



DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

POSGRADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

*“Efecto combinado del bloqueo del Receptor de Estrógenos y de la inhibición del Receptor
HER-2 sobre la vía Wnt/ β -catenina, en células de carcinoma mamario humano T47D”*

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA:

BIOL. EXP. TZITZIYANIK MADRIGAL DOMÍNGUEZ

DIRECTORA

Dra. Claudia Haydée González de la Rosa

ASESORES

Dr. Pablo G. Damián Matzumura

Dr. Ronell Bologna Molina

México D.F., Noviembre de 2013

Esta tesis se realizó en el laboratorio de Ciencias Naturales e Ingeniería de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa, bajo la dirección de la **Dra. Claudia Haydée González de la Rosa** y con la asesoría del **Dr. Pablo G. Damián Matsumura** y del **Dr. Ronell Bologna Molina**.

La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa está evaluada como Posgrado de Alto Nivel en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad del CONACyT (C/PFPN-2002-35-32).

La alumna Tzitzijanik Madrigal Domínguez fue apoyada con la beca otorgada por parte de CONACyT con el No. de registro 265936.

Parte de este trabajo fue realizado en el Laboratorio Divisional de Biología Molecular de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

COMITÉ TUTORAL

DIRECTORA

Dra. Claudia Haydée González de la Rosa
Departamento de Ciencias Naturales,
DCNI, Unidad Cuajimalpa, UAM.
cgonzalez@correo.cua.uam.mx

ASESORES

Dr. Pablo G. Damián Matsumura
Departamento de Biología de la Reproducción,
DCBS, Unidad Iztapalapa, UAM
pgdm@xanum.uam.mx

Dr. Ronell Bologna Molina,
Jefe del Departamento de Investigación
Facultad de Odontología
Universidad Juárez del Estado de Durango (UJED)
ronellbologna@hotmail.com

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: *“Efecto combinado del bloqueo del Receptor de Estrógenos y de la inhibición del Receptor HER-2 sobre la vía Wnt/ β -catenina, en células de carcinoma mamario humano T47D”*. El examen se realizó el día 8 de noviembre de 2013.

JURADO DE EXAMEN



PRESIDENTE

Dr. Pablo G. Damián Matzumura

Departamento de Biología de la Reproducción, DCBS, Unidad Iztapalapa, UAM
pgdm@xanum.uam.mx

JOSÉ DE LA LUZ DÍAZ CHÁVEZ

SECRETARIO

Dr. José De La Luz Díaz Chávez

Instituto Nacional de Cancerología, Investigador en Ciencias Médicas
josediaz030178@hotmail.com



VOCAL

M. en BE. Leticia González Núñez

Departamento de Biología de la Reproducción, DCBS, Unidad Iztapalapa, UAM
gnleti@yahoo.es



VOCAL

Dra. Elizabeth Hernández Pérez

Departamento de Ciencias de la Salud, DCBS, Unidad Iztapalapa, UAM
sila@xanum.uam.mx

AGRADECIMIENTOS

Con amor, respeto y admiración a la Universidad Autónoma Metropolitana, que es como mi segundo hogar, quién me ha visto crecer integralmente y alcanzar mis metas.

Con todo cariño para todas aquellas personas que han creído en mi a pesar de las dificultades y los contratiempos.

A los amigos, familia, compañeros y profesores que amablemente me ofrecieron sus consejos, reactivos y apoyo.

ÍNDICE.

1. RESUMEN:	1
2. ABSTRACT:	3
3. INTRODUCCIÓN.....	5
3.1 CÁNCER	5
3.2 EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA (CaM)	5
3.3 ETIOLOGÍA DEL CaM.....	6
3.4 TRATAMIENTOS CONTRA EL CaM.....	7
3.4.1 HORMONOTERAPIA	7
3.4.2 TERAPIAS BIOLÓGICAS	8
3.5 MECANISMOS DE ACCIÓN DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS Y DE HER-2 EN LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS NORMALES Y CANCEROSAS	9
3.6 PAPEL DE LA VÍA WNT/ β -CATENINA EN CaM	11
4. ANTECEDENTES	14
5. JUSTIFICACIÓN.....	17
6. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	17
7. HIPÓTESIS	18
8. OBJETIVO GENERAL	18
8.1 OBJETIVOS PARTICULARES	18
9. MATERIAL Y MÉTODOS.....	19
9.1 LÍNEAS CELULARES DE CaM.....	19
9.2 CULTIVO CELULAR.....	19
9.3 FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS.....	20
9.4 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS ARNm QUE CODIFICAN PARA HER-2 Y NTSR1.....	21

9.5 ANÁLISIS DEL ARN POR ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA	22
9.6 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES HER-2 Y NTSR1 POR RT-PCR.....	23
9.7 PURIFICACIÓN DE LOS AMPLIFICADOS DE PCR DE NTSR1 Y HER-2 PARA SU SECUENCIACIÓN.....	26
9.8 EFECTO DE ICI Y TRASTUZUMAB EN LA VIABILIDAD CELULAR DE T47D POR MÉTODO DE AZUL TRIPANO	26
9.9 ANÁLISIS DE LA LOCALIZACIÓN CELULAR DE HER2 y β -CATENINA POR INMUNOFLUORESCENCIA .	27
9. 10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	28
10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
10.1 EXPERIMENTOS PRELIMINARES	29
10.1.1 EXPRESIÓN SEMICUANTITATIVA DE NTSR1 y HER2	29
10.1.2 ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DE LOS AMPLICONES DE NTSR1 y HER2	31
10.1.3 EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE HER-2 POR INMUNOFLUORESCENCIA EN MCF7 Y T47D.....	33
10.2 EFECTO DE LOS FÁRMACOS CONTRA EL CaM EN LA VIABILIDAD DE CÉLULAS T47D.....	35
10.2.1 EFECTO DEL ANTAGONISTA DE RE (ICI)	35
10.2.2 EFECTO DEL INHIBIDOR DE HER-2 (TRASTUZUMAB)	37
10.2.3 EFECTO DE LA COMBINACIÓN DE ICI CON TRASTUZUMAB.....	39
10.3 EFECTO DE LOS FÁRMACOS CONTRA EL CaM SOBRE LA LOCALIZACIÓN DE β -CATENINA Y HER-2 EN CÉLULAS T47D	42
10.3.1 EFECTO DEL ANTAGONISTA DEL RE (ICI)	42
10.3.2 EFECTO DEL INHIBIDOR DE HER-2 (TRASTUZUMAB)	46
10.2.3 EFECTO COMBINADO DE ICI 182,780 CON TRASTUZUMAB	50
10.4 EFECTO DE LA COMBINACIÓN DE ICI Y TRASTUZUMAB SOBRE LA EXPRESIÓN DEL ARNm DE NTSR1	53
11. CONCLUSIONES:	55
12. PERSPECTIVAS	57
13. REFERENCIAS	58

ABREVIATURAS:

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario

Akt/PKB: Cínasa de proteínas en serina/treonina; también llamada proteína cínasa B

ANOVA: Análisis de Varianza, por el acrónimo “ANalysis Of VAriance”.

APC: Adenoma Poliposo de Colon

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm Ácido ribonucleico mensajero

ATCC: Centro de recursos biológicos “American Type Culture Collection”

BSA: Albúmina de suero bovino

CaM: Cáncer de mama

CK1: Cínasa-1 de caseína

CO₂: Dióxido de carbono

DAPI: 4',6-Diamidino-2-Fenilindol

DMEM: Medio de Eagle modificado por Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

dNTPS: Desoxirribonucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dATP)

DOR:	Densidad óptica relativa
E₂:	Estradiol
EDTA:	Ácido etilén diamino tetra acético
EGF:	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR:	Receptor del Factor de crecimiento Epidérmico
ERE:	Elemento de respuesta a estrógenos
EtOH:	Etanol
FITC:	Fluoresceína-5-isotiocianato
FZ:	Frizzled (rizar), Receptor del ligando Wnt.
GSK3β:	Cinasa 3 β de la Glucógeno sintasa ; también GSK3B
H₂O:	Agua
H₂O-DEPC:	Agua con dietilpirocarbonato (Inhibidor de ribonucleasas)
HER-2:	Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano, tipo 2
INEGI:	Instituto Nacional de Estadística y Geografía de México
LEF:	Factor amplificador de linfocitos (Lymphocyte enhancer factor)
LRP:	Proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas
MAPK:	Cinasas de proteínas activadas por mitógenos

MgCl₂:	Cloruro de Magnesio
MuLV:	Transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Maloney
NaHCO₃:	Bicarbonato Sódico
NCBI:	Centro Nacional de Información Biotecnológica de EUA
NCI:	Instituto Nacional de Cáncer de EUA (National Institute Cancer)
NTSR1:	Receptor de neurotensina tipo 1
PBS:	Solución amortiguadora de fosfatos
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PI3K:	Fosfoinositol-3 cinasa
RE:	Receptor de estrógenos
REα:	Receptor de estrógenos, tipo alfa
RE β:	Receptor de estrógenos, tipo beta.
ARNasa:	Enzima que degrada ARN
RP:	Receptor de progesterona
RTK:	Receptor con actividad de cinasa de tirosinas
RT-PCR:	Transcripción reversa, seguida de la reacción en cadena de la polimerasa
SBF:	Suero de feto bovino

- SD:** Desviación estándar (Standard Deviation)
- TBE:** Solución para electroforesis (Tris Base, ácido bórico y EDTA)
- TCF:** Factor de transcripción (Factor de complejo ternario)
- TE:** Solución amortiguadora de Tris-EDTA Buffer
- Tm:** Temperatura de fusión (melting temperature)
- Wnt:** Wingless (sin alas)

1. RESUMEN:

El Cáncer de Mama (CaM) es la primera causa de muerte oncológica de mujeres mayores de 20 años en México. El tratamiento de esta enfermedad se basa en la evaluación previa del estadio de evolución del padecimiento y búsqueda de los receptores de Estrógenos (RE), de Progesterona (RP) y del Factor de Crecimiento Epidérmico Humano, tipo 2 (HER-2), lo cual sirve de apoyo actualmente, para decidir cuales tratamientos pueden ser más eficaces, incluyendo cirugía, radioterapia, quimioterapia, hormonoterapia, terapias biológicas o combinaciones de ellas.

Los tratamientos más específicos contra el CaM son las terapias hormonales y las terapias biológicas, incluyendo al ICI 182 780 (ICI; Faslodex[®]/Fulvestran), antagonista del RE, y Trastuzumab (Herceptin[®]), anticuerpo monoclonal inhibidor de HER-2, respectivamente. Ambos tratamientos han sido aplicados en forma combinada, observando un efecto potenciador. Los receptores HER-2 y RE convergen en una vía no genómica, la cual inicia cuando el Estradiol (E₂) interacciona con el RE y el complejo induce la activación de HER-2 por medio de la tirosina cinasa c-Src, pero hay evidencias de que también pueden actuar a través de la vía Wnt/ β -catenina, la cual se encuentra desregulada en cáncer y asociada con la pérdida de adhesión celular y aumento en la proliferación. Se ha demostrado que β -catenina puede inducir la activación transcripcional de NTSR1. La sobre-expresión de NTSR1 se ha correlacionado con el tamaño del tumor, cantidad de nódulos linfáticos con metástasis y la progresión del cáncer de mama.

Para demostrar la convergencia de ambos receptores en la vía Wnt/ β -catenina se utilizaron diferentes concentraciones de Trastuzumab (1, 10 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e ICI (1, 0.1 y 0.01 μM), en combinación con E_2 (1 pM), utilizando como modelo experimental la línea celular de carcinoma mamario humano T47D y se determinaron los efectos sobre la viabilidad celular, localización de HER-2 y β -catenina, así como la expresión de NTSR1.

Los resultados obtenidos en los experimentos de viabilidad muestran un efecto sinérgico entre ICI (0.1 μM) y Trastuzumab 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ al incubar las células T47D, durante 72 h. Las mismas concentraciones de ICI y Trastuzumab bloquearon la translocación de β -catenina al núcleo, inducida por E_2 , y son capaces de bloquear totalmente la expresión de NTSR1, inducida por E_2 , con lo que se refuerza la hipótesis que ICI y Trastuzumab actúan sobre la vía Wnt/ β -catenina. Estos resultados pueden ser de gran utilidad para el desarrollo de terapias moleculares más específicas y eficientes contra el CaM.

2. ABSTRACT:

Breast Cancer (CaM) is the leading cause of cancer death in women over 20 years in Mexico. Treatment is based on previous evaluation stage of evolution of the disease, as well as the quantification of Estrogen Receptor (ER), Progesterone Receptor (PR) and the Human Epidermal Growth Factor, type 2 receptor (HER-2), allowing that the treatments are more efficient, including surgery, radiotherapy, chemotherapy, hormone therapy or biological therapy combinations.

The most specific treatments against CaM are the hormonal and biologic therapies, which includes the ER antagonist ICI 182 780 (ICI, Faslodex[®]/Fulvestrant) and a monoclonal antibody that inhibits HER-2, Trastuzumab (Herceptin[®]). Both treatments have been applied in combination, showing a potentiating effect. The signal transduction pathway in which both canonical receptors intersect is through induction of Src, especially by Estradiol (E₂), but there is evidence that they can also act via the Wnt/ β -catenin pathway, which is deregulated in cancer and is associated with loss of cell adhesion and increased proliferation. It has been shown that β -catenin can induce transcriptional activation of NTSR-1, which increases their concentration proportionally to the degree of tumor progression.

In order to demonstrate the convergence of both receptors in the Wnt/ β -catenin pathway, were used different concentrations of Trastuzumab (1, 10 and 100 μ g/mL) and ICI (1, 0.1 and 0.01 mM), in combination with E₂ (1 pM), using as an experimental model the human breast carcinoma cell line T47D. The effects on cell viability, location of HER-2 and β -catenin and the expression of NTSR-1 were determined.

The results obtained herein these experiments showed the feasibility of synergistic effect in T47D cells when ICI (0.1 M) and trastuzumab 10 mg /mL were incubated for 72 hours. The same concentrations of Trastuzumab and ICI completely blocked the E₂-induced translocation of β -catenin into the nucleus, and this combination was able to wholly block NTSR-1 expression, also induced by E₂. Taken together, these results reinforce the hypothesis that Trastuzumab and ICI can switch on the Wnt/ β -catenin pathway and this information may be useful for the development of molecular therapies targeted and efficient against CaM.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 CÁNCER

Cáncer es un término que se usa para enfermedades en las que células anormales se dividen sin control y pueden invadir otros tejidos (NCI, 2012). Cuando una célula pierde su capacidad de regular su proliferación se convierte en neoplásica. La acumulación de células transformadas constituyen un tumor, de los cuales los malignos se distinguen porque adquieren la capacidad de desprenderse del tejido que lo originó y pueden viajar por la sangre o linfa para invadir otros tejidos y posteriormente formar nuevos tumores, a lo cual se le denomina metástasis; ésta es la causa más común de la muerte de pacientes con cáncer (Wittekind y Neid, 2005). Actualmente el cáncer representa uno de los problemas más importantes de la medicina moderna a nivel mundial, así como uno de los retos más interesantes en materia de investigación.

3.2 EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA (CaM)

El cáncer de mama (CaM) es el padecimiento más frecuentemente diagnosticado y la principal causa oncológica de muerte entre las mujeres mayores de 25 años a nivel mundial (Ferlay *et al.*, 2010). En México, se reportó que los tumores malignos fueron la tercera causa de muerte en las mujeres, con 35,303 defunciones, lo que representa el 15.4% del total de las reportadas en el año 2012. De todos los tipos de cáncer, el de mama es la primera causa de muerte oncológica en México, en mujeres mayores de 25 años (INEGI, 2013).

Cada glándula mamaria normal posee secciones llamadas lóbulos, los cuales comprenden secciones más pequeñas denominados lobulillos, estos terminan en docenas de bulbos

minúsculos que pueden producir leche. Los lobulillos y los bulbos están conectados por tubos delgados denominados conductos. Las formas más frecuentes de CaM son los que se presentan en las células epiteliales de los lóbulos (lobulillar) y de los bulbos (ductal), siendo este último el más común, con más del 70% de los casos reportados (Solej y Ferronato, 2005).

