, que dieran lugar a una modificación de la secuencia de a.a. y a la aparición de posibles NLS funcionales.

## 12. Perspectivas

- Corroborar la presencia de la proteína LNK en diferentes espacios subcelulares en las líneas celulares de TNBC, utilizando fraccionamiento subcelular previo al WB.
- Determinar la presencia de LNK en líneas celulares de cáncer de mama que no son triple negativo y compararlo con lo obtenido para las líneas de TNBC.
- Realizar el WB con un anticuerpo que reconozca el amino terminal de la proteína LNK, con el fin de descartar la presencia de otras variantes de la proteína LNK.
- Realizar la secuenciación completa del gen de LNK, con el fin de determinar si existen mutaciones y si estas pueden ser causantes de cambios en la secuencia de a.a. que den lugar a la aparición de potenciales péptidos señal de entrada al núcleo en las líneas celulares de TNBC.
- Estudiar en las líneas de TNBC el efecto de LNK en la activación de la vía JAK2/STAT3 con un modelo inducible.

## 13. Referencias

- 1.- Cáncer de mama. *Organización mundial de la salud*. Consultado en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer> (02/11/2022 a las 10:23 pm)
- 2.- Smolarz B.; Nowak A. Z.; Romanowicz H. (2022). Breast Cancer-Epidemiology, Classification, Pathogenesis and Treatment (Review of Literature). *Cancers*, 14(10), 2569. <https://doi.org/10.3390/cancers14102569>.
- 3.- Cancer today. *World Health Organization*. 2020. Consultado en: <https://gco.iarc.fr/today/> (07/06/2021 a las 12:20 pm.)
- 4.- Peila R.; Arthur R. S.; Dannenberg A. J.; & Rohan T. E. (2022). Association of a Healthy Lifestyle Index with Risk of Breast Cancer among Women with Normal Body Mass Index in the UK Biobank. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 31(3), 554–560. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-21-0765>.
- 5.- Organización mundial de la salud; GLOBOCAN. Estimated number of incident cases and deaths World, females, all ages. Consultado en: [https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2020&mode=cancer&mode\\_population=countries&population=900&populations=900&key=total&sex=2&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=0&ages\\_group%5B%5D=17&nb\\_items=10&group\\_cancer=1&include\\_nmssc=1&include\\_nmssc\\_other=1&type\\_multiple=%257B%2522inc%2522%253Atrue%252C%2522mort%2522%253Atrue%252C%2522prev%2522%253Afalse%257D&orientation=horizontal&type\\_sort=0&type\\_nb\\_items=%257B%2522top%2522%253Atrue%252C%2522bottom%2522%253Afalse%257D](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2020&mode=cancer&mode_population=countries&population=900&populations=900&key=total&sex=2&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&group_cancer=1&include_nmssc=1&include_nmssc_other=1&type_multiple=%257B%2522inc%2522%253Atrue%252C%2522mort%2522%253Atrue%252C%2522prev%2522%253Afalse%257D&orientation=horizontal&type_sort=0&type_nb_items=%257B%2522top%2522%253Atrue%252C%2522bottom%2522%253Afalse%257D) (14/11/22 a las 15:06).
- 6.- What Is Breast Cancer? *Centre for Disease Control and Prevention*. Consultado en: [https://www.cdc.gov/cancer/breast/basic\\_info/what-is-breast-cancer.htm](https://www.cdc.gov/cancer/breast/basic_info/what-is-breast-cancer.htm) (14/11/22 a las 15:06).
- 7.- ¿Qué es el cáncer de seno? *American Cancer Society*. Consultado en: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/acerca/que-es-el-cancer-de-seno.html> (14/11/22 a las 15:06).
- 8.- Golse N.; Adam, R. (2017). Liver Metastases From Breast Cancer: What Role for Surgery? Indications and Results. *Clinical breast cancer*, 17(4), 256–265. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2016.12.012>.
- 9.- Malhotra G. K.; Zhao X.; Band H.; Band, V. (2010). Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer biology & therapy*, 10(10), 955–960. <https://doi.org/10.4161/cbt.10.10.13879>.
- 10.- Yersal O.; Barutca S. (2014). Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *World journal of clinical oncology*, 5(3), 412–424. <https://doi.org/10.5306/wjco.v5.i3.412>.
- 11.- Parker J. S.; Mullins M.; Cheang M. C.; Leung S.; Voduc D.; Vickery T.; Davies S.; Fauron C.; He X.; Hu Z.; Quackenbush J. F.; Stijleman I. J.; Palazzo J.; Marron J. S.; Nobel A. B.; Mardis E.; Nielsen T. O.; Ellis M. J.; Perou C. M.; Bernard P. S. (2009). Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27(8), 1160–1167. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.18.1370>.
- 12.- Yin L.; Duan J. J.; Bian X. W.; Yu, S. C. (2020). Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast cancer research: BCR*, 22(1), 61. <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01296-5>.
- 13.- Treatment of Triple-negative Breast Cancer. *American Cancer Society*. Consultado en: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/treatment/treatment-of-triple-negative.html> (10/06/2021 a las 7:53 pm.)

