



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Maestría en Biología de la Reproducción Animal

**“EFECTO DEL BLOQUEO DE LA CINASA cSRC SOBRE LA EXPRESIÓN
DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS ALFA EN CÉLULAS DE CÁNCER
DE MAMA TRIPLE NEGATIVAS”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

PRESENTA:

M. V. Z. MARTHA LIZZETE OCAMPO VALDEZ

DIRECTOR:

Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura

ASESORES:

Dra. Viridiana Yazmín González Puertos

Dr. Javier Esteban Jiménez Salazar

Ciudad de México, 17 de noviembre 2017

**Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Endocrinología Molecular de la
Universidad Autónoma Metropolitana, bajo la dirección del Dr. Javier
Esteban Jiménez Salazar**

**La Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la universidad
Autónoma Metropolitana, unidad Iztapalapa está en el Programa Nacional de
Posgrados de Calidad del CONACyT con clave 003797**

**La alumna: Martha Lizzete Ocampo Valdez fue apoyada con la beca otorgada
por parte de CONACyT con el No. de CVU 718653**

COMITÉ DE TUTORES

DIRECTOR

DR. PABLO GUSTAVO DAMÍAN MATZUMURA

Departamento de Biología de la Reproducción
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa

ASESORES

Dra. Viridiana Gonzales Puertos †

Departamento de Ciencias de la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa

Dr. Javier Esteban Jiménez Salazar

Departamento de Biología de la Reproducción
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: **Efecto del bloqueo de la cinasa cSrc sobre la expresión del Receptor de Estrógenos alfa en células de cáncer de mama triple negativas.**

El examen se realizó el día 17 del mes de noviembre de 2017.

JURADO DE EXAMEN



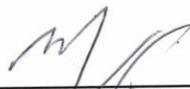
PRÉSIDENTE

Dr. en BE. Javier Esteban Jiménez Salazar
Departamento de Biología de la Reproducción
Universidad Autónoma Metropolitana
bioquímicaejs@hotmail.com



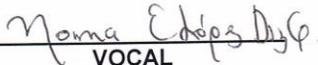
SECRETARIO

Dra. en BE. María Guadalupe Isabel Domínguez Gómez
Subdirección de Investigación Clínica
Instituto Nacional de Cancerología
dguadalupeisabel@yahoo.com.mx



VOCAL

Dra. Mina Königsberg Fainstein
Departamento de Ciencias de la Salud. UAMI
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa
mkf@xanum.uam.mx



VOCAL

Dra. Norma Edith López Díaz-Guerrero
Departamento de Ciencias de la Salud. UAMI
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa
norm@xanum.uam.mx

AGRADECIMIENTOS

Con toda humildad agradezco infinitamente a mi familia, MI GRAN EQUIPO, su apoyo y Fé en que siempre puedo dar más, porque sé que cada batalla que emprendo no es sólo mía.

A la Sra. Marilú Mora, al Sr. Rafael Estrada y a mi amiga Nancy Nelly Mora, agradezco de corazón su apoyo incondicional, porque fueron testigo de que este proyecto no fue fácil y que represento un gran reto, que sin ellos no hubiera sido fácil.

Al Dr. Pablo Matzumura por sus consejos, sus enseñanzas, su paciencia, su tiempo, gracias de corazón.

A la Dra. Viridiana por su apoyo y confianza, que DIOS la tenga en bien. †

Al Dr. Javier por sus enseñanzas en el laboratorio.

A mis compañeros de laboratorio, Gabi, Rene, Bani, Rosa, Jesús por hacer tan llevadera la vida dentro del laboratorio, gracias por sus enseñanzas.

ÍNDICE

1. RESUMEN	14
2. ABSTRACT	15
3. INTRODUCCIÓN	16
3.1 EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA	16
3.2 CAUSAS Y FACTORES DE RIESGO	16
3.3 CLASIFICACIÓN DEL CÁNCER DE MAMA	16
3.4 CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO	18
3.5 RECEPTORES DE ESTRÓGENOS	19
3.6 CINASA cSRC	20
4. ANTECEDENTES	23
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26
6. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	26
7. HIPÓTESIS	26
8. OBJETIVO GENERAL	27
8.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
9. MATERIALES Y MÉTODOS	28
9.1 LÍNEAS CELULARES	28
9.2 REACTIVOS	28
9.3 CULTIVO CELULAR	28
9.3.1 TRATAMIENTOS	28
9.4 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL ARNm QUE CODIFICA PARA EL RE-α	29
9.4.1 EXTRACCIÓN DE RNA MEDIANTE LA TÉCNICA DE TRIZOL	29
9.4.2 ANÁLISIS DE LA INTEGRIDAD DEL RNA	29
9.4.3 EXPRESIÓN DEL ARNm MEDIANTE RT-PCR	30
9.5 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNA RE-α MEDIANTE WESTERN BLOT	31
9.6 ANALISIS DE EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA RE-α POR INMUNOCITOFUORESCENCIA	32
9.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	32