3.3 ETIOLOGÍA DEL CaM

Algunos factores asociados a la vida reproductiva de la mujer tienen un papel determinante en el origen del CaM (Kelsey *et al.*, 2009), incluyendo la menarquia temprana, la menopausia tardía, la nuliparidad, la edad avanzada al nacimiento del primer hijo, la ausencia de la lactancia y la administración de hormonas en formulaciones anticonceptivas (Li *et al.*, 2012).

En el cáncer mamario, como en otras neoplasias malignas (Berardo *et al.*, 2008), se encuentran involucrados diversos procesos como: pérdida de la adhesión, bloqueo de la apoptosis, desregulación de los mecanismos de diferenciación y de proliferación. A pesar de que los mecanismos celulares y moleculares involucrados en su inicio y progresión, no han sido completamente elucidados, existe evidencia de que las mutaciones de genes específicos incrementan la susceptibilidad para su desarrollo, entre los cuales se encuentran diversos oncogenes (como los receptores de factores de crecimiento), genes supresores de tumores o ambos (Rajkulmar *et al.*, 2010), que son activados o expresados inadecuadamente en el CaM. Por otra parte, las hormonas esteroides sexuales, particularmente los estrógenos, juegan un papel importante en el origen del CaM (Li *et al.*, 2012). Por tal motivo y debido a la dependencia hormonal del cáncer de mama, la caracterización inmunohistoquímica de los receptores de estrógeno (RE) y de progesterona (RP), así como del oncogén HER-2 (Receptor del factor de crecimiento epidérmico tipo- 2), ha sido utilizada como marcador de actividad

tumoral, de diagnóstico y predictivo de respuesta a tratamiento. Por ejemplo, HER-2 confiere resistencia a terapias citotóxicas en los tumores que lo sobre expresan (Ross *et al.*, 2003).

3.4 TRATAMIENTOS CONTRA EL CaM

Las terapias en cáncer se pueden dividir en quirúrgicas, radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal y terapia biológica, las cuales varían en su efectividad, especificidad e indicación (Wickerham y Tan, 2002). Debido a que el CaM es una enfermedad heterogénea que presenta variaciones en la apariencia morfológica, potencial metastásico, respuesta a varios tratamientos y supervivencia de las pacientes, continuamente se desarrollan nuevas terapias y nuevas combinaciones que se encuentren dirigidas a blancos específicos con el objetivo de incrementar su eficacia y disminuir los efectos secundarios. Las terapias más específicas son la Hormonoterapia y las Terapias biológicas (Bruton *et al.*, 2007).

3.4.1 HORMONOTERAPIA

Es un tratamiento económicamente accesible y menos agresivo en comparación con la quimioterapia, indicado para pacientes que han sido diagnosticadas positivas para receptores de hormonas esteroides. Existen varias modalidades para suprimir los efectos de los estrógenos, por ejemplo, los inhibidores de la aromatasa y los antagonistas de los receptores de estrógenos (Gelber *et al.*, 2003). Estos últimos bloquean selectivamente uno o ambos receptores de estrógenos, entre ellos se encuentra el ICI 182,780 (Fulvestrant o Faslodex[®], AstraZeneca) el cual es un inhibidor competitivo de los RE, uniéndose con afinidad comparable a la del estradiol. Este tipo de terapia inhibe considerablemente la proliferación de las células de CaM. No obstante su efecto específico, el tratamiento más adecuado siempre va a estar relacionado con el diagnóstico temprano del CaM (Bruton *et al.*, 2007).

3.4.2 TERAPIAS BIOLÓGICAS

Un ejemplo de terapia biológica (también llamada terapia dirigida) es el uso de anticuerpos como el trastuzumab (Herceptin[®], F. Hoffmann-La Roche Ltd), el cual es un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra el dominio extracelular del receptor HER-2, ya que aproximadamente el 30% de los cánceres de mama sobre-expresa HER-2 (Muss *et al.*, 2006). La administración de Herceptin ha demostrado tener un impacto clínico positivo en el tratamiento de CaM primario y metastático. Herceptin, en combinación con el fármaco de quimioterapia Taxol[®] (Bristol-Myers Squibb Company; paclitaxel), está aprobado para el tratamiento de primera línea del cáncer de mama metastásico-positivo a HER2 y solamente está aprobado en EUA para el tratamiento del cáncer de mama HER2 positivos en pacientes que han recibido uno o más ciclos de quimioterapia para detener la metástasis. Se ha señalado que el tratamiento estándar de un año de duración parece ser mejor frente a tratamientos más breves o más prolongados, si se tiene en cuenta la recurrencia del proceso canceroso (Slamon *et al.*, 2011).

A pesar de que se han demostrado beneficios en el tratamiento contra el CaM y otros tipos de cáncer, Herceptin tiene efectos adversos graves como daño a los músculos cardíacos, toxicidad pulmonar, así como daño hepático. Con base en la información proporcionada por el laboratorio que lo distribuye (Genentech Inc./Roche Group) se ha señalado que la Herceptin puede causar problemas cardíacos, incluidos aquellos leves como la función cardíaca reducida, y severos como la insuficiencia cardíaca congestiva, hipertensión, infarto y la muerte. El riesgo y la gravedad de estos problemas cardíacos fueron más altos en personas que recibieron

Herceptina[®] en combinación con antraciclinas, es un tipo de antibiótico que se usa como agente quimioterapéutico en diversos tipos de cáncer (Neyt *et al.*, 2006).

Por otro lado, Herceptin presenta un alto costo que hace difícil que pueda ser adquirido fácilmente (Ross *et al.*, 2003), ya que el tratamiento puede superar los \$54,000 dólares al año en EUA, por lo que se han buscado mecanismos para disminuir su costo, manteniendo o mejorando su efectividad.

3.5 MECANISMOS DE ACCIÓN DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS Y DE HER-2 EN LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS NORMALES Y CANCEROSAS.

El RE pertenece a una superfamilia de receptores nucleares, los cuales son factores de transcripción que regulan la expresión génica de manera dependiente de unión a ligando. Actualmente se han identificado dos receptores de estrógenos, el alfa (RE α) y el beta (RE β), los cuales están involucrados en la morfogénesis y desarrollo de la glándula mamaria. En la región carboxilo terminal de estos receptores se encuentra la región de unión al ligando, el cual reconoce a los estrógenos naturales, específicamente el estradiol (E₂). La unión de esta hormona con su receptor lo activa, promoviendo una serie de cambios conformacionales que incluyen dimerización para su posterior translocación al núcleo y unión a regiones específicas del promotor o a los sitios amplificadores de la transcripción (“enhancers”) de genes regulados por estrógenos, denominados elementos de respuesta a estrógenos o ERE (Klinge, 2001). En el cáncer, los genes activados por estrógenos intervienen en procesos como proliferación, angiogénesis, pérdida de unión celular, así como inhibición de apoptosis. Particularmente, el RE α se encuentra más relacionado con inducción de la proliferación celular en CaM (Helguero *et al.*, 2005).

Otro receptor importante en el inicio y progresión del CaM es HER-2, el cual es un receptor con actividad de tirosina cinasa (RTK) y pertenece a una superfamilia de 4 miembros, todos ellos tienen una región extracelular de unión al ligando (excepto HER-2), una región transmembranal y una región citoplásmica, con actividad enzimática de tirosina cinasa (Sorkin y Goh, 2009). Para que el receptor pueda ser activado se deben formar dímeros y esta dimerización induce la activación del dominio enzimático, resultando en la autofosforilación o transfosforilación de residuos de tirosina específicos en la parte citoplásmica. Estos residuos sirven como sitio de reclutamiento para un grupo de proteínas que conlleva a la activación intracelular de diferentes vías de señalización, como la del inositol trifosfato o la vía de la proteína cinasa B (PKB o AKT). La pérdida en la regulación de HER-2 en el CaM se puede presentar por diversos mecanismos incluyendo mutaciones, sobre-expresión inducida por estradiol y la producción autocrina o paracrina del factor de crecimiento epidérmico (EGF), lo cual puede estar asociado especialmente con el incremento a la resistencia a fármacos, así como una mayor proliferación celular (Ross *et al.*, 2003).

Por otro lado, se ha demostrado en líneas celulares de carcinoma mamario que las vías de transducción de señales que utilizan los receptores HER-2 y RE convergen en una vía no genómica, la cual inicia cuando el E₂ interacciona con el RE y el complejo induce la activación de HER-2 por medio de la tirosina cinasa c-Src, permitiendo así la activación río abajo de las vías de señalización PI3K y MAPK (Vallabhaneni *et al.*, 2011).

3.6 PAPEL DE LA VÍA WNT/ β -CATENINA EN CaM

Una de las vías de señalización ampliamente estudiada en el CaM es Wnt/ β -catenina, la cual se ha postulado como un importante blanco terapéutico debido a su participación en procesos de proliferación, invasión y angiogénesis (Howe y Brown, 2004)-

Se han realizado diferentes estudios que demuestran que la vía de transducción de señales Wnt/ β -catenina está fuertemente asociada con la proliferación celular de carcinoma mamario humano, así como en líneas de células no cancerosas y cultivos primarios a partir de biopsias de pacientes con cáncer (Yang *et al.*, 2011, Wieczorek *et al.*, 2008).

Las proteínas Wnt (*Wingless*; sin alas) regulan muchos procesos incluyendo la diferenciación y proliferación celular; este amplio rango de efectos biológicos muestra un alto pleiotropismo de las señales Wnt, las cuales están involucradas en diversas enfermedades incluyendo el cáncer. El receptor para proteínas Wnt pertenece a la familia de proteínas *Frizzled* (FZ), las cuales tienen siete dominios transmembranales, Figura 1. Esta interacción requiere la cooperación de LRP5 y LRP6, proteínas que actúan como correceptores transmembranales (Wehrli *et al.*, 2000).

Actualmente, se conocen tres vías que son activadas después del acoplamiento de Wnt con sus receptores. Sin embargo, la vía canónica es la relacionada con los procesos oncogénicos, la cual induce la estabilización y acumulación en el citoplasma de β -catenina y su posterior translocación al núcleo celular donde interacciona con el factor de transcripción TCF y regula la transcripción de genes blanco involucrados en pérdida de adhesión, proliferación, entre otros procesos (Wharton *et al.*, 2005).

La proteína β -catenina fue primeramente identificada formando parte de la unión adherente. Esta proteína interactúa con E-caderina y α -catenina, regulando la adhesión celular. En ausencia del ligando Wnt, la proteína β -catenina es reconocida por el complejo GSK-3 β (Glucógeno Sintasa Cinasa 3 β), CK1 (Caseína Cinasa 1), APC (Adenoma Poliposo de Colon) y Axina, que favorecen su degradación por la vía del proteosoma (Aberle *et al.*, 1997).

Tal vez el evento más importante en el contexto de los procesos moleculares de la activación de la vía de Wnt en tumores de CaM, es la estabilización de β -catenina en el citoplasma y su acumulación en el núcleo por la inhibición del complejo de degradación inducido por el ligando Wnt (Howe y Brown, 2004). Actualmente se cree que β -catenina podría servir como un marcador del grado de lesión desde un epitelio normal hasta un carcinoma invasor. Es importante enfatizar que varios autores han demostrado que la localización nuclear o citoplásmica de β -catenina no es observada en tejidos mamarios normales (Lin *et al.*, 2000).

Aunque en otros tipos de cáncer se ha demostrado que la activación aberrante de la vía Wnt/ β -catenina está relacionada con mutaciones en componentes del complejo de degradación como axina o en la misma β -catenina, en el CaM no son muy comunes (Howe y Brown, 2004). Estudios en una gran variedad de sistemas, incluyendo el CaM, prueban la asociación física entre β -catenina y miembros de la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico EGFR, incluyendo a HER-2, así como con proteínas de otras vías de transducción de señales como PI3K (Wharton *et al.*, 2005).

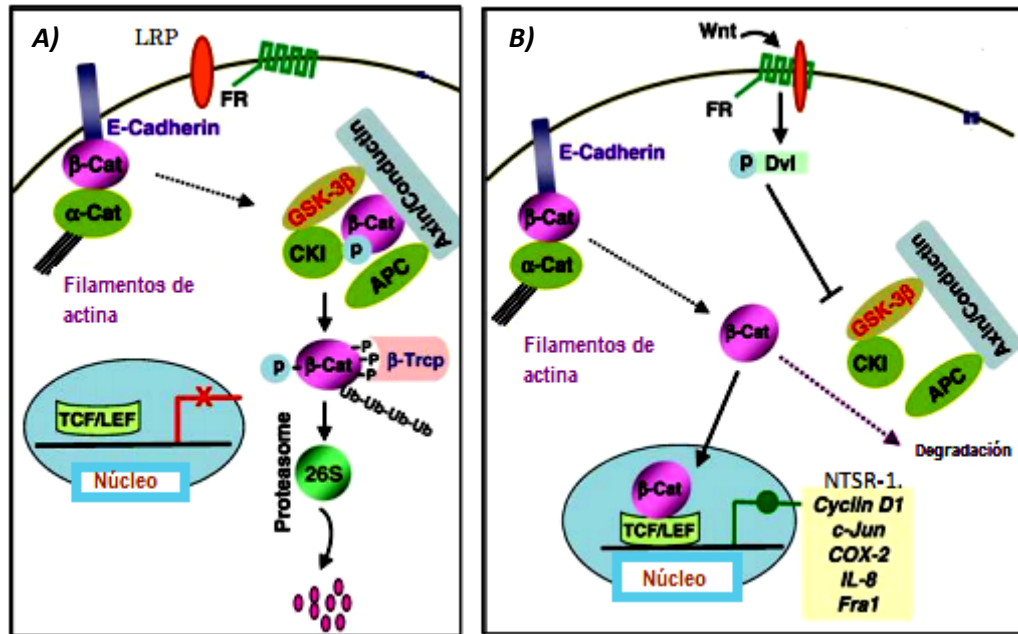


Figura 1. Activación de la vía de transducción de señales Wnt/ β -catenina. A), la ausencia del ligando Wnt, permite que β -catenina sea marcada para ser reconocida por ubiquitinas ligasas y degradada por la vía del proteosoma. B), en presencia de Wnt, éste se une a su receptor (FZ), se forma el complejo Wnt/FZ, el cual bloquea a la cinasa GSK3 β y esto permite que β -catenina se transloque al núcleo, se una a TCF/LEF y se active la transcripción de NTSR1, entre muchos otros blancos.

4. ANTECEDENTES

Aunque se ha investigado mucho sobre el papel de HER-2 y del RE α en el CaM, y con base en ello se han desarrollado diversas terapias, todavía no se tiene una terapia universal que pueda atacar a todos los tipos de CaM. Por tal razón, se han hecho innumerables esfuerzos en desarrollar terapias más específicas, así como nuevas combinaciones que sean más accesibles económicamente y sus efectos secundarios sean mínimos (Bruton *et al.*, 2007).

Se ha visto que la inhibición de HER2, en combinación con el bloqueo del RE, permite prolongar la supervivencia de pacientes con CaM HER-2 positivos, así como retrasar el tiempo de recurrencia (Torres *et al.*, 2013). Por otro lado, el uso combinado de un antagonista del RE y un inhibidor de HER2 tiene mayor efecto antiproliferativo en células de carcinoma mamario ML-20 (línea celular que sobre expresa los RE) y BT-474 (línea celular que sobre expresa HER-2), (Kunisuel *et al.*, 2000; Emde *et al.*, 2011).

Es importante señalar que hay evidencias (Fang *et al.*, 2009) de que la activación de HER-2 en el CaM está directamente relacionada con la pérdida en la regulación de la vía Wnt/ β -catenina y con el pronóstico desfavorable en las pacientes que presentan dicha enfermedad. Esto se basa en el hecho de que HER-2 puede interactuar con el extremo carboxilo terminal de β -catenina, induciendo su fosforilación en el residuo Tyr-654 y, por ende, induce la separación entre β -catenina y E-caderina.

Por otro lado, Wang y colaboradores (2006), demostraron que al bloquear HER-2 se presentaba una reducción en la expresión de los genes blanco de la vía Wnt/ β -catenina, incluyendo al gen de la ciclina D1, que es un factor clave para inducir la proliferación celular.