- 14.- Dass S. A.; Tan K. L.; Selva Rajan R.; Mokhtar N. F.; Mohd Adzmi E. R.; Wan Abdul Rahman W. F.; Tengku Din T. A. D. A.; Balakrishnan V. (2021). Triple Negative Breast Cancer: A Review of Present and Future Diagnostic Modalities. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 57(1), 62. <https://doi.org/10.3390/medicina57010062>.
- 15.- Lehmann B. D.; Bauer J. A.; Chen X.; Sanders M. E.; Chakravarthy A. B.; Shyr Y.; Pietenpol J. A. (2011). Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *The Journal of clinical investigation*, 121(7), 2750–2767. <https://doi.org/10.1172/JCI45014>.
- 16.- Burstein M. D.; Tsimelzon A.; Poage G. M.; Covington K. R.; Contreras A.; Fuqua S. A.; Savage M. I.; Osborne C. K.; Hilsenbeck S. G.; Chang J. C.; Mills G. B.; Lau C. C.; Brown, P. H. (2015). Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 21(7), 1688–1698. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0432>.
- 17.- Liu Y. R.; Jiang Y. Z.; Xu X. E.; Yu K. D.; Jin X.; Hu X.; Zuo W. J.; Hao S.; Wu J.; Liu G. Y.; Di G. H.; Li D. Q.; He X. H.; Hu W. G.; Shao Z. M. (2016). Comprehensive transcriptome analysis identifies novel molecular subtypes and subtype-specific RNAs of triple-negative breast cancer. *Breast cancer research: BCR*, 18(1), 33. <https://doi.org/10.1186/s13058-016-0690-8>.
- 18.- Shao F.; Pang X.; Baeg G. H. (2021). Targeting the JAK/STAT Signaling Pathway for Breast Cancer. *Current medicinal chemistry*, 28(25), 5137–5151. <https://doi.org/10.2174/0929867328666201207202012>.
- 19.- Qin J. J.; Yan L.; Zhang, J.; Zhang W. D. (2019). STAT3 as a potential therapeutic target in triple negative breast cancer: a systematic review. *Journal of experimental & clinical cancer research: CR*, 38(1), 195. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1206-z>.
- 20.- Bousoik E.; Montazeri Aliabadi, H. (2018). "Do We Know Jack" About JAK? A Closer Look at JAK/STAT Signaling Pathway. *Frontiers in oncology*, 8, 287. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00287>.
- 21.- Harrison D. A. (2012). The Jak/STAT pathway. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(3), a011205. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011205>.
- 22.- Rafael F. D.; David A. F. (2000). La vía JAK-STAT de señalización intracelular y su repercusión en oncogénesis, inmunomodulación y desarrollo. *Medicina Clínica (Barc)*, 114 (6), 227-234. [https://doi.org/10.1016/S0025-7753\(00\)71252-8](https://doi.org/10.1016/S0025-7753(00)71252-8).
- 23.- Dodington D. W.; Desai H. R.; Woo M. (2018). JAK/STAT - Emerging Players in Metabolism. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 29(1), 55–65. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.11.001>.
- 24.- Mengie Ayele T.; Tilahun Muche Z.; Behaile Teklemariam A.; Bogale Kassie A.; Chekol Abebe E. (2022). Role of JAK2/STAT3 Signaling Pathway in the Tumorigenesis, Chemotherapy Resistance, and Treatment of Solid Tumors: A Systemic Review. *Journal of inflammation research*, 15, 1349–1364. <https://doi.org/10.2147/JIR.S353489>.
- 25.- Furth P. A. (2014). STAT signaling in different breast cancer sub-types. *Molecular and cellular endocrinology*, 382(1), 612–615. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.03.023>.
- 26.- Tabassum S.; Abbasi R.; Ahmad N.; Farooqi A. A. (2019). Targeting of JAK-STAT Signaling in Breast Cancer: Therapeutic Strategies to Overcome Drug Resistance. *Advances in experimental medicine and biology*, 1152, 271–281. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-20301-6\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-030-20301-6_14).
- 27.- Byun H. J.; Darvin P.; Kang D. Y.; Sp N.; Joung Y. H.; Park J. H.; Kim S. J.; Yang Y. M. (2017). Silibinin downregulates MMP2 expression via Jak2/STAT3 pathway and inhibits the migration and invasive potential in MDA-MB-231 cells. *Oncology reports*, 37(6), 3270–3278. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5588>.