10.RESULTADOS	33
10.1 ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE RT-PCR PARA EL RE-α	34
10.2 EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE CSRC SOBRE LA EXPRESIÓN DEL ARNM QUE CODIFICA AL RE-A	34
10.3 EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE CSRC SOBRE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA DEL RE-A POR WESTERN BLOT	35
10.4 EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE CSRC SOBRE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA DEL RE-A POR INMUNOHISTOQUÍMICA	38
11.DISCUSIÓN	41
12.CONCLUSIONES	43
13.PERSPECTIVAS	44
14.BIBLIOGRAFÍA	45

ABREVIATURAS

μ M: Micromolar

ARN: Ácido Ribonucleico

ATCC: American Type Culture Collection

ATP: Adenosina Trifosfato

BRCA1: Gen supresor de tumores de humano 1, por sus siglas en inglés Breast Cancer 1

CaM: Cáncer de Mama

CaM-TN: Cáncer de Mama Triple Negativo

CHEK2: Proteína cinasa Serina/Treonina por sus siglas en inglés Checkpoint kinase 2

Crk: Cinasa del carboxilo terminal

cSrc: Cinasa del Sarcoma de Rous (tipo celular)

DEPC: Diethyl pirocarbonato

DMEM: Medio Eagle Modificado por Dulbecco

DMSO: Dimetil Sulfóxido

dNTP's: Desoxiribonucleótidos

E2: Estradiol

EDTA: Ácido Etilendiamino tetraacético

EGFR: Receptor del Factor de crecimiento Epidérmico por sus siglas en inglés

FAK: Cinasa de Adhesión Focal

Frk: Cinasa relacionada con Fyn

Fyn: Proteína protooncogénica asociada al receptor de células T

GPER: Receptor de Estrógenos acoplado a Proteínas G

GPR30: Receptor 30 acoplado a proteínas G

H₂O: Agua

Hck: Cinasa de células hematopoyéticas por sus siglas en inglés Hematopoietic cell kinase

HCl: Ácido clorhídrico

HER1: Receptor de tipo 1 del factor de crecimiento epidérmico

HER2: Receptor de tipo 2 del Factor de Crecimiento Epidérmico

HER2: Receptor de tipo 2 del factor de crecimiento epidérmico

IDC: Carcinoma Ductal Invasivo

IHQ: Inmunohistoquímica

ILC: Carcinoma Lobular invasivo

INEGI: Instituto Nacional de Estadística y Geografía

KDa: Kilo Daltones

Kg: Kilo gramo

Ki67: Marcador de proliferación celular

Lck: Cinasa específica de linfocitos por sus siglas en inglés Lymphocyte specific kinase

LKB-1: Cinasa supresora de tumores, por sus siglas en inglés Liver Kinase B1

Lyn: Proteína tirosina cinasa p56, miembro de la familia de Src

MDA-MB-231: Línea Celular de Cáncer de Mama Triple Negativa

Mg: Magnesio

MgCl₂: Cloruro de Magnesio

mM: Micro molar

mM: Milimolar

MULv: Enzima Transcriptasa reversa del virus de leucemia murina

NaCl: Cloruro de Sodio

P53: Proteína supresora de tumores de 53 KDa

PBS: Por sus siglas en inglés Phosphate Buffered Saline

PCR: Reacción en Cadena de *la Polimerasa

pH: Potencial de Hidrógeno

PP2: Pirazole Pirimidil Amina

PTEN: Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa por sus siglas en inglés Phosphatase and tensin homolog