Esto significa que la activación de HER-2 puede inducir la translocación de β -catenina al núcleo, aún en ausencia del ligando Wnt, lo que podría contribuir al incremento en la proliferación celular y la capacidad de formar tumores debido a la sobre-expresión de HER2 en células de CaM (Fang *et al.*, 2009).

Por otro lado, la expresión y actividad de los RE está regulada por una multitud de señales intracelulares y extracelulares. Recientemente se ha observado el entrecruzamiento entre la vía de la β -catenina y la del RE α , donde se demostró, por medio de la inhibición de la expresión de β -catenina a través de un ARN de interferencia, que la expresión del ARNm del RE α disminuye notablemente en las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7, T47D y BT-474 (Gupta *et al.*, 2011; Mulholland *et al.*, 2005).

En este sentido, usando células MCF7 se demostró que el RE α y β -catenina interactúan físicamente induciendo la transcripción de genes blanco (Kouzmenko *et al.*, 2004).

Se ha señalado que el gen que codifica al receptor 1 de neurotensina (NTSR1) es un blanco de la vía Wnt/ β -catenina. NTSR1 es un péptido de 13 aminoácidos que se forma a partir de un precursor más grande, que es escindido por enzimas convertasas, y fue descrito por primera vez en el sistema nervioso. Actualmente se le ha conferido un papel muy importante en la migración y supervivencia de las células de CaM (Dupouy *et al.*, 2009).

Las células epiteliales y tejido mamario no transformado son incapaces de expresar al receptor NTSR1, el cual se sintetiza en diferentes tipos de cáncer, incluyendo el CaM humano y se ha

demostrado que su expresión aumenta proporcionalmente con el grado de malignidad, por lo que se considera como un marcador de la progresión tumoral (Dupouy *et al.*, 2011), además de que es un blanco específico de la vía Wnt/ β -catenina (Dupouy *et al.*, 2009), por ésta razón en el presente estudio, fue utilizado como un indicador de la actividad de esta vía.

Con base en los antecedentes señalados, se abre la posibilidad de que la vía Wnt/ β -catenina también pueda ser un punto clave de integración de señales activadas por el RE y HER-2, por lo que el propósito del presente trabajo es el demostrar esta relación, con lo cual se podría explicar, al menos parcialmente los efectos benéficos que se potencian al emplear antagonistas del RE e inhibidores de HER-2, lo que posibilitaría el uso de más herramientas terapéuticas en la lucha contra el CaM.

5. JUSTIFICACIÓN

El CaM es la primera causa de muerte en mujeres por cáncer en México. Las terapias más específicas son las hormonales y el tratamiento con anticuerpos monoclonales, sin embargo los tratamientos pueden ser muy costosos y causar efectos secundarios severos.

El uso de terapias combinadas de Trastuzumab (anti-HER-2) e ICI 182,780 (anti-RE), en pacientes con CaM, han presentado mejores resultados ya que aumentan su efectividad y el tiempo de sobrevida es mayor.

Como se ha mencionado, β -catenina puede ser el punto en que ambas vías, la de RE y la de HER-2, convergen. Entender esta relación permitirá el diseño de tratamientos más específicos y con menos efectos colaterales.

6. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Es posible que la vía Wnt/ β -catenina sea un punto de convergencia cuando se utilizan antagonistas del RE en combinación con inhibidores de HER-2 en células de carcinoma mamario humano?

7. HIPÓTESIS

Si las vías de señalización de HER-2 y RE se entrecruzan en la vía Wnt/ β -catenina en células de carcinoma mamario humano, entonces el uso combinado de trastuzumab (inhibidor de HER-2) e ICI 182,780 (antagonista del RE) presentará mayor efecto inhibitorio sobre esta vía que de forma independiente, al evaluar la translocación de β -catenina al núcleo, la expresión de NTSR1 o ambos.

8. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto combinado de ICI 182,780 y trastuzumab sobre la inhibición de la vía Wnt/ β -catenina en células de carcinoma mamario humano.

8.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Cuantificar la expresión de HER-2 y NTSR1 en dos líneas celulares de carcinoma mamario humano RE⁺ y HER⁺ (T47D y MCF-7).
- Analizar el efecto de la incubación, a diferentes tiempos y concentraciones, de ICI 182,780 y Trastuzumab sobre la proliferación celular, la expresión de NTSR1 y la translocación de β -catenina al núcleo.
- Determinar el tipo de interacción farmacológica al combinar ICI 182,780 y Trastuzumab sobre la inhibición de la vía Wnt/ β -catenina.

9. MATERIAL Y MÉTODOS

9.1 LÍNEAS CELULARES DE CaM

Las líneas celulares utilizadas para este proyecto fueron T47D y MCF7, ambas derivadas de carcinoma mamario humano, poseen características de células luminales del epitelio ductal de mama, además de ser tumorigénicas con débil actividad metastásica.

La línea celular T47D es positiva para RE α , RP y HER-2; fue amablemente donada por el Dr. Juan Pedro Luna Arias (Departamento de Biología Celular, CINVESTAV, Zacatenco D.F.).

Por otro lado, se sabe que la línea celular MCF7 expresa RE α , RE β y RP y fue adquirida de la compañía American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, EUA).

9.2 CULTIVO CELULAR

Las células se cultivaron en medio de Eagle, modificado por Dulbecco (DMEM; Dulbecco's Modified Eagle Medium, Life Technologies) sin rojo fenol (ya que se ha demostrado que presenta actividad de tipo estrogénica) y suplementado con: 100 μ M de aminoácidos no esenciales (Gibco BRL, Gaithersburg, EUA), 100 μ M de piruvato de sodio (Gibco), 2 mM de L-glutamina (Gibco), una solución comercial de antibióticos y antimicóticos que contiene 100 U/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomicina y 250 ng/mL de anfotericina B (Life Technologies), 7.5% de NaHCO₃ (Sigma Chemical Co. San Luis MO, EUA) y suero de bovino fetal (SBF; Life Technologies) al 2.5% (v/v). Cuando se realizaron los tratamientos, se utilizó SBF previamente tratado con Carbón/Dextrán 8,000 PM (62.5 mg/625 mg por 100 mL de SBF; Sigma) con la finalidad de eliminar los esteroides del suero. Las células se incubaron a una atmósfera húmeda de 95%:5 % aire/CO₂ a 37 °C.

Las células fueron sembradas en cajas de cultivo con una superficie de 21 cm² (caja Petri de 60 mm de diámetro, P60) para extracción de ARN, y en superficies de 2 cm² (caja con 24 pozos) para la aplicación de tratamiento con ICI 182,780 o trastuzumab. Se mantuvieron en incubación a 37 °C, con atmósfera húmeda, hasta alcanzar 80% de confluencia para los experimentos donde se extrajo el ARN. Al término de los tratamientos, las células se cosecharon adicionando una solución al 0.25% de tripsina (Gibco) y se neutralizó la tripsina con medio completo DME al 2.5% de SFB tratado con Carbón/Dextrán.

9.3 FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS

El trastuzumab (Herceptin) se obtuvo a través de una donación de Roche México. Las soluciones de trabajo se prepararon a partir de la solución stock (150 mg/mL), las cuales se encontraban en alícuotas de 0.5 mL, almacenadas a 4 °C y el diluyente fue agua destilada. El antagonista del receptor de estrógenos ICI 182,780 (ICI; Fulvestrant, Faslodex[®], Astra Zeneca, México) se diluyó a partir de la solución inicial (1 x 10⁻³ M) en etanol absoluto, se realizaron alícuotas de 50 µl y se guardaron a -20 °C. Las concentraciones finales de ICI (1, 0.1 y 0.01 µM) y Trastuzumab (1, 10 y 100 µg/mL) se prepararon en medio de cultivo el mismo día de la aplicación.

Los testigos con vehículo fueron agua inyectable o etanol absoluto para los experimentos con Trastuzumab e ICI respectivamente, procurando que el volumen no excediera 0.1 % del volumen de medio de cultivo adicionado a cada pozo.

En los experimentos donde se utilizó estradiol (PM=272.4 g/mol), la concentración fue de 1 pM (1 x 10⁻⁹ M) disuelto en etanol absoluto, o en combinación tanto con Trastuzumab, ICI o

ambos. Los tratamientos fueron aplicados 24 h después de que las células permanecieron con medio DME sin rojo fenol, con 2.5% de SFB tratado con Carbón/Dextrán.

9.4 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS ARNm QUE CODIFICAN PARA HER-2 Y NTSR1.

La extracción del ARN total se llevó a cabo con un kit comercial de la marca QIAGEN (RNeasy, QIAGEN, Valencia CA, EUA), siguiendo las instrucciones del proveedor. El número final de células utilizadas fue aproximadamente de 2.5×10^6 , crecidas en cajas P60 al 80% de confluencia, esto con la finalidad de no saturar el sistema de extracción y asegurar la calidad del ARN extraído. Los buffers empleados fueron: Buffer de lisis (RLT plus) y los Buffers de lavado (RW1 y RPE). A las cajas de cultivo P60 se adicionaron 500 μ L de buffer RLT plus, las células fueron recuperadas en microtubos de 2 mL, las cuales se homogenizaron completamente por agitación vigorosa en vórtex. Posteriormente, para permitir la eliminación completa del ADN genómico se transfirió el homogenizado a la columna “ADNg eliminator”, se centrifugó a 8,000 g por 30 s, se desechó la columna, se agregaron 500 μ L de etanol al 70% y se transfirieron 700 μ L de la mezcla a la columna “RNeasy spin” para centrifugar a 8,000 g durante 15 s. Después se adicionaron 700 μ L del buffer RW1 a la columna, se centrifugó a 8,000 g durante 15 s, y luego se adicionaron 500 μ L del buffer RPE, se centrifugó a 8,000 g durante 15 s. Posteriormente, la columna se centrifugó a 8,000 g por 2 min. Finalmente se adicionó 60 μ L de agua libre de nucleasas en el centro de la columna, para eluir la muestra centrifugando por 1 minuto a 8,000 g.

El ARN obtenido fue cuantificado con el espectrofotómetro Nanodrop (Modelo ND2000, Thermo Scientific, Palm Beach FL, EUA) a la longitud de onda de 260 nm. Las muestras de ARN se separaron en alícuotas de 20 μ L cada una y se almacenaron a -70 °C hasta su uso.

9.5 ANÁLISIS DEL ARN POR ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

Para observar la integridad del ARN obtenido, las muestras (1 μ L) se separaron con base en su peso molecular mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.2% (p/v) en solución amortiguadora de TBE 1X (Tris 89 mM, Ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM).

A cada muestra se adicionó 1 μ L de la solución de carga 10X (30% glicerol, 0.1% azul de bromofenol y 0.1% de xilencianol) y se llevó a cabo el corrimiento electroforético a 75 V por aproximadamente 40 min.

Transcurrido el tiempo de electroforesis, cuando el colorante de corrida alcanzó las 2/3 partes de la longitud total del gel, éste se incubó por 20 min sumergido en una solución de bromuro de etidio (1 μ g/mL), para posteriormente ser lavado en agua para retirar el exceso de éste. Finalmente, se capturó la imagen (Figura 2) con un fotodocumentador, colocando el gel sobre un transiluminador de luz ultravioleta Gel Logic 200 (Kodak, EUA).

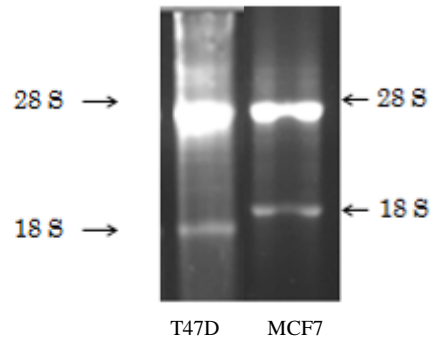


Figura 2. Gel al 1.2% donde se aprecia el corrimiento electroforético de 1 μ l de ARN por carril de las líneas celulares T47D y MCF7, purificados por columna.

9.6 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES HER-2 Y NTSR1 POR RT-PCR

Para realizar el análisis de la expresión de los genes que codifican para las proteínas HER-2 y NTSR1, así como β -actina, se utilizaron las secuencias de los cebadores descritos en la Tabla 1, los cuales fueron diseñados con ayuda de los programas PRIMER QUEST o PRIMER EXPRES con base en la secuencia reportada del gen NTSR1 del Gene Bank (NCBI, NM_002531.2), donde se tomaron en cuenta la temperatura de hibridación óptima, la relación adecuada de bases GC/TA y se evitó la formación de enlaces inter e intracatenarios entre los mismos oligonucleótidos.

Primer	Secuencia	Amplicón	T _m
NTSR1 Forward	5'AGCCGCACCAAGAAGTTCATCA 3'		
NTSR1 Reverse	5'ATGGCCATGCTGAATGTGCTGT 3'	300 pb	59°C
B-actina Forward	5'GTGGGGCGCCCCAGGCACCA 3'		
B-actina Reverse	5'CTTAATGTCACGCACGATTTC 3'	625 pb	61°C
HER-2 Forward	5'AGCCTTGCCCATCAACTG 3'		
HER-2 Reverse	5'AATGCCAACCATCAACTG 3'	113 pb	51°C

Tabla 1. Características de los cebadores utilizados. Secuencia y tamaño de los productos de PCR (amplicones) en pares de bases (pb).

La síntesis y amplificación de cADN se realizó mediante la técnica de retrotranscripción, seguida de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) mediante el kit “GeneAmp® ARN PCR” (Life Technologies). El procedimiento se describe brevemente:

En un microtubo estéril de 0.2 mL fueron colocados los siguientes componentes para reacciones con un volumen final de 20 µL: 4 µL de MgCl₂ (25 mM), 2 µL PCR buffer II (10X), 2 µL de agua tratada con DEPC, 2 µL de dGTP (10 mM), 2 µL de dATP (10 mM), 2µL de dCTP (10 mM), 2 µL de dTTP (10 mM), 1 µL de ARNse inhibitor (20 U/µL), 1µL MuLV Reverse Transcriptase (50 U/µL), 1µL de Random Hexamers 1 µl, y 1 µg de ARN obtenido de las células MCF7 o T47D.

Con la finalidad de realizar la transcripción reversa, las muestras se dejaron a temperatura ambiente por 10 min, lo cual permitió que los componentes interaccionaran entre sí, posteriormente fue incubado durante 15 min a 42 °C, que es la temperatura óptima de la enzima retro-transcriptasa (MuLV), después a 99 °C por 5 min para la desnaturalización de la enzima y finalmente 5 min a 5 °C o hasta realizar la PCR. En este paso se obtiene el ADN complementario (cADN) de los ARN.

La amplificación por PCR se realizó de la siguiente manera: se elaboró una mezcla maestra con 2 µL de MgCl₂ (25 mM), 4 µL del buffer de PCR II (10X), 1 µL de cada cebador a la concentración de 50 µM, 0.5 µL de la AmpliTaq® ADN Polimerasa (5 U/µL), los 20 µL del cADN (reacción de retrotranscripción) y agua Milli-Q® hasta el volumen final de 100 µL. Las condiciones de amplificación por PCR fueron las siguientes: 10 min a 95 °C (activación por calor de la enzima AmpliTaq), posteriormente se realizaron 35 ciclos que incluyeron la desnaturalización de las cadenas de ADN a 95 °C por 30s; luego el alineamiento cuya temperatura varió dependiendo de cada par de cebadores (Tabla 1) por 1 min y, finalmente, la extensión a 72 °C por 30 s. Al final se adicionó un ciclo dónde se calentó a 72 °C por 7 min (extensión final) y se mantuvo a 4 °C por tiempo indefinido.

Los productos de PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% con TBE 1X como buffer de corrida, a 75 V por 45 min. Al final del corrimiento electroforético, los productos de PCR se visualizaron como previamente fue descrito. Las imágenes de cada una de las bandas se analizaron por densitometría en el sistema de análisis de imágenes ImageJ (NIH). Los resultados fueron expresados en número de pixeles (densidad óptica relativa: DOR) del amplicón de interés con respecto al amplicón de normalización β-actina.

9.7 PURIFICACIÓN DE LOS AMPLIFICADOS DE PCR DE NTSR1 Y HER-2 PARA SU SECUENCIACIÓN

Fue utilizado el Kit de purificación “Rapid PCR purification” (Marligen Biosciences Inc.), para ello se agregaron 400 μ l de la solución de unión (“Binding buffer”, H1) a 20 μ L del amplificado de PCR y se mezcló vigorosamente.