- 28.- Yang Y.; Zhou H.; Liu W.; Wu J.; Yue X.; Wang J.; Quan L.; Liu H.; Guo L.; Wang Z.; Lian X.; Zhang Q. (2018). Ganoderic acid A exerts antitumor activity against MDA-MB-231 human breast cancer cells by inhibiting the Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway. *Oncology letters*, 16(5), 6515–6521. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9475>.
- 29.- Gery S.; Koeffler H. P. (2013). Role of the adaptor protein LNK in normal and malignant hematopoiesis. *Oncogene*, 32(26), 3111–3118. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.435>.
- 30.- Devallière J.; Charreau B. (2011). The adaptor Lnk (SH2B3): an emerging regulator in vascular cells and a link between immune and inflammatory signaling. *Biochemical pharmacology*, 82(10), 1391–1402. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.06.023>.
- 31.- Lemmon M. A. (2010). Chapter 136 - Pleckstrin Homology (PH) Domains. *Handbook of Cell Signaling* (2a edición). pp: 1093-1101.
- 32.- Morris R.; Butler L.; Perkins A.; Kershaw N. J.; Babon J. J. (2021). The Role of LNK (SH2B3) in the Regulation of JAK-STAT Signalling in Haematopoiesis. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 15(1), 24. <https://doi.org/10.3390/ph15010024>.
- 33.- Maslah N.; Cassinat B.; Verger E.; Kiladjian J. J.; Velazquez L. (2017). The role of LNK/SH2B3 genetic alterations in myeloproliferative neoplasms and other hematological disorders. *Leukemia*, 31(8), 1661–1670. <https://doi.org/10.1038/leu.2017.139>.
- 34.- Oh S. T.; Simonds E. F.; Jones C.; Hale M. B.; Goltsev Y.; Gibbs K. D.; Jr Merker J. D.; Zehnder J. L.; Nolan G. P.; Gotlib J. (2010). Novel mutations in the inhibitory adaptor protein LNK drive JAK-STAT signaling in patients with myeloproliferative neoplasms. *Blood*, 116(6), 988–992. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-02-270108>.
- 35.- Pan J.; Peng R.; Cheng N.; Chen F.; Gao, B. (2020). LNK protein: Low expression in human colorectal carcinoma and relationship with tumor invasion. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 121, 109467. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109467>.
- 36.- Ding L. W.; Sun Q. Y.; Lin D. C.; Chien W.; Hattori N.; Dong X. M.; Gery S.; Garg M.; Doan N. B.; Said J. W.; Xiao J. F.; Yang H.; Liu L. Z.; Meng X.; Huang R. Y.; Tang K.; Koeffler, H. P. (2015). LNK (SH2B3): paradoxical effects in ovarian cancer. *Oncogene*, 34(11), 1463–1474. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.34>.
- 37.- Hung R. J.; Ulrich C. M.; Goode E. L.; Brhane Y.; Muir K.; Chan A. T.; Marchand L. L.; Schildkraut J.; Witte J. S.; Eeles R.; Boffetta P.; Spitz M. R.; Poirier J. G.; Rider D. N.; Fridley B. L.; Chen Z.; Haiman C.; Schumacher F.; Easton D. F.; Landi M. T., et al. GAME-ON Network (2015). Cross Cancer Genomic Investigation of Inflammation Pathway for Five Common Cancers: Lung, Ovary, Prostate, Breast, and Colorectal Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 107(11), djv246. <https://doi.org/10.1093/jnci/djv246>.
- 38.- Cheng T. H.; Thompson D.; Painter J.; O'Mara T.; Gorman M.; Martin L.; Palles C.; Jones A.; Buchanan D. D.; Win A. K.; Hopper J.; Jenkins M.; Lindor N. M.; Newcomb P. A.; Gallinger S.; Conti D.; Schumacher F.; Casey G.; Giles G. G.; Pharoah P.; Tomlinson I.; et al. (2015). Meta-analysis of genome-wide association studies identifies common susceptibility polymorphisms for colorectal and endometrial cancer near SH2B3 and TSHZ1. *Scientific reports*, 5, 17369. <https://doi.org/10.1038/srep17369>.
- 39.- Pande M.; Joon A.; Brewster A. M.; Chen W. V.; Hopper J. L.; Eng C.; Shete S.; Casey G.; Schumacher F.; Lin Y.; Harrison T. A.; White E.; Ahsan H.; Andrulis I. L.; Whittemore A. S.; John E. M.; Ko Win A.; Makalic E.; Schmidt D. F.; Kapuscinski M. K.; Lynch P. M.; et al. (2018). Genetic susceptibility markers for a breast-colorectal cancer phenotype: Exploratory results from genome-wide association studies. *PLoS one*, 13(4), e0196245. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196245>.