PVDF: Polivinil difluoro metano

RE: Receptor de Estrógenos

REBF1: Receptor e Estrógeno B Factor 1

REF1: Receptor de Estrógenos Factor 1

RE α : Receptor de Estrógenos alfa

RE β : Receptor de Estrógenos beta

RP: Receptor de Progesterona

RT-PCR: Retro transcripción Reacción en cadena de la Polimerasa

SFB: Suero Bovino Fetal

SH2: Dominio de proteínas conservadas que reconoce dominios fosforilados

SNC: Sistema Nervioso Central

TBE: solución tampón formada por Tris, borato y EDTA

TBS: Por sus siglas en inglés Tris Buffered Saline

TN: Triple Negativo

Tyr/ T: Tirosina

vSrc: Cinasa del Sarcoma de Rous (tipo viral)

Yes: Proteína tirosina cinasa miembro de la familia de Src

LISTA DE FIGURAS Y GRÁFICAS

Figura 1. Representación anatómica de la mama: Conformada por lobulillos donde ocurre la síntesis láctea y por el conducto lácteo.

Figura 2. Clasificación de cáncer de mama: Basado en la detección de los receptores de las hormonas esteroides, que incluye el RE- α y el de RP, así como HER2.

Figura 3. Estructura de la proteína Src: Donde muestra sus diferentes dominios.

Figura 4. Representación esquemática de la forma activa e inactiva de cSrc: Se muestra la fosforilación en la conformación cerrada, donde se encuentra la tirosina 527 fosforilada y anclada a la región SH2, mientras que la conformación activa se encuentra fosforilada en tirosina 416.

Figura 5. Electroforesis de los productos de RT-PCR de gradientes de temperatura del RE- α : el producto esperado es de 250 pb que corresponde al RE- α , la temperatura óptima fue la de 52°C.

Figura 6. Electroforesis de los productos de RT-PCR RE- α de diferentes concentraciones de MgCl: diferentes concentraciones de MgCl para la expresión de receptor de estrógenos, donde la óptima fue 1.2 μ M.

Figura 7. Expresión del RE- α en células MDA-MB-231: Se muestra en el gel el amplicón del RE- α y actina como gen de normalización.

Figura 8. Expresión de la proteína del RE- α de células MDA-MB-231 mediante Western Blot: Se muestran las bandas de la proteína de interés RE- α y la proteína β -actina. Las células fueron incubadas con PP2 o con DMSO.

Figura 9. Expresión de la proteína del RE- α mediante Inmunofluorescencia en células MCF-7: Las células fueron cultivadas a confluencia, fueron utilizadas como control positivo.

Figura 10. Expresión de la proteína del RE- α mediante Inmunofluorescencia en células MDA-MB-231 a 24 horas de tratamiento: Las células fueron cultivadas a confluencia, incubadas por 24 h con PP2 o DMSO.

Figura 11. Expresión de la proteína del RE- α mediante Inmunofluorescencia en células MDA-MB-231 a 48 horas de tratamiento: Las células fueron cultivadas a confluencia, incubadas por 48 h con PP2 o DMSO.

Gráfica 1. Cociente de los valores obtenidos mediante densitometrías del RE- α y de β -actina: Las células MDA-MB-231 fueron incubadas con PP2 o DMSO, la gráfica representa el promedio de 3 experimentos independientes realizados por triplicado y las barras de dispersión representan la desviación estándar.

1. Resumen

El Cáncer de Mama Triple Negativo (CaM-TN) se caracteriza por la ausencia o pérdida de función de los Receptores de Estrógenos (RE), Receptor de Progesterona (RP) y el Receptor de tipo 2 del Factor de Crecimiento Epidérmico (HER2), por lo que los tumores son más invasivos y metastáticos y los tratamientos son inespecíficos y, por ende, más agresivos (quimioterapia). Recientemente se planteó la posibilidad de que en este tipo de cáncer se puede inducir la reexpresión del RE, particularmente el tipo alfa ($RE\alpha$). Aunado a esto, algunos trabajos señalan que cinasa cSrc regula la degradación del $RE\alpha$, a través del proteosoma, además de que la inhibición de esta enzima, a través de peptidomiméticos, disminuye la formación de tumores, inducidos por las células de CaM-TN (MDA-MB-231). Estas observaciones nos llevaron a plantear el siguiente objetivo: analizar el efecto de la inhibición química de cSrc sobre el incremento en la presencia del RE en las células MDA-MB-231. Estas células fueron incubadas en ausencia o presencia de PP2, inhibidor competitivo de la familia de cinasas Src y se analizó la expresión del ARN mensajero que codifica al $RE\alpha$ mediante la técnica de RT-PCR, así como la presencia de la proteína mediante Western blot e inmunocitofluorescencia. Los resultados obtenidos señalan una baja expresión del ARNm del $RE\alpha$ en células MDA-MB-231, en comparación con la observada en las células MCF-7, y no se observaron diferencias al bloquear a Src durante 24 h. Cuando se determinó la presencia de la proteína $RE\alpha$ tampoco se observaron diferencias significativas entre los grupos experimental (PP2) y vehículo (DMSO) ni por la técnica de Western blot sensibilizada ni por inmunocitofluorescencia, después de 24 o 48 h de incubación. Estos resultados confirman lo que otros autores han reportado que las células MDA-MB-231 si expresan el $RE\alpha$ en bajas cantidades; sin embargo, el bloqueo químico de Src no induce su reexpresión. Se deberán trabajar otras opciones que abren nuevas posibilidades de tratamientos contra el CaM-TN.