La mezcla fue colocada en la columna y se centrifugó a 10,000 g por 1 min. La solución que no se unió a la columna fue desechada y posteriormente se adicionó a la columna 700 μ L de buffer de lavado (“Wash Buffer”, H2), se centrifugó 1 min a 10,000 g en dos ocasiones esto con la finalidad de eliminar residuos de Buffer H2. Finalmente, se hizo la recolección del ADN purificado utilizando un tubo cónico estéril de 1.5 mL, para lo cual se adicionaron 50 μ L de buffer TE directamente en el centro de la membrana, se dejó incubar a temperatura ambiente por 1 min y se centrifugó a 10,000 g durante 2 min.

9.8 EFECTO DE ICI Y TRASTUZUMAB EN LA VIABILIDAD CELULAR DE T47D POR MÉTODO DE AZUL TRIPANO

Se sembraron 100,000 células en cada pozo de placas de cultivo con 24 pozos, con 1 mL de medio DME sin rojo fenol, al 2.5% de SFB tratado con Carbón/Dextrán y se dejaron por 24 h antes de poner los tratamientos con ICI (1, 0.1 y 0.01 μ M) o Trastuzumab (1, 10 y 100 μ g/mL) o la combinación de ICI (0.01 μ M) y Trastuzumab (10 μ g/mL). Los tratamientos se dejaron por 72 h, con base en lo reportado por otros autores (Kunisuel *et al.*, 2000).

Al final del tiempo de incubación se recuperó el medio con los tratamientos y se colocó en un tubo cónico de 2 mL para tomar en cuenta las células que se encontraban inviables en el

medio. Posteriormente se lavaron las células con 200 μL de PBS 1X y después se agregaron 100 μl de tripsina al 0.05% a cada uno de los pozos y después de 5 min se neutralizó ésta en 300 μl de medio DME completo. Se resuspendió completamente con la pipeta y se juntó en el tubo de 2 mL que previamente contenía el medio con los tratamientos.

Se centrifugaron los tubos con los distintos tratamientos a 1,000 g por 5 min, se les retiró el medio con la bomba de vacío, teniendo cuidado de no aspirar el botón celular. Luego se resuspendió el botón celular en 500 μL de PBS. Se tomaron 50 μL de la resuspensión celular y se diluyeron en 50 μL de PBS (dilución 1:2), posteriormente se tomaron 50 μL de la dilución previa y se le agregaron 50 μL de Azul Tripano (dilución 1:2). Se tuvo cuidado de resuspender bien con la pipeta y se tomaron 10 μL que se colocaron en la cámara de conteo celular Neubauer (Hemocitómetro).

Se contaron las células azules como inviables y no azules como viables y se determinó el porcentaje de viabilidad en base a la siguiente fórmula para cada uno de los tratamientos:

% VIABILIDAD: ($\#$ células blancas/ $\#$ total de células [azules + blancas]) X100.

9.9 ANÁLISIS DE LA LOCALIZACIÓN CELULAR DE HER2 y β -CATENINA POR INMUNOFLUORESCENCIA

Las células T47D, con sus respectivos tratamientos ICI (1, 0.1 y 0.01 μM) o Trastuzumab (1, 10 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), o bien la combinación de ICI (0.01 μM) y Trastuzumab (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) se crecieron en cubreobjetos cuadrados durante 72 h, después se fijaron durante 30 min a 4 $^{\circ}\text{C}$ con Formalina Neutra. Tras la fijación, las células se permeabilizaron con Tween 20 al 1% en PBS durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las células fueron incubadas

durante 1 hora a temperatura ambiente con Albúmina de Suero Bovino (BSA, Sigma) al 1% en PBS. Después se colocaron 10 μ l de cada uno de los siguientes anticuerpos primarios: anti β -catenina, ratón anti humano, dilución 1:200 (Santa Cruz Biotechnologies) y anti-HER-2; conejo anti humano (Cell Signaling), dilución 1:100, por 1 hora a temperatura ambiente. Después de esta incubación, las células fueron lavadas con PBS. Finalmente se colocaron 15 μ L del anticuerpo secundario correspondiente (ALEXA Fluor 594, anti ratón; 1:200; así como FITC, anti conejo; 1:200). Tras estas incubaciones, las células se lavaron con PBS, se montaron en medio de montaje mezclado con DAPI y se observaron en el microscopio confocal LSM-META-Zeiss Axioplan (Carl Zeiss).

9. 10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los análisis se realizaron por triplicado en, por lo menos, 3 experimentos independientes y los resultados se presentan como el promedio y la desviación estándar (SD). La estadística empleada fue análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguida de la prueba de Tukey-Kramer para observar las diferencias entre los grupos de diferentes tratamientos y la “t” de Student no pareada para comparar la diferencia entre dos grupos. Las diferencias se consideraron significativas cuando el valor de $p < 0.05$. El análisis para determinar el tipo de interacción farmacológica entre ICI y Trastuzumab se realizó utilizando el método de Chou y Talalay (García *et al.*, 2004).

10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

10.1 EXPERIMENTOS PRELIMINARES

10.1.1 EXPRESIÓN SEMICUANTITATIVA DE NTSR1 y HER2

Con la finalidad de determinar el mejor modelo experimental para analizar el efecto combinado del antagonista del RE (ICI) y del inhibidor de HER2 (Trastuzumab), se realizaron experimentos preliminares para medir la expresión de los receptores HER2 y NTSR1, ya que si la expresión de HER2 es baja, no se podrá detectar los efectos cuando se incuben las células con Trastuzumab. Por otro lado, si la expresión de NTRSR1 no es suficiente, no será buen parámetro para analizar el efecto sobre la vía Wnt/beta catenina.

En primera instancia se analizó por la técnica de RT-PCR semicuantitativa la expresión de los ARNm que codifican para NTSR1 y HER2 en ambas líneas celulares (MCF-7 y T47D). Los resultados obtenidos muestran que la línea celular T47D expresa 1.6 y 4.8 veces mayor proporción de los ARNm que codifican para NTSR1 y HER2 respectivamente, en comparación con las células MCF7 (Figura 3).

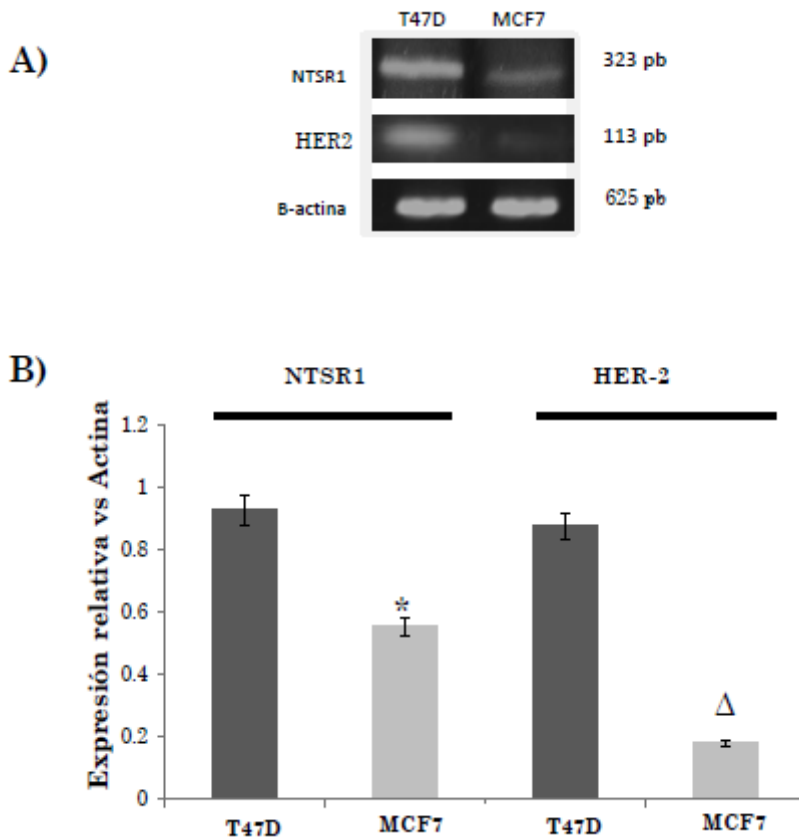


Figura 3. Expresión relativa de ARNm de NTSR1 y HER-2 en las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y T47D. Los productos de PCR (amplicones) de NTSR1, HER-2 y β -actina se obtuvieron a partir de la misma cantidad de ARN (1 μ g). Los pesos moleculares relativos (en pares de bases, pb) de cada uno de los amplicones se señalan en el extremo derecho del panel A. Los resultados normalizados se obtuvieron al dividir las DOR de cada amplicón, con respecto al amplicón constitutivo β -actina. La gráfica del panel B se realizó con los resultados promedio de al menos tres experimentos independientes, las barras presentan la media \pm la desviación estándar (DS). * $P < 0.05$ vs NTSR1 expresada en T47D, $\Delta P < 0.01$ vs HER-2 expresado en T47D.

10.1.2 ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DE LOS AMPLICONES DE NTSR1 y HER2

Los amplicones se purificaron mediante columnas de exclusión molecular como previamente fue descrito (Glenn y Glenn, 1994). Posteriormente, se secuenciaron para corroborar su autenticidad, comparando contra lo reportado en el banco de datos de los Institutos Nacionales de Salud de EUA (NIH, GeneBank), utilizando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Cabe señalar que el análisis de la secuencia del amplicón de HER-2 se realizó tanto en la línea celular MCF7 como en la T47D, mientras que la secuencia del amplicón de NTSR1 solamente se realizó en la línea celular T47D, debido a que el producto amplificado por PCR en las células MCF7 fue insuficiente para su análisis (Figura 4).

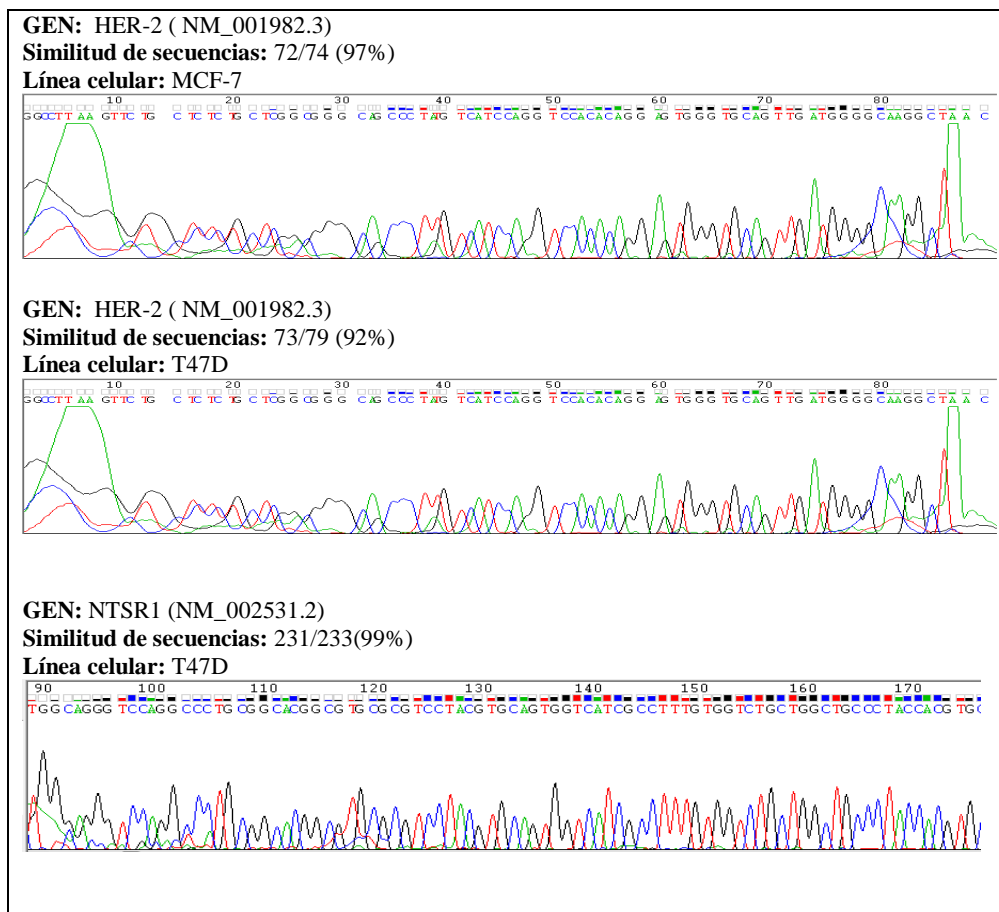


Figura 4. Electroferogramas que muestran las secuencias de nucleótidos de los amplicones de HER2 y NTSR1. El análisis se realizó mediante el software BioEdit v 70.5. El análisis del alineamiento de las secuencias de nucleótidos se realizó con respecto a la del gen reportado (entre paréntesis se indica el código de cada gen en el Gene Bank). La secuencia del amplicón de HER-2 se analizó en ambas líneas celulares, mientras que el amplicón de NTSR1 solamente fue en las células T47D.

10.1.3 EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE HER-2 POR INMUNOFLUORESCENCIA EN MCF7 Y T47D

Continuando con la determinación del mejor modelo experimental para analizar el efecto del inhibidor de HER2 (Trastuzumab), se analizó la expresión y distribución celular de HER-2 en las líneas celulares MCF7 y T47D con inmunofluorescencia y microscopía confocal, utilizando un anticuerpo primario anti HER2 y el secundario marcado con FITC (verde).

Se observó mayor expresión de HER2 en células T47D con respecto a las células MCF-7. Por otro lado, la distribución de este receptor en células MCF7 es totalmente citoplasmática, sin observarse localización en la membrana celular, en comparación con la distribución de HER-2 en la línea celular T47D, la cual se presenta predominantemente en la membrana celular (Figura 5). Esto puede significar que si bien hay expresión de la proteína HER-2 en las células MCF7. Estos resultados son congruentes con los reportes que señalan que las células MCF7 no activan la transducción de señales a través de HER-2 y, por lo tanto, se consideran HER-2 negativas (Kim *et al.*, 2012).

Por la técnica de inmunofluorescencia, en las células T47D aparentemente se detecta mayor expresión de la proteína HER2 con respecto a su ARNm, evaluado por RT-PCR. Es importante señalar que no siempre se observa correlación entre la concentración de la proteína y su ARNm, debido a que los mecanismos que regulan la traducción y la transcripción son diferentes.

Con base en los resultados obtenidos mediante las técnicas de RT-PCR e inmunofluorescencia, se decidió continuar los experimentos solamente con la línea celular de carcinoma mamario humano T47D, porque la expresión de HER-2 y NTSR1 es notablemente más alta con respecto a la línea celular MCF7 y la distribución de HER-2 se presenta en la membrana plasmática, como era de esperarse.