- 40.- Kuo C. L.; Joaquim M.; Kuchel G. A.; Ferrucci L.; Harries L. W.; Pilling L. C.; Melzer D. (2020). The Longevity-Associated SH2B3 (LNK) Genetic Variant: Selected Aging Phenotypes in 379,758 Subjects. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 75(9), 1656–1662. <https://doi.org/10.1093/gerona/glz191>.
- 41.- Palomero L.; Galván-Femenía I.; de Cid R.; Espín R.; Barnes D. R.; Cimba Blommaert E.; Gil-Gil M.; Falo C.; Stradella A.; Ouchi D.; Roso-Llorach A.; Violan C.; Peña-Chilet M.; Dopazo J.; Extremera A. I.; García-Valero M.; Herranz C.; Mateo F.; Mereu E.; Pujana M. A.; et al. (2020). Immune Cell Associations with Cancer Risk. *iScience*, 23(7), 101296. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101296>.
- 42.- Lv J.; Yu W.; Zhang Y.; Cao X.; Han L.; Hu H.; Wang C. (2020). LNK promotes the growth and metastasis of triple negative breast cancer via activating JAK/STAT3 and ERK1/2 pathway. *Cancer cell international*, 20, 124. <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01197-9>.
- 43.- Human Protein Atlas consultado en: <http://www.proteinatlas.org> (07/03/2021 a las 11:21 pm.)
- 44.- Gene expression-based Outcome for Breast cancer Online (GOBO). Consultado en: <http://co.bmc.lu.se/gobo/> (11/06/21 a las 2:37 pm.)
- 45.-Pereira B.; Chin S. F.; Rueda O. M.; Vollan H. K.; Provenzano E.; Bardwell H. A.; Pugh M.; Jones L.; Russell R.; Sammut S. J.; Tsui D. W.; Liu B.; Dawson S. J.; Abraham J.; Northen H.; Peden J. F.; Mukherjee A.; Turashvili G.; Green A. R.; McKinney S.; Caldas C.; et al. (2016). The somatic mutation profiles of 2,433 breast cancers refines their genomic and transcriptomic landscapes. *Nature communications*, 7, 11479. <https://doi.org/10.1038/ncomms11479>.
- 46.- Rueda O. M.; Sammut S. J.; Seoane J. A.; Chin S. F.; Caswell-Jin J. L.; Callari M.; Batra R.; Pereira B.; Bruna A.; Ali H. R.; Provenzano E.; Liu B.; Parisien M.; Gillett C.; McKinney S.; Green A. R.; Murphy L.; Purushotham A.; Ellis I. O.; Pharoah P. D.; Curtis C.; et al. (2019). Dynamics of breast-cancer relapse reveal late-recurring ER-positive genomic subgroups. *Nature*, 567(7748), 399–404. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1007-8>.
- 47.- Curtis C.; Shah S. P.; Chin S. F.; Turashvili G.; Rueda O. M.; Dunning M. J.; Speed D.; Lynch A. G.; Samarajiwa S.; Yuan Y.; Gräf S.; Ha G.; Haffari G.; Bashashati A.; Russell R.; McKinney S.; METABRIC Group; Langerød A.; Green A.; Provenzano E.; Aparicio S.; et al. (2012). The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature*, 486(7403), 346–352. <https://doi.org/10.1038/nature10983>.
- 48.- Ciriello G.; Gatza M. L.; Beck A. H.; Wilkerson M. D.; Rhie S. K.; Pastore A.; Zhang H.; McLellan M.; Yau C.; Kandoth C.; Bowlby R.; Shen H.; Hayat S.; Fieldhouse R.; Lester S. C.; Tse G. M.; Factor R. E.; Collins L. C.; Allison K. H.; Chen Y. Y.; Perou C. M.; et al. (2015). Comprehensive Molecular Portraits of Invasive Lobular Breast Cancer. *Cell*, 163(2), 506–519. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.033>.
- 49.-The cBioPortal for Cancer Genomics. Consultado en: <https://www.cbioportal.org/> (15/12/2022 a las 5:35 am.)
- 50.- Maures T. J.; Chen L.; Carter-Su C. (2009). Nucleocytoplasmic shuttling of the adapter protein SH2B1beta (SH2-Bbeta) is required for nerve growth factor (NGF)-dependent neurite outgrowth and enhancement of expression of a subset of NGF-responsive genes. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 23(7), 1077–1091. <https://doi.org/10.1210/me.2009-0011>.
- 51.- ExPasy. The bioinformatics resource portal of the SIB Swiss Institute of Bioinformatics. Translate tool. Consultado en: <https://web.expasy.org/translate/> (26/12/2022 a las 9:00 pm.)
- 52.- NLStradamus - Moses Lab. <http://www.moseslab.csb.utoronto.ca/NLStradamus/> (26/12/2022 a las 9:30 pm.)
- 53.- Doheny D.; Sirkisoon S.; Carpenter R. L.; Aguayo N. R.; Regua A. T.; Anguelov M.; Manore S. G.; Arrigo A.; Jalboush S. A.; Wong G. L.; Yu Y.; Wagner C. J.; Chan M.; Ruiz J.; Thomas A.; Strowd R.; Lin J.; Lo H. W. (2020). Combined inhibition of JAK 2-