2. Abstract

Triple-negative breast cancer (TNBC) is characterized by the lack expression of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR) and the human epidermal growth factor receptor type 2 (HER2); these tumors are more invasive and metastatic, and therefore treatments are more unspecific and aggressive (chemotherapy). Recently, it has been proposed the possibility that ER, particularly the alpha isoform (ER α), can be re-expressed in this kind of cancer. Besides, reports showed that cSrc kinase promotes ER α proteasome proteolysis and therefore, the use of peptidomimetic inhibitors of Src resulted in significant regression of mouse tumors induced by the TNBC cell line MDA-MB-231.

These observations lead us to propose that chemical inhibition of cSrc would increase ER α in MDA-MB-231 cells. In order to test this hypothesis, cells were incubated in the presence and absence of PP2, a competitive inhibitor of Src-family kinases. The use of RT-PCR to measure ER α mRNA expression, and immunofluorescence and Western blot testing to detect its protein. Results showed ER α expression is low in MDA-MB-231 cells compared with MCF-7 cells, and no differences were seen in either cSrc inhibited- or vehicle-treated cells for 4 h. When ER α protein was measured, no significant differences were found between groups (PP2 or DMSO vehicle) neither by Western blot nor immunofluorescence detection for 24 or 48 h of incubation in MDA-MB-231 cells.

Our results agree with the data reported by other authors that low ER α is expressed in MDA-MB-231 cells; however, we were unable to confirm our hypothesis that Src inhibition induces its re-expression in this TNBC cell line. More work should be done to find new targeted therapies against TNBC.

3. Introducción

3.1 Epidemiología del Cáncer de Mama

El cáncer de mama (CaM) es la patología diagnosticada con mayor frecuencia en mujeres mayores de 20 años, anualmente se estiman 1,676,600 nuevos casos en el mundo, además de ser una de las principales causas de muerte oncológica, ya que mundialmente se reportaron 521,900 decesos por este tipo de cáncer en 2015 (DeSantis et al., 2015; Torre et al., 2015). En nuestro país según el INEGI en 2016 la morbilidad hospitalaria que presenta el cáncer de mama es de 29.5%, mientras que la mortalidad que se reporta para este mismo tipo de cáncer es de 14.36, estos datos son por cada por cada 100 mil habitantes (INEGI, 2016).

3.2 Causas y factores de riesgo

Uno de los principales factores de riesgo que se consideran en el cáncer mamario es la exposición prolongada a los estrógenos, como sucede en la menarca temprana, menopausia tardía, obesidad (Chu et al., 2007; Yue et al., 2013), terapia hormonal de remplazo con estradiol (Yager and Davidson, 2008; Yager and Santen, 2012) y, en menor medida, los factores genéticos que incluyen mutaciones en los genes que codifican a las proteínas BRCA 1 y 2, CHEK2, TP53, LKB-1 y PTEN (Yue et al., 2010, 2013).

3.3 Clasificación del Cáncer de Mama

Anatómicamente (Figura 1) se han identificado dos grandes subtipos de CaM, carcinoma ductal invasivo (IDC) y carcinoma lobular invasivo (ILC) (Oliveira et al., 2016). La frecuencia con la que se presenta el IDC es del 83% (Fakhrjou et al., 2016), este tipo de CaM inicia en el conducto lácteo del seno, penetra a través de la pared del conducto y crece en el tejido adiposo del seno (American Cancer Society, 2016); mientras que el ILC representa del 10 al 15% de los CaM, el cual comienza en los lobulillos y muestra una relación muy estrecha con terapia de reemplazo hormonal