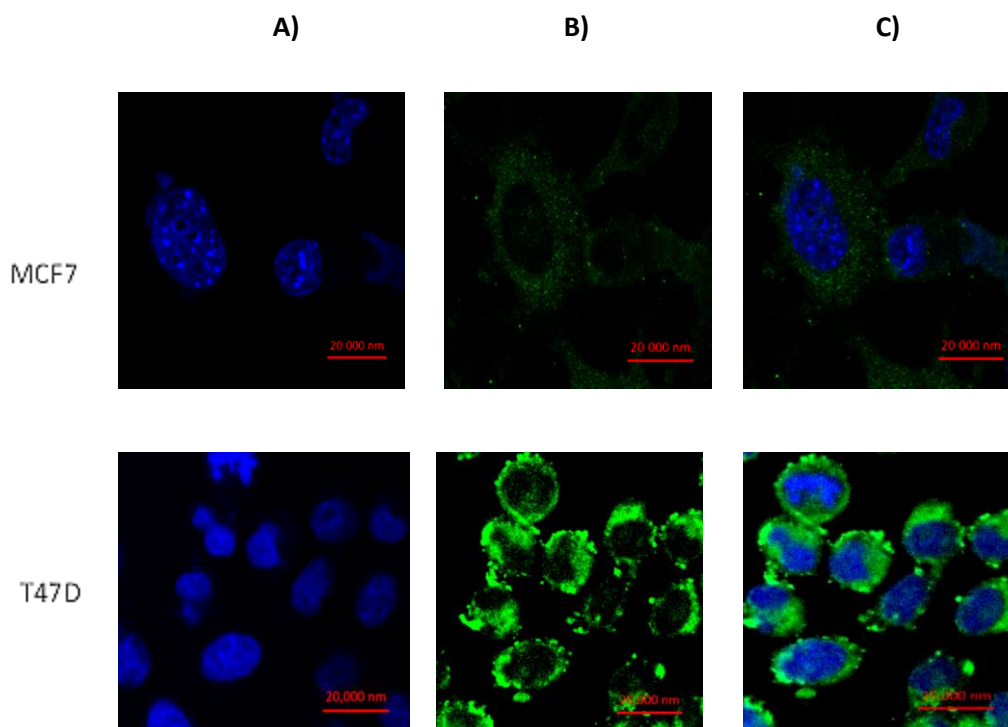


Figura 5. Microfotografías de los estudios por inmunofluorescencia que muestran la expresión y localización de HER-2 en las células MCF-7 y T47D. En la columna izquierda (inciso A) se observa la marcación de los núcleos con el colorante fluorescente 4',6-diamidino-2-fenylindol (DAPI; azul). En la columna central (inciso B) se observa la proteína HER2 en verde, ya que el anticuerpo secundario está marcado con FITC. En la columna derecha (inciso C), se observa la colocalización (“merge”) de ambos colorantes. Las células se visualizaron con el objetivo 40X y la barra roja representa 20 μ m.

10.2 EFECTO DE LOS FÁRMACOS CONTRA EL CaM EN LA VIABILIDAD DE CÉLULAS T47D

10.2.1 EFECTO DEL ANTAGONISTA DE RE (ICI)

Una vez seleccionada la línea celular T47D como el modelo experimental más apropiado, se realizaron los ensayos de viabilidad celular para determinar el efecto de diferentes concentraciones del antagonista del receptor de estrógenos (ICI) adicionado junto con 1 pM de E₂, incubados por un periodo de 72 h. Los resultados muestran que la viabilidad celular obtenida con E₂ no tiene diferencias significativas con respecto al vehículo (etanol), como ha sido previamente reportado (Kunisue *et al.*, 2000); por otro lado, cuando se adiciona ICI disminuye significativamente la viabilidad celular de manera dependiente de la dosis. Estos resultados son congruentes con lo reportado por Smolnikar y colaboradores (2000) quienes demuestran la pérdida de la viabilidad en las células MCF7 ante diferentes concentraciones de ICI y lo asocian a la inducción de la apoptosis por el bloqueo en la expresión de Bcl-2 y la activación de otras vías apoptóticas.

Como se observa en la Figura 6, el efecto de la administración de ICI disminuyó la viabilidad de las células T47D a 72.7%, 42.5% y 36.8% al utilizar concentraciones de 1.0, 0.1 y 0.01 μ M respectivamente. La concentración de 0.1 μ M de ICI fue la más cercana al 50 % de inhibición (IC₅₀), por lo que se utilizó esta dosis en los experimentos en combinación con Trastuzumab.

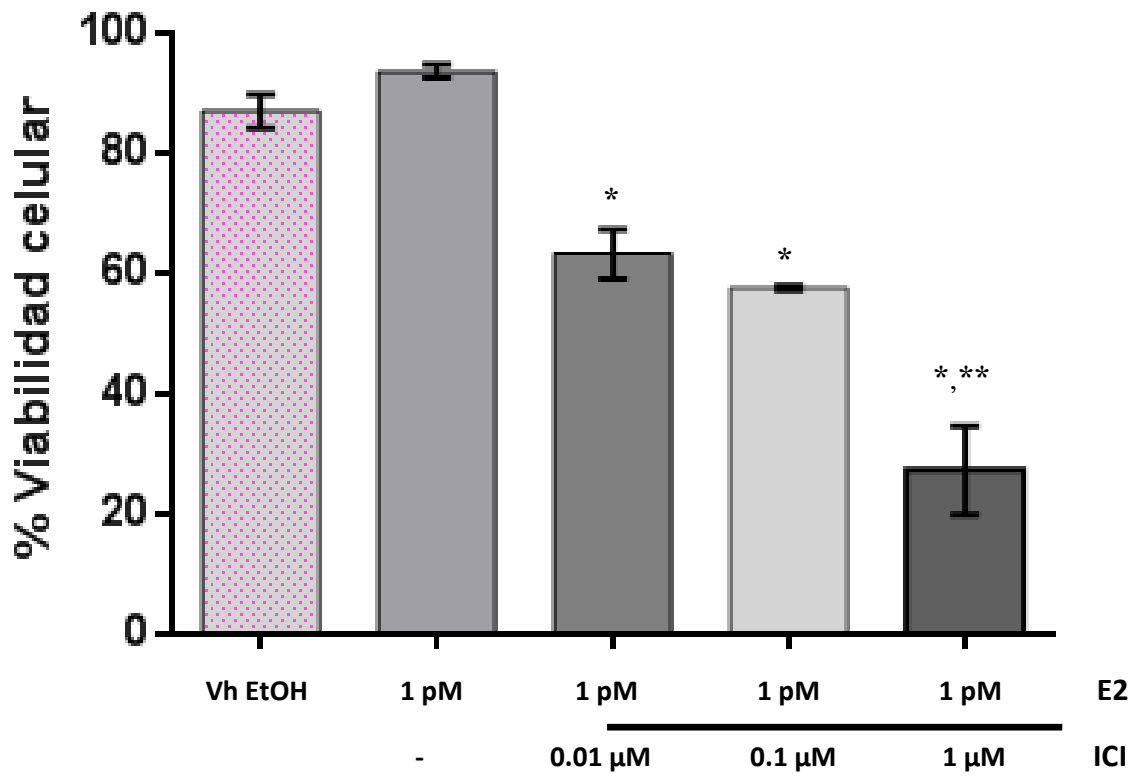


Figura 6. Efecto de la incubación con ICI sobre la viabilidad celular de T47D. Las células se crecieron en medio DME, con 2.5% de SFB/carbón dextrán por 24 h. Después fueron tratadas con E₂ (1pM) solo o en combinación con ICI, en las concentraciones de 0.01, 0.1 ó 1 μM durante 72 h. El volumen total de incubación fue de 1 mL de medio DME y menos del 0.01% de etanol, usado como vehículo (Vh). La viabilidad celular fue medida por el método de azul tripano. Las barras presentan la media ± la desviación estándar (DS) de al menos tres experimentos independientes, *p < 0.05 vs Vh, ** p<0.01 entre concentraciones.

10.2.2 EFECTO DEL INHIBIDOR DE HER-2 (TRASTUZUMAB)

Existen reportes que indican que el trastuzumab no presenta efectos significativos sobre la viabilidad de la línea celular T47D, en comparación con las células SK-BR-3 (Ceran *et al.*, 2012) y BT474 (Emde *et al.*, 2011) que sobre-expresan HER-2, pero si se observan efectos sobre la proliferación, al utilizar las concentraciones de 1, 10 y 100 µg/mL durante 72h de incubación, por lo que se utilizaron las mismas concentraciones en el presente estudio (Collins *et al.*, 2012).

De acuerdo con reportes previos (Collins *et al.*, 2012), en la Figura 7 se observa que Trastuzumab tiene poca capacidad de inhibir la viabilidad de las células T47D, ya que inclusive a la concentración más alta estudiada (100 µg/mL) el efecto es ligeramente menor a los controles, sin diferencias estadísticas ($p > 0.05$), aunque la tendencia es a disminuir la viabilidad celular.

Después de analizar los resultados de 3 experimentos independientes, realizados por triplicado, se eligió la concentración de 10 µg/mL para ser usada en los experimentos en que se combinarían fármacos, apoyándonos en reportes previos que utilizan esta misma concentración para realizar estudios de combinación de fármacos en las líneas celulares T47D, ML20 (MCF7 transfectadas para sobre-expresar el RE) y KPL-4 (no expresan RE y tienen moderada expresión de HER-2); además, esta misma concentración de trastuzumab no tiene efecto deletéreo sobre las células MDA-MB-231, que no expresan HER-2 (Kunisue *et al.*, 2000; Narayan *et al.*, 2009).

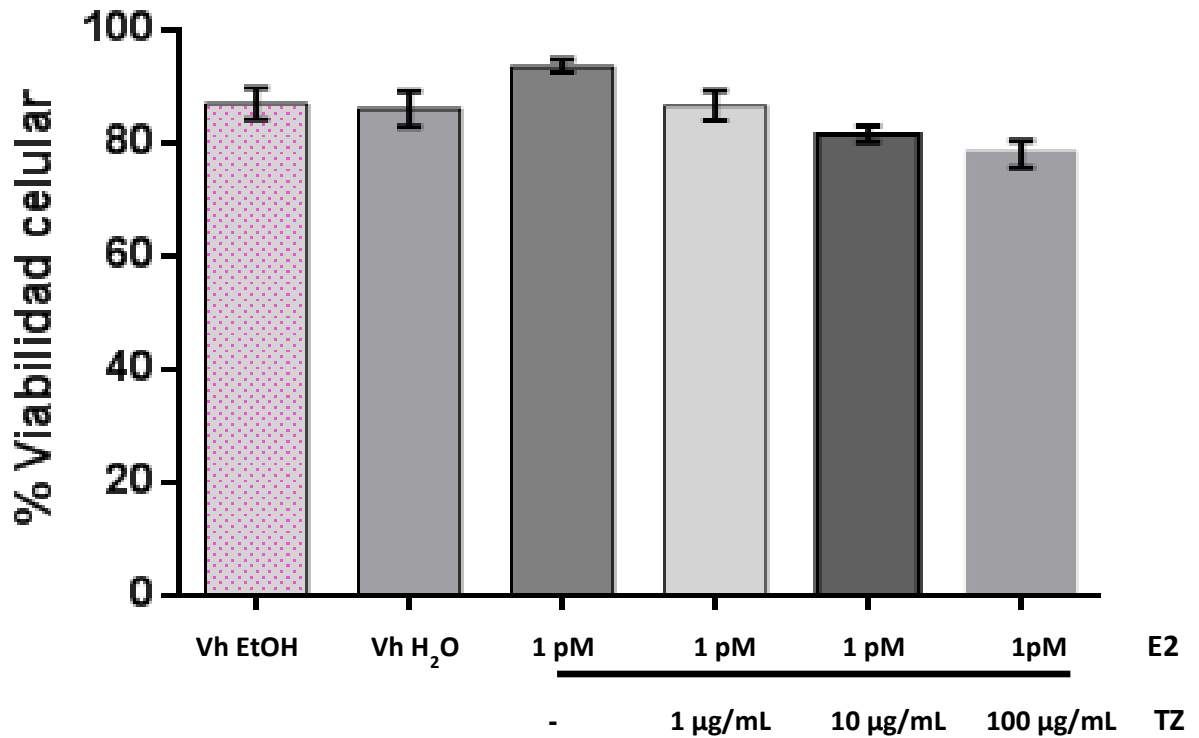


Figura 7. Efecto del Trastuzumab sobre la viabilidad celular de T47D. Las células se crecieron en medio con 2.5% de SFB/carbón dextrán y después fueron tratadas con (E₂; 1pM) y/o con Trastuzumab (1, 10 y 100 µg/mL) durante 72 h. Las células incubadas con 0.01% de etanol o H₂O estéril en medio DME fueron usadas como Vehículo (Vh). La viabilidad celular fue medida por el método de azul tripano. Las barras presentan la media ± la desviación estándar (DS) de al menos tres experimentos independientes, p>0.05.

10.2.3 EFECTO DE LA COMBINACIÓN DE ICI CON TRASTUZUMAB

Las células T47D fueron incubadas con ICI, Trastuzumab o ambas, en las concentraciones previamente establecidas (0.1 μ M y 10 μ g/mL respectivamente) durante 72 h. Los controles utilizados fueron E_2 (1 pM) y los vehículos de etanol y agua. El análisis estadístico se realizó contra sus respectivos vehículos o contra el grupo con E_2 , solamente cuando se empleó la combinación ICI con Trastuzumab.

Cuando se incubó la combinación de ambos agentes antineoplásicos se observó que se potencia el efecto inhibitorio sobre la viabilidad de las células T47D, al compararlos con el grupo con ICI solo, ya que ésta disminuyó de 52% a 42%. Cuando se realizó el análisis estadístico por el método de Chou y Talalay (García *et al.*, 2004), se comprobó que la incubación de ambos fármacos producen efectos sinérgicos en las células T47D. Este resultado es contrario a lo reportado por Kunisue y colaboradores (2000) y por Emde y colaboradores (2011), que señalan que la combinación de un antagonista del receptor de estrógenos (Fulvestrant/Faslodex/ICI=ICI 182,780) con un inhibidor de HER2 (Trastuzumab o Lapatinib) ocasionan efectos de tipo aditivo en células T47D. Esta discrepancia puede deberse a que en ninguno de los dos reportes se adicionó estradiol. La justificación por la cual en nuestros experimentos se incubó el antagonista del RE en presencia del E_2 es porque de esta manera se simula el efecto que tiene el antineoplásico ICI en una mujer que presenta concentraciones de E_2 en el rango fisiológico. Además, en experimentos realizados en nuestro laboratorio hemos observado que cuando se incuban las células MCF-7 ó T47D solamente con ICI se presentan tanto efectos agonistas como antagonistas, lo cual depende de la

concentración y del tiempo de incubación, mientras que al haber bajas concentraciones de E₂ (1 pM) el efecto que se observa es solamente de tipo antagonista (Figura 8).

Cabe señalar que el objetivo principal del presente estudio no fue el demostrar que la combinación de Trastuzumab con ICI presenta efectos farmacológicos, ya que esto ha sido reportado previamente (Kunisue *et al.*, 2000; Emde *et al.*, 2011). El objetivo fue demostrar que las vías de transducción de señales que utilizan tanto HER-2 como RE convergen en la vía Wnt/ β -catenina. Por este motivo se realizaron estudios para analizar el efecto de los antineoplásicos Trastuzumab e ICI sobre la translocación de β -catenina al núcleo y posteriormente la transactivación de NTSR1, que es uno de los blancos transcripcionales de β -catenina. Al mismo tiempo se realizó la co-inmunolocalización de β -catenina y HER-2, con la finalidad de analizar el cambio en su localización, en ausencia y presencia de los tratamientos con Trastuzumab, ICI o ambos.

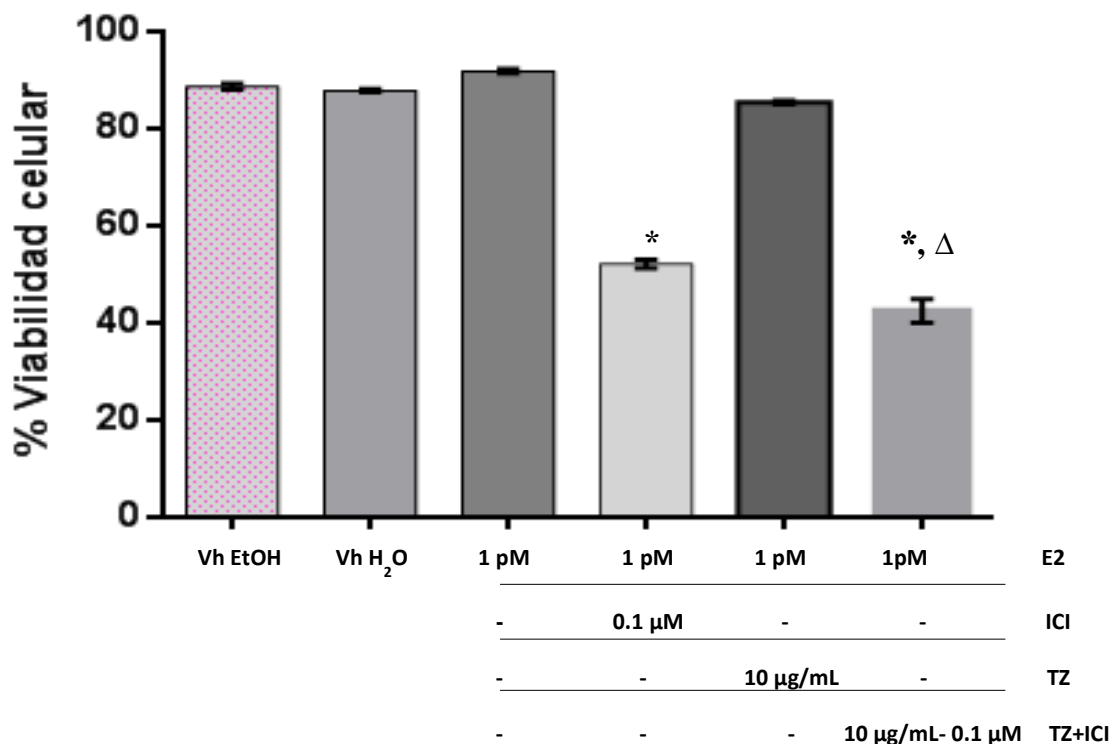


Figura 8. Efecto de la combinación de ICI y Trastuzumab sobre la viabilidad celular de T47D. Las células se crecieron en medio con suero tratado con carbón dextrán por 24 h. Después fueron tratadas con (E₂; 1 pM) o con las concentraciones ICI (0.1 μM), TZ (10 μg/mL) y la combinación de ambos durante 72 h. Las células incubadas con 0.01% de etanol o H₂O inyectable en medio DME fueron usadas como Vehículo (Vh). La viabilidad celular fue medida por el método de azul tripano. Las barras presentan la media ± la desviación estándar (DS) de al menos tres experimentos independientes, * p<0.05 vs Vh, Δ P<0.05 vs ICI.