STAT3 and SMO-GLI1/tGLI1 pathways suppresses breast cancer stem cells, tumor growth, and metastasis. *Oncogene*, 39(42), 6589–6605. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-01454-1>.

54.- Kim M. S.; Lee W. S.; Jeong J.; Kim S. J.; Jin W. (2015). Induction of metastatic potential by TrkB via activation of IL6/JAK2/STAT3 and PI3K/AKT signaling in breast cancer. *Oncotarget*, 6(37), 40158–40171. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5522>.

55.- Schwertfeger K. L.; Rosen J. M.; Cohen D. A. (2006). Mammary gland macrophages: pleiotropic functions in mammary development. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 11(3-4), 229–238. <https://doi.org/10.1007/s10911-006-9028-y>.

56.-Velazquez L. (2012). The Lnk adaptor protein: a key regulator of normal and pathological hematopoiesis. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, 60(6), 415–429. <https://doi.org/10.1007/s00005-012-0194-x>.

57.- Elenbaas B.; Spirio L.; Koerner F.; Fleming M. D.; Zimonjic D. B.; Donaher J. L.; Popescu N. C.; Hahn W. C.; Weinberg R. A. (2001). Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells. *Genes & development*, 15(1), 50–65. <https://doi.org/10.1101/gad.828901>.

58.- Burguin A.; Furrer D.; Ouellette G.; Jacob S.; Diorio C.; Durocher F. (2020). Trastuzumab effects depend on HER2 phosphorylation in HER2-negative breast cancer cell lines. *PLoS one*, 15(6), e0234991. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234991>.

59.- Dai X.; Cheng H.; Bai Z.; Li J. (2017). Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping. *Journal of Cancer*, 8(16), 3131–3141. <https://doi.org/10.7150/jca.18457>.

60.- Hung M. C.; Link W. (2011). Protein localization in disease and therapy. *Journal of cell science*, 124(Pt 20), 3381–3392. <https://doi.org/10.1242/jcs.089110>.

61.- Scott M. S.; Calafell S. J.; Thomas D. Y.; Hallett M. T. (2005). Refining protein subcellular localization. *PLoS computational biology*, 1(6), e66. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0010066>.

62.- Wang X.; Li S. (2014). Protein mislocalization: mechanisms, functions and clinical applications in cancer. *Biochimica et biophysica acta*, 1846(1), 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2014.03.006>.

63.- Oh S. T. (2011). When the Brakes are Lost: LNK Dysfunction in Mice, Men, and Myeloproliferative Neoplasms. *Therapeutic advances in hematology*, 2(1), 11–19. <https://doi.org/10.1177/2040620710393391>.

64.- Nguyen Ba A. N.; Pogoutse A.; Provart N.; Moses A. M. (2009). NLStradamus: a simple Hidden Markov Model for nuclear localization signal prediction. *BMC bioinformatics*, 10, 202. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-202>.

65.- Lu J.; Wu T.; Zhang B.; Liu S.; Song W.; Qiao J.; Ruan H. (2021). Types of nuclear localization signals and mechanisms of protein import into the nucleus. *Cell communication and signaling:CCS*, 19(1), 60. <https://doi.org/10.1186/s12964-021-00741-y>.