10.3 EFECTO DE LOS FÁRMACOS CONTRA EL CaM SOBRE LA LOCALIZACIÓN DE β -CATENINA Y HER-2 EN CÉLULAS T47D

10.3.1 EFECTO DEL ANTAGONISTA DEL RE (ICI)

Con la finalidad de analizar el efecto del antagonista del RE ICI se realizó la incubación con las concentraciones de 0.1, 0.01 y 1.0 μ M (en presencia de 1 pM de E_2), durante 72 h, y se determinaron los cambios en la localización intracelular a través de la técnica de inmunofluorescencia y con ayuda del microscopio confocal. El tiempo de 72 h en el cual se realizaron los experimentos fue determinado al realizar experimentos preliminares a 24, 48 y 72 h, observándose que las diferencias más evidentes fueron a 72 h. La proteína β -catenina fue detectada por medio del anticuerpo primario (anti- β -catenina) y el secundario marcado con Alexa[®] 594 (visualizado en rojo); para la proteína HER-2 se utilizó el anticuerpo primario (anti-HER-2) y el secundario marcado con FITC (visualizado en verde); los núcleos fueron teñidos con DAPI (visualizado en azul).

En la Figura 9A se observa que, en ausencia del E_2 o del ICI, la marca roja de la β -catenina se encuentra predominantemente en la periferia celular, con mínima proporción de marca en el citoplasma de las células T47D. Cuando se realiza la co-inmunolocalización de β -catenina y HER2, al realizar el traslape de imágenes se puede observar que ambas marcas se encuentran en la periferia celular, ya que el color que predomina es el anaranjado (rojo + verde) y prácticamente no hay presencia ni de β -catenina ni HER-2 en el núcleo (azul).

Cuando se incuban las células con 1 pM de E₂, la señal de la β-catenina se ve difusa en citoplasma y se observa que hay presencia de esta proteína en el núcleo, ya que se observa coloración rosa (rojo + azul). En este grupo, la incubación con E₂ también ocasiona que HER-2 cambie su localización en la membrana plasmática y se vuelva citoplasmática y ligeramente nuclear (Figura 9B). Esto se interpreta por el hecho de que el E₂ induce la translocación de β-catenina al núcleo, así como lo ha reportado Gupta y colaboradores (2011), utilizando la técnica de Western blot y fraccionamiento subcelular (fracciones nuclear y citoplásmica).

Cuando se incuban las células T47D con E₂ (1 pM) y concentraciones crecientes de ICI se observa que la señal proveniente de la β-catenina solamente se encuentra en la periferia celular (Figura 9C, D y E). Cabe señalar que la concentración de 1 μM de ICI ocasiona serios daños a las células T47D, por lo que fue difícil obtener buenas imágenes, ya que el número de campos para ser analizados fue muy bajo. Contrario a lo observado con la β-catenina, el ICI no fue capaz de revertir el efecto del E₂ sobre el cambio en la localización de HER-2, ya que esta proteína se observa tanto membranal como perinuclear, formando halos de color verde y cuando se realiza el empalme de imágenes, se distinguen señal verde de HER-2 distante de la membrana plasmática pero afuera del núcleo (Figura 9, D).

Con estos experimentos se confirma que el E₂ induce la translocación de β-catenina al núcleo y que el efecto se realiza a través del RE, ya que al bloquearlo, se revierte el efecto del E₂.

El mecanismo propuesto por Gupta y colaboradores (2011) señala que el E₂ activa la vía |Akt/PKB, lo cual a su vez induce la fosforilación e inactivación de la glucógeno sintasa cinasa

3 β (GSK3 β), lo que ocasiona que ésta ya no induzca la fosforilación de β -catenina y por tanto se inhiba su degradación, permitiendo su translocación al núcleo.

Con la finalidad de demostrar claramente el efecto del E₂ sobre la translocación de β -catenina al núcleo, se realizaron ampliaciones en el microscopio confocal con el objetivo de 100X, con lo que se pudo distinguir que el color rosa observado en el núcleo efectivamente es el resultado de la colocalización de β -catenina y el marcador nuclear DAPI, por lo que el uso del antagonista del RE (ICI) bloquea totalmente la translocación de β -catenina al núcleo inducida por el E₂ (Figura 10).

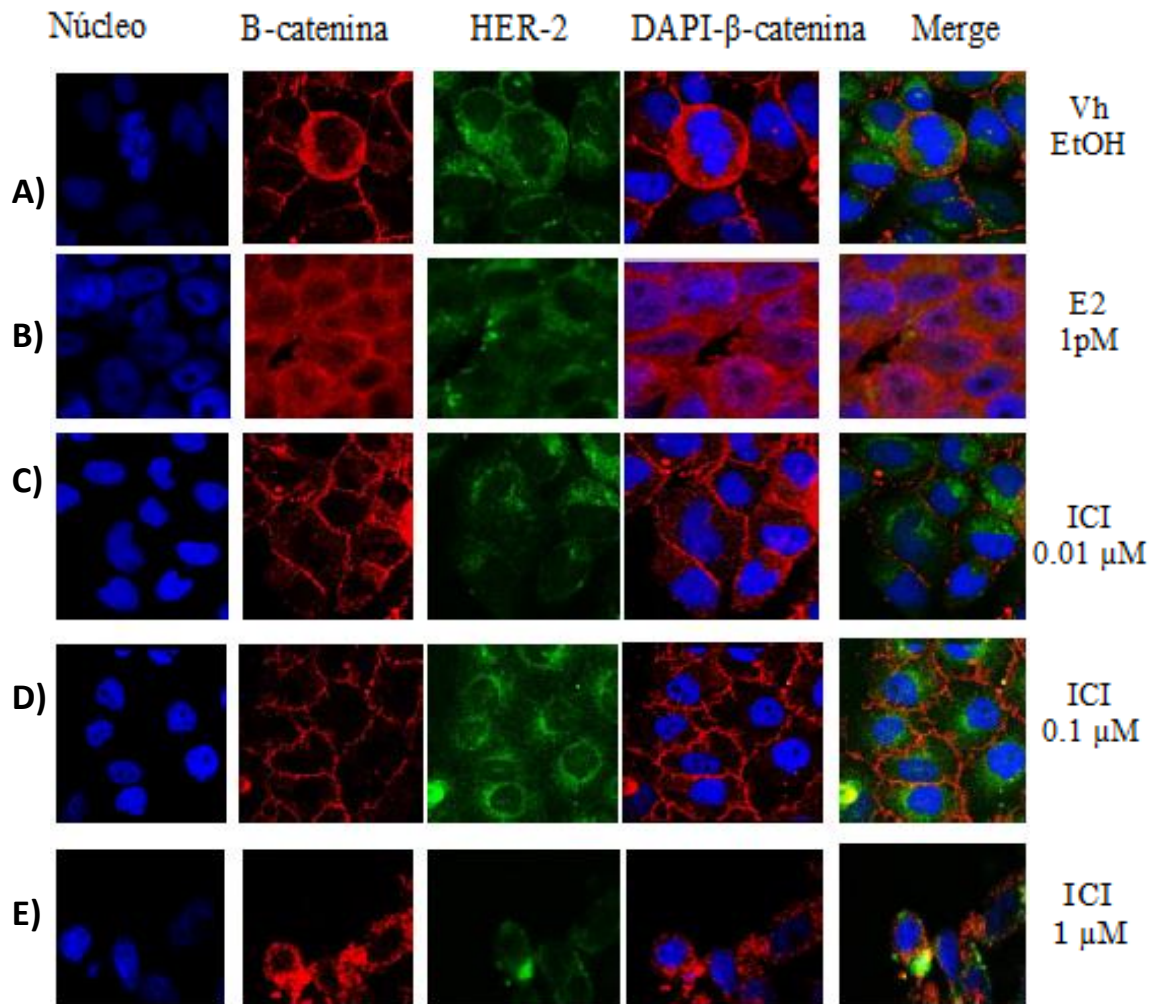


Figura 9. Análisis del efecto de ICI sobre la localización de β-catenina y HER-2 en T47D por inmunofluorescencia y microscopía confocal. Las células fueron crecidas en medio suplementado con suero tratado con carbón dextrán 24 h antes de los tratamientos. Después fueron aplicados los tratamientos: (E₂; 1 pM) solo o en combinación con ICI en las concentraciones de 0.01, 0.1 y 1 μM, durante 72 h. Los anticuerpos secundarios empleados fueron ALEXA Fluor[®] 594 (rojo) para β-catenina, así como FITC (verde) para HER-2 y los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Las imágenes se visualizaron con el objetivo 40X.

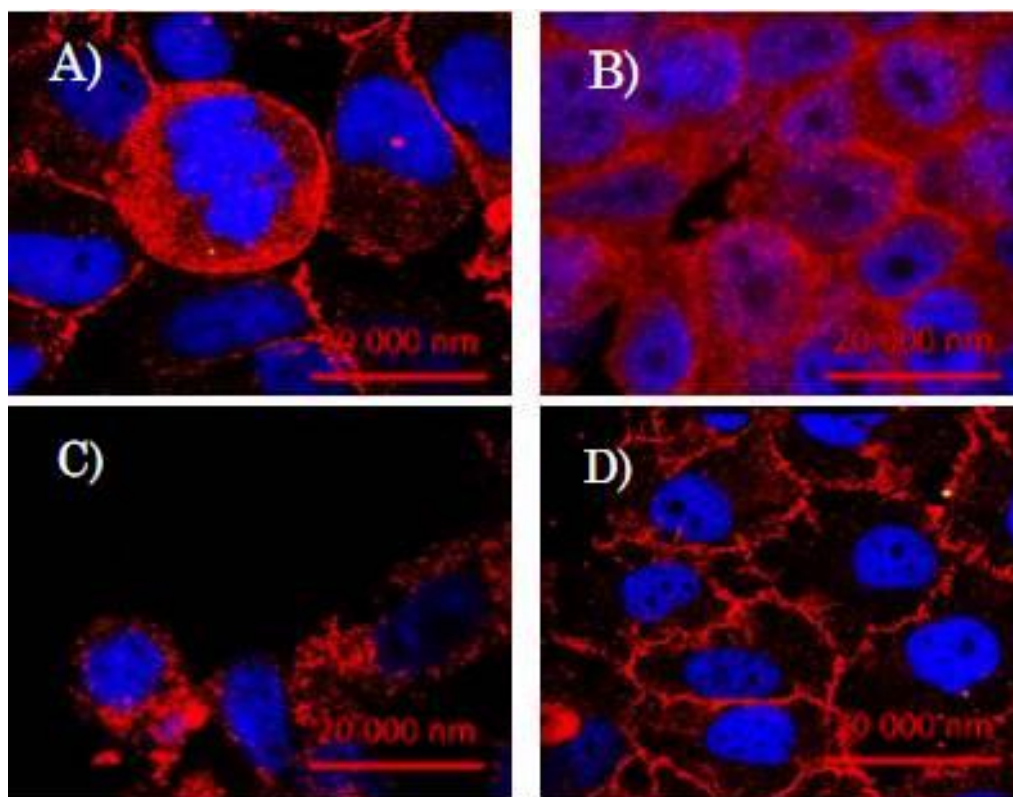


Figura 10. Efecto de ICI sobre la localización de β -catenina en células T47D. A) Vehículo: β -catenina se encuentra en la membrana celular y citoplasma B) (E_2 : 1 pM): β -catenina colocaliza en el núcleo con DAPI (tono rosa). C), D) ICI (1 y 0.01 μ M) disminución de la translocación de β -catenina al núcleo aún en presencia de E_2 . Amplificación 100X.

10.3.2 EFECTO DEL INHIBIDOR DE HER-2 (TRASTUZUMAB)

Una vez determinado el efecto de ICI sobre la translocación de β -catenina y la distribución de HER-2, se propuso estudiar el comportamiento de las proteínas antes mencionadas al aplicar Trastuzumab, inhibidor de HER-2, por la misma técnica.

Como en los experimentos anteriores, se incubó E₂ en combinación con diferentes concentraciones de Trastuzumab (1, 10 y 100 µg/mL). Las proteínas fueron marcadas como se describió previamente en los experimentos con ICI.

Los resultados obtenidos en la Figura 11 muestran que el incubar las células T47D con Trastuzumab ocasiona que se bloquee la translocación de β-catenina al núcleo, inducida por E₂; sin embargo, su efecto no es total (Figura 12), especialmente si se compara con el observado con el ICI (Figura 10). Al igual que en el experimento anterior, al incubar las células T47D con E₂, éste induce que HER-2 pierda su localización periférica y que ingrese al núcleo (Figura 11C). Cuando se incuban las células con Trastuzumab se pierde la señal de HER-2, lo que podría ser explicado por el hecho de que Trastuzumab induce la degradación de HER-2 por la vía del proteosoma (Vu y Claret, 2012), aunque no se puede descartar el hecho de que Trastuzumab también puede cambiar la conformación de HER-2 y ocasionar que el anticuerpo no pueda reconocer los epítopes de HER-2. Cuando se observan los resultados con ambos vehículos (agua y etanol) no hay diferencias entre ellos.

Con la finalidad de visualizar con mayor claridad el efecto del E₂ y del Trastuzumab sobre la translocación de β-catenina al núcleo, se realizaron ampliaciones en el microscopio confocal con el objetivo de 100X (Figura 12).

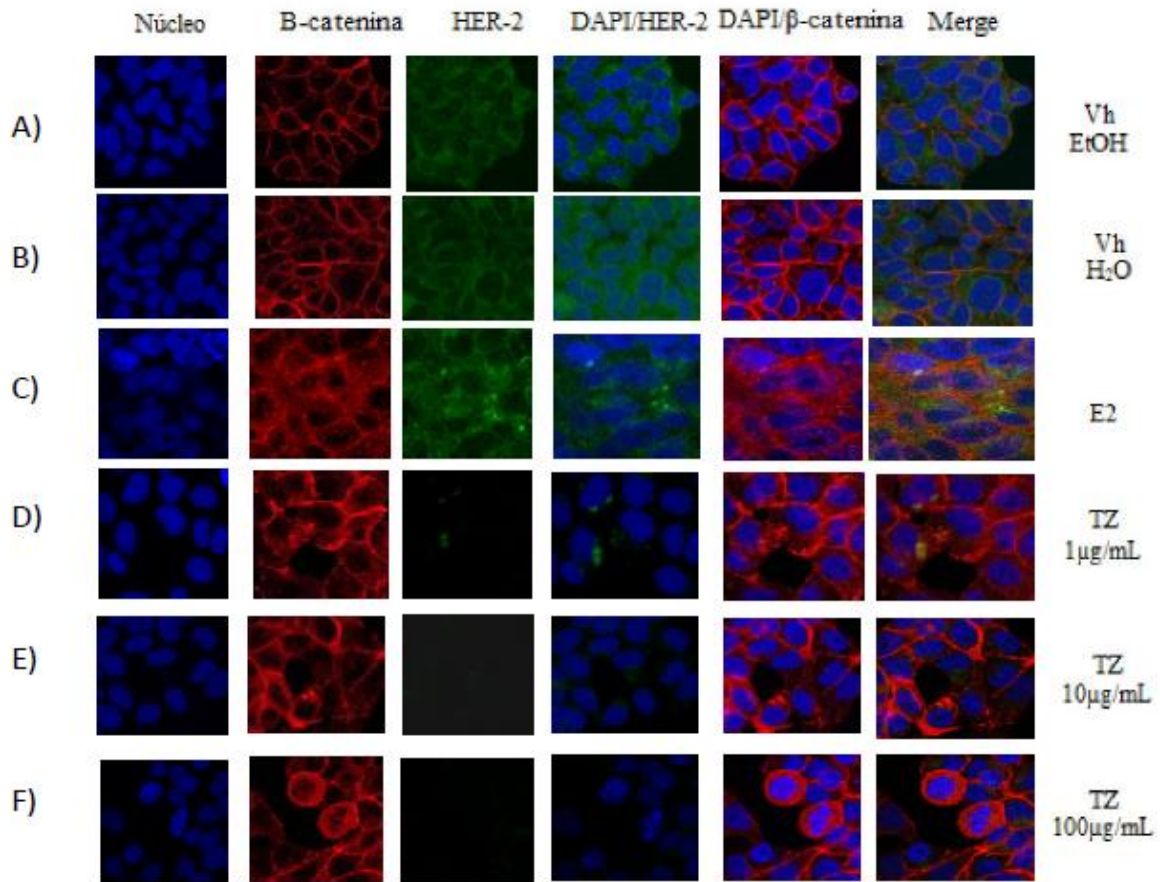


Figura 11. Análisis del efecto de Trastuzumab sobre la localización de β -catenina y HER-2 por Inmunofluorescencia y microscopía confocal en células T47D. Las células fueron crecidas en medio suplementado con suero tratado con carbón dextrán 24 h antes de los tratamientos. Después fueron aplicados los tratamientos: E₂; (1 pM) solo o en combinación con Trastuzumab en las concentraciones de 1, 10 o 100 μ g/mL, durante 72 h. Los anticuerpos secundarios empleados fueron ALEXA Fluor[®] 594 (rojo) para β -catenina, así como FITC (verde) para HER-2 y los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Las imágenes se visualizaron con el objetivo 40X.

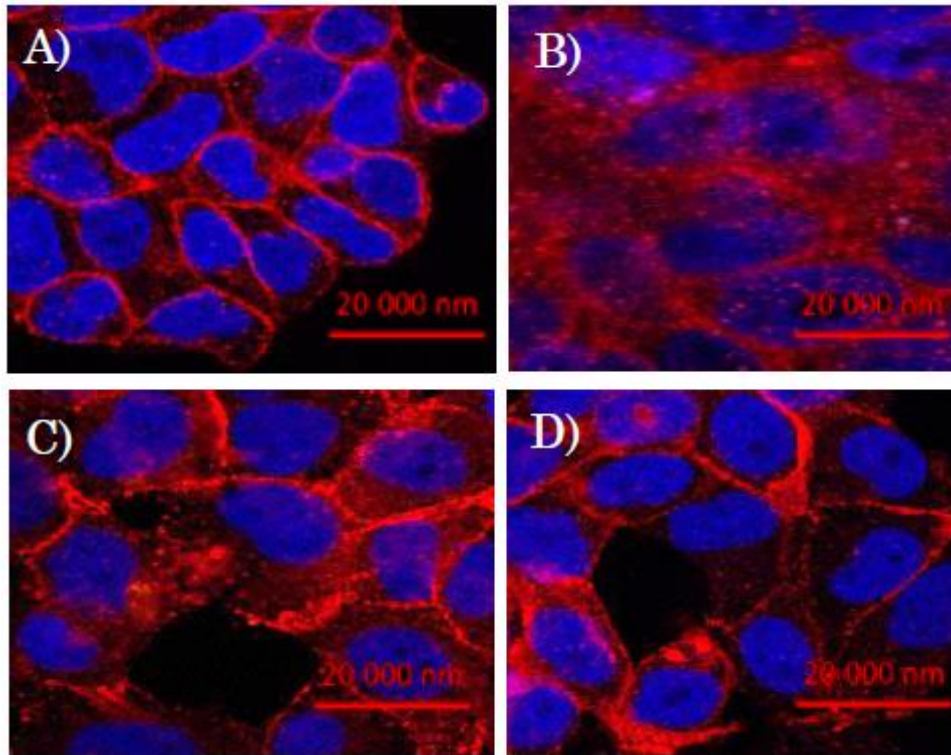


Figura 12. Efecto de Trastuzumab sobre la localización de β -catenina en células T47D. A) Vh (H_2O), β -catenina se encuentra en la membrana celular. B) E_2 (1 pM), β -catenina se transloca al núcleo. C), D) Trastuzumab (1 y 10 $\mu g/mL$), β -catenina se encuentra localizada en la membrana celular. Amplificación 100X.

10.2.3 EFECTO COMBINADO DE ICI 182,780 CON TRASTUZUMAB

Una vez que se determinaron los efectos individuales del ICI y de Trastuzumab, sobre la localización de la proteína β -catenina, se prosiguió a utilizar la combinación de ambos tratamientos, empleando las mismas concentraciones usadas en los experimentos de viabilidad celular, es decir 0.1 μ M de ICI y 10 μ g/mL de Trastuzumab, durante 72 h y en ambos casos en combinación con 1 pM de E_2 .

Como se observa en la Figura 13, la incubación con ambos agentes antineoplásicos bloquea totalmente la translocación de β -catenina al núcleo (Figura 13F), en comparación con los tratamientos individuales (Figura 13C-E). Como se observa en los experimentos de viabilidad, esta combinación tiene efecto letal en las células T47D, por lo que a las 72 h de incubación se observa menor número de células, haciendo difícil el conseguir un campo para realizar el análisis mediante microscopía confocal. En este caso se observa la pérdida de una parte de la señal de β -catenina en la membrana de las células T47D, lo que es evidente en las fotografías tomadas con el objetivo de 100 X (Figura 14).

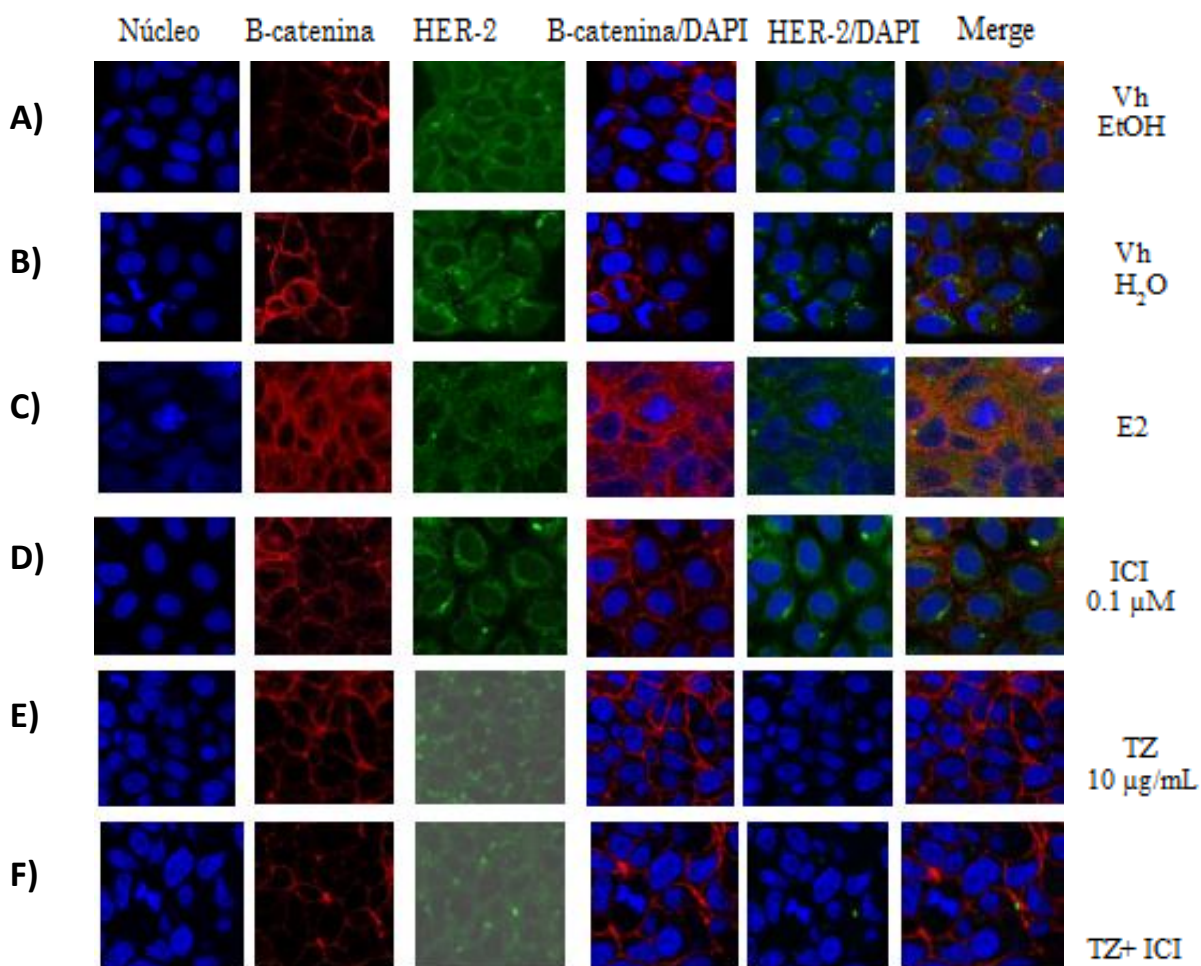


Figura 13. Análisis del efecto de ICI en combinación con Trastuzumab en la localización de β -catenina y HER-2, por inmunofluorescencia en microscopía confocal de células T47D. Las células se crecieron con suero tratado con carbón/dextrán por 24 h. Después se incubaron con Estradiol (E₂; 1 pM) solo o en combinación con ICI (0.01 μM), con Trastuzumab (10μg/mL) o con ambos, durante 72 h. Se utilizaron los anticuerpos secundarios ALEXA Fluor[®] 594 (rojo) para β -catenina, así como FITC (verde) para HER-2 y los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Las imágenes se visualizaron con el objetivo 40X. Nota: en las imágenes donde se observa el efecto de Trastuzumab solo o en combinación de ICI sobre la expresión de HER-2, se tuvo que aumentar la intensidad de luz

(brillo) para poder observar la señal, ya que las imágenes originales se observan totalmente oscuras.

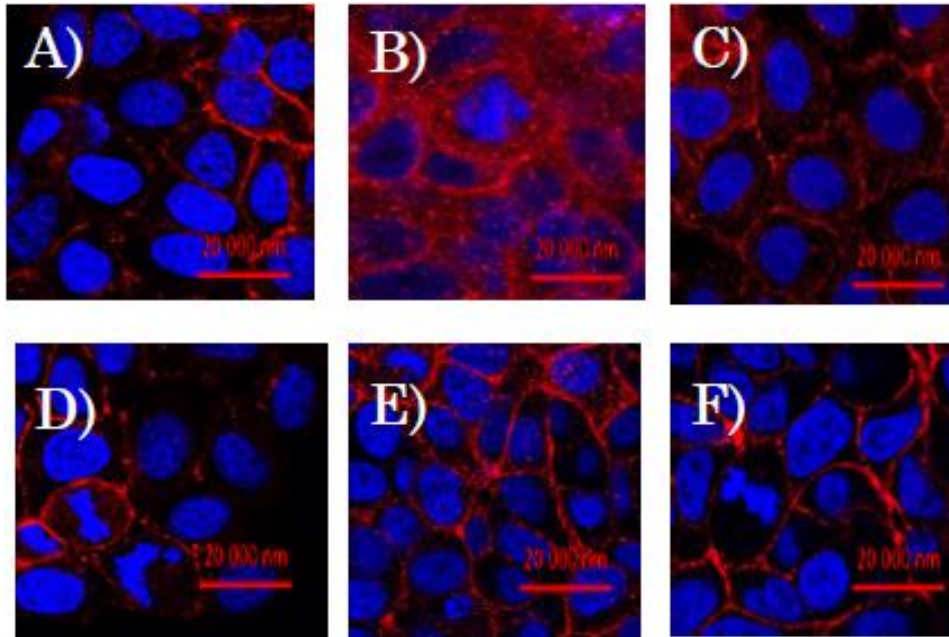


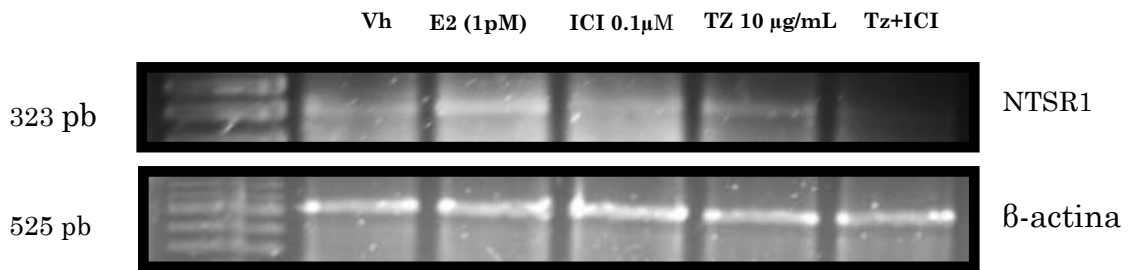
Figura 14. Amplificación de las imágenes donde se observa el efecto de la combinación de ICI con Trastuzumab sobre la localización de β -catenina en células T47D. A) Vh (EtOH), β -catenina se encuentra en la membrana celular. B) Estradiol (E_2 1 pM), β -catenina colocaliza en el núcleo con DAPI. C) ICI (0.1 μ M), inhibe el efecto de estradiol sobre la colocalización de β -catenina en el núcleo. D) Vh (H_2O), β -catenina se encuentra bien delimitada formando parte de la unión adherente en membrana. E) Trastuzumab (10 μ g/mL), β -catenina se localizada en la membrana celular, aunque parte de ella aún colocaliza con DAPI en el núcleo. F) Cuando se aplican ICI y Trastuzumab en combinación, β -catenina se delimita bien en la membrana celular, no hay co-localización nuclear. Las imágenes se visualizaron con el objetivo 100X en campos de interés en las mismas preparaciones que se analizaron en 40X.

10.4 EFECTO DE LA COMBINACIÓN DE ICI Y TRASTUZUMAB SOBRE LA EXPRESIÓN DEL ARNm DE NTSR1

Una vez que se demostró que la combinación de ICI con Trastuzumab genera efecto sinérgico sobre la viabilidad de las células T47D y que se bloquea totalmente la translocación de β -catenina al núcleo, inducida por estradiol, se procedió a determinar si la combinación de ambos fármacos pueden inhibir la expresión del ARNm que codifica para NTSR-1, como uno de los marcadores específicos de la vía Wnt/ β -catenina (Dupouy *et al.*, 2009), con lo que se infiere que las vías de transducción de señales de HER-2 y del RE convergen en esta vía.

Para lograr este objetivo se incubaron las células T47D con 1 pM de E_2 , sólo o en combinación con ICI (0.1 μ M), Trastuzumab (10 μ g/ mL) o Trastuzumab con ICI, durante 72 h. Al término de este lapso de tiempo se extrajo el ARNm y se prosiguió con la RT-PCR para amplificar un fragmento de 323 pb de la región codificante de NTSR1. Como se observa en la Figura 15, en las células incubadas con E_2 , se observó que la intensidad del amplicón del ARNm de NTSR1 se incrementa 1.8 veces en comparación con el vehículo, mientras que las células incubadas con ICI y E_2 disminuye casi 4 veces en comparación a E_2 solo. Cuando se incuban las células con Trastuzumab y E_2 , la expresión de NTSR1 disminuye a la mitad en comparación con el grupo con E_2 . El efecto combinado de ambos fármacos genera el bloqueo total de la síntesis del ARNm de NTSR1, con lo que se refuerza la hipótesis que ICI y Trastuzumab actúan sobre la vía Wnt/ β -catenina.

A)



B)

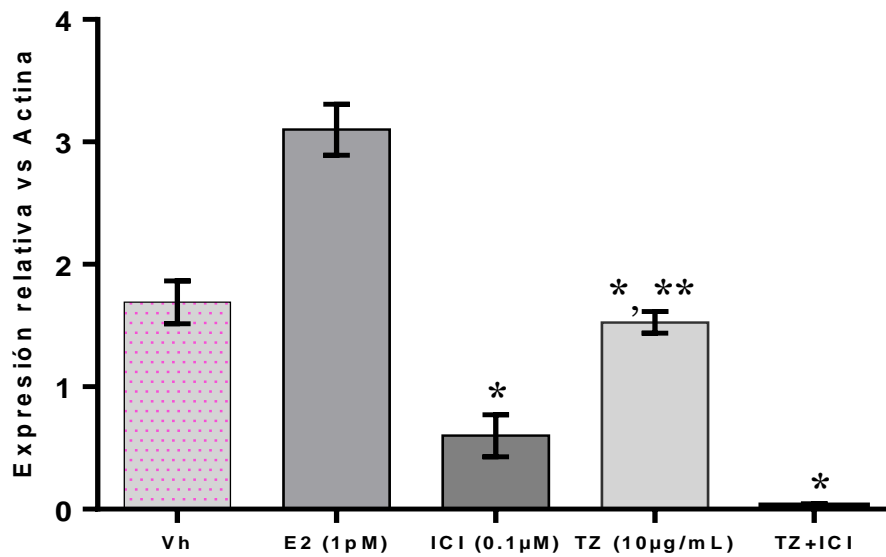


Figura 15. Efecto de la combinación de ICI y Trastuzumab sobre la expresión del ARNm de NTSR1 por RT-PCR. A) Gel representativo que muestra los amplificadores de PCR obtenidos correspondientes a NTSR1, con un peso molecular de 323 pb, y su control de normalización, β -actina, de 625 pb. Cuando se incubaron las células T47D con ICI (0.1 μ M), Trastuzumab (TZ; 10 μ g/mL) o la combinación de ambas durante 72 h, se realizó en presencia de E_2 (1pM). B) Gráfica que muestra la expresión relativa del gen NTSR1 vs β -actina. Los asteriscos denotan diferencias estadísticamente significativas, * $P < 0.05$ vs E_2 , ** $P < 0.05$ vs ICI.

11. CONCLUSIONES:

El uso de agentes antineoplásicos en el cáncer de mama puede generar diferentes efectos colaterales, por lo que se han diseñado estrategias que pueden bloquear selectivamente a los receptores de estrógenos (ICI) y HER-2 (Trastuzumab). Se ha demostrado que el uso combinado de estos fármacos presenta mejores efectos que su administración individual (Emde *et al.*, 2011), por lo que nos dimos a la tarea de demostrar que la activación de estos receptores pueden entrecruzar en la inducción de la vía Wnt/ β -catenina.

En el presente trabajo se demostró que el modelo de estudio es adecuado, ya que las células T47D representan el tipo luminal A/B, donde algunos reportes señalan que es HER-2 positivo (luminal A) y la mayoría señala que es HER-2 negativo (luminal B), que en su conjunto representa más del 70% de los casos de cáncer de mama. Esta controversia se resolvió al analizar la expresión de HER-2 y se demostró que está presente tanto el ARNm como la proteína, lo cual se corroboró con los análisis de inmunofluorescencia y se demuestra que su localización es predominantemente en membrana plasmática, bajo las condiciones de cultivo descritas. Además se demostró que esta línea celular es capaz de expresar NTSR1, el cual fue empleado como marcador de la actividad de la vía Wnt/ β -catenina.

Con los resultados obtenidos confirmamos que el tratamiento combinado de ICI y Trastuzumab, en presencia de E₂, presentan interacciones farmacológicas de tipo sinérgico, a diferencia de lo reportado por Collins y colaboradores (2012) quienes señalan que el efecto es aditivo. Cabe señalar que los resultados aquí presentados son preliminares, que es necesario incluir más concentraciones y más repeticiones, lo único que diferencia nuestro trabajo con el

señalado es la presencia de E₂, por lo que podemos inferir que éste puede jugar un papel importante en el tipo de interacción farmacológica de estos dos agentes. Otro tipo de estudios son necesarios para determinar el papel del E₂ en los efectos observados.

La conclusión más relevante es el hecho de que demostramos que la combinación de ambos fármacos bloquean significativamente la translocación de β -catenina al núcleo, previamente inducida por E₂, y que inhiben totalmente la transcripción de NTSR1, lo que sugiere que el entrecruzamiento de las vías de transducción de señales desencadenadas por ambos receptores es a través de la vía Wnt/ β -catenina.

Estos resultados pueden servir para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas contra el cáncer de mama en los estadios iniciales de la enfermedad, donde las células expresen tanto HER-2 como el RE. Esto representa que se pueden mejorar los esquemas terapéuticos contra el CaM y pudiera redundar en la disminución de efectos colaterales ocasionados por estos fármacos y, en caso de que se pueda disminuir notablemente la cantidad de Trastuzumab utilizada, se podrían reducir los costos del tratamiento sin afectar su eficacia.

12. PERSPECTIVAS

Cabe señalar que los resultados obtenidos son preliminares debido a que se requieren hacer más repeticiones de cada experimento, particularmente los que utilizan la combinación de ICI y Trastuzumab, explorar mayor número de concentraciones y reducir los tiempos de tratamiento, particularmente en los estudios de translocación de β -catenina al núcleo. Sin embargo, el presente estudio sienta las bases para poder analizar los efectos farmacológicos del tratamiento combinado de ICI y Trastuzumab, pudiéndose analizar otras vías de transducción de señales y la combinación con agentes quimioterapéuticos, así como los mecanismos de acción de cada uno de ellos.

De manera particular se podría utilizar un inhibidor específico de la vía Wnt/ β -catenina para demostrar que el efecto en la disminución del ARNm de NTSR1 es por esta vía. No obstante, también sería importante ajustar las concentraciones de ICI y Trastuzumab, con la finalidad de utilizar las más bajas posibles y con el mismo efecto.

Por otro lado, es importante comprobar la localización de las proteínas β -catenina y HER-2 mediante fraccionamiento celular y Western Blot, así como confirmar los datos obtenidos por PCR (Punto final) mediante RTq-PCR (Tiempo real).

13. REFERENCIAS

1. Aberle HU., Bauer AT., Stappert JK., Kispert AM., Kemler RL. Beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer*. 16(2):3797-3804; 1997.
2. Berardo MD., O'conell PK., Allred DC. Biological characteristics of premalignant and preinvasive breast disease. *Clin Transl Oncol*. 8(11):1-17; 2008.
3. Bruton I, Lazo J, Parker KL, editores. Hormonas y fármacos relacionados en las bases farmacológicas de la terapéutica. 11 ed. Colombia: Interamericana, 2007 p.1381-1386.
4. Ceran C., Cokol M., Cingoz S., Tasan I., Oztur M., Yagci T. Novel anti-HER2 monoclonal antibodies: synergy and antagonism with tumor necrosis factor- α . *BMC Cancer*. 12(450):1471-2407; 2012.
5. Collins DM., O'Donovan N., McGowan PM., O'Sullivan F., Duffy MJ., Crown J. Trastuzumab induces antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) in HER-2-non-amplified breast cancer cell lines. *Ann Oncol*. 23(7):1788-95; 2012.
6. Dupouy S., Mourra N., Doan VK., Gompel A., Alifano M., Forgez P. The potential use of the neurotensin high affinity receptor 1 as a biomarker for cancer progression and as a component of personalized medicine in selective cancers. *Biochimie*. 93(9):1369-78; 2011.

7. Dupouy ST., Viardot VF., Alifano MJ., Souazé FH., Gompel AJ., Forgez PL. The Neurotensin Receptor-1 Pathway Contributes to Human Ductal Breast Cancer Progression. *PLoS One* 4(1):4223-4245; 2009.
8. Emde A., Mahlknecht G., Maslak K., Ribba B., Sela M., Possinger K., Yarden Y. Simultaneous Inhibition of Estrogen Receptor and the HER2 Pathway in Breast Cancer: Effects of HER2 Abundance. *Transl Oncol.* 4(5):293–300; 2011.
9. Fang N., Yi K., Da X., Xuen B. Abnormal expression of beta-catenin and E-cadherin in Her2-positive breast cancer and its implication. *J South Med Univ.* 20(4):2237-40; 2009.
10. Ferlay JL., Shin HR., Bray FK., Forman DO., Mathers CP., Parkin DM. Estimates of Worldwide burden of cancer in 2008. *Int J Cancer.* 127(12):2893-917; 2010.
11. García P., Rodríguez M., Pérez E., Cerbon M., Mohar A. Synergistic effects of ICI 182,780 on the cytotoxicity of cisplatin in cervical carcinoma cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol.* 53(1):533–540; 2004
12. Gelber AS., Arnist W., Richnigt MJ. Updated International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 21(8):3357-3365; 2003.
13. Gupta N., Schmitt FR., Grebhardt SD., Mayer VD. B-catenin is a Positive Regulator of Estrogen Receptor- α Function in Breast Cancer Cells. *Cancers.* 3(2):2990-3001; 2011.

14. Helguero LA., Faulds MH., Gustafsson JA., Haldosén LA. Estrogen receptors alfa (ERalpha) and beta (ERbeta) differentially regulate proliferation and apoptosis of the normal murine mammary epithelial cell line HC11. *Oncogene*. 24(44):6605-16; 2005.
15. Howe L., Brown MC. Wnt signaling and breast cancer. *Cancer Biol Ther*. 3(1):36-41; 2004.
16. INEGI. 2013. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e informática. Estadísticas o pronóstico del día mundial contra el Cáncer. México, DF. (www.inegi.gob.mx). Actualizado el 12 de enero de 2013, consultado el 16 de Agosto de 2013.
17. Kelsey JL., Gammon MD., John EM. Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol Rev*. 15(14):36-47; 2009.
18. Kim S., Han J., Shin I., Kil WH., Lee JE., Nam SJ. A functional comparison between the HER2 (high)/HER3 and the HER2 (low)/HER3 dimers on heregulin- β 1-induced MMP-1 and MMP-9 expression in breast cancer cells. *Exp Mol Med*. 44(8):473-482; 2012.
19. Klinge CM. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res*. 29(14):2905–2919; 2001.
20. Kouzmenko A., Takeyama K, Ito S., Furutani T., Sawatsubashi. Wnt/ β -Catenin and Estrogen Signaling Converge in Vivo. *J Biol Chem*. 279(39):40255–40258; 2004.

21. Kunisue H., Kurebayashi J., Otsuki T., Tang C., Kurosumi M, Yamamoto S., Tanaka K., Doihara H., Shimizu N., Sonoo H. Anti-HER2 antibody enhances the growth inhibitory effect of anti-estrogen on breast cancer cells expressing both estrogen receptors and HER2. *Br J Cancer*. 82(1):46–51; 2000.
22. Li Q., Holford TR., Zhang Y., Boyle P., Mayne ST., Dai MM., Zheng TK. Dietary fiber intake and risk of breast cancer by menopausal and estrogen receptor status. *Eur J Nutr*. 2(13):15-28; 2012.
23. Lin SY., Xia W., Wang IC. Beta catenina a novel prognostic marker for breast cancer its roles in ciclin D1 expression and cancer progression. *Proc Natl Acad*. 97(20):426-441; 2000.
24. Mulholland DJ., Shoukat., Gerhard AC., Colleen CN. Interaction of Nuclear Receptors with the Wnt/ β -Catenin/Tcf Signaling Axis: Wnt You Like to Know? *Endocr Rev*. 26(7):898-915; 2005.
25. Muss HB., Thor AD., Berry DA., Kute T., Liu ET., Koerner F., Cirrincione CT., Budman DR., Wood WC., Barcos M. c-erbB-2 expression and response to adjuvant therapy in women with no depositive early breast cancer. *N Engl J Med*. 330(10):1260-1266; 2006.
26. Narayan M., Wilken JA., Harris LN., Baron AT., Kimbler KD., Maihle NJ. Trastuzumab-induced HER reprogramming in "resistant" breast carcinoma cells. *Cancer Res*. 69(6):2191-4; 2009.

27. NCI. 2012. National Cancer Institute, de los Institutos Nacionales de Salud de los EEUU. (<http://www.cancer.gov/espanol/cancer/que-es>). Actualizado el 27 de enero de 2012; consultado el 22 de febrero de 2012.
28. Neyt M., Albrecht J., Cocquyt V. An economic evaluation of Herceptin[®] in adjuvant setting: the Breast Cancer International Research Group 006 trial. *Annals of Oncology*. 17(2):398-90; 2006.
29. Rajkulmar T., Gullick J. The type 1 growth factor receptors in human breast cancer. *Breast Cancer Res*. 29(2):3-9; 1994.
30. Ross JS., Fletcher JA. The Her-2/neu gene and protein in breast cancer: biomarker and target of therapy. *Oncologist*. 8(6):307-25; 2003.
31. Slamon D., Eiermann W., Robert N., Pienkowski T., Martin M., Press M., Mackey J., Glaspy J., Chan A., Pawlicki M., Pinter T., Valero V., Liu MC., Sauter G., von Minckwitz G., Visco F., Bee V., Buyse M., Bendahmane B., Tabah-Fisch I., Lindsay MA., Riva A., Crown J. Breast Cancer International Research Group. Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 365(14):1273-83; 2011.
32. Smolnikar K., Löffek S., Schulz T., Michna H., Diel P. Treatment with the pure antiestrogen faslodex (ICI 182780) induces tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1) expression in MCF-7 breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. 63(3):249-59; 2000.
33. Solej MJ., Ferronato MA., Nano MT. Locally advanced breast cancer in the elderly curettage mastectomy. *Tumori*. 91(4):321-4; 2005.

34. Sorkin A., Goh LK. Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs. *Exp Cell Res.* 315(4):683-696; 2009
35. Torres CS., Acevedo B., Aguirre D., Aliaga M., Cereceda G., Gutiérrez C., Ibarra V., Paredes F., Reyes V., Robert M., Sola V., Schwartz J. State of the art in breast cancer diagnosis and treatment. *Rev Med Clin.* 24(4):588-609; 2013.
36. Vallabhaneni S., Nair BC., Cortez V., Challa R., Chakravarty D., Tekmal RR., Vadlamudi RK. Significance of ER-*Src* axis in hormonal therapy resistance. *Breast Cancer Res Treat.* 130(2):377-85; 2011.
37. Vu1 T., Clare XF. Trastuzumab: updated mechanisms of action and resistance in breast cancer. *Front oncol.* 2(62):87-101; 2012.
38. Wang K., Zhang W., Zhou C. Geldanamycin destabilizes HER2 tyrosine kinase and suppresses Wnt/ β -catenin signaling in HER2 overexpressing human breast cancer cells. *Oncol Rep.* 17(1):89-96; 2007.
39. Wehrli M., Dougan ST., Caldwell K., O'Keefe L., Schwartz S., Vaizel D. Arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signaling. *Nature.* 407(12):527-530; 2000.
40. Wharton KA. Runnin with the Dvl: proteins that associate with Dsh/Dvl and their significance to Wnt signal transduction. *Dev Biol.* 253(13):1-17; 2005.
41. Wickerham L., Tan E. Quimioterapy: Breast Cancer. *Semen Oncol.* 1(2):135-41; 2002.

42. Wieczorek M., Paczkowska A., Guzenda P., Majorek M., Beandrek AK ., Lamparska PM. Silencing of Wnt-1 by siARN induces apoptosis of MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Biol Ther.* 7(2):268-74; 2008.
43. Wittekind C., Neid M. Cancer invasion and metastasis. *Cancer Res Treat.* 1(11):14-16; 2005.
44. Yang L., Wu X., Wang Y., Zhang K., Wu J., Yuan YC., Deng X., Chen L., Kim CC. FZD7 has a critical role in cell proliferation in triple negative breast cancer. *Oncogene.* 30(43):4437-46; 2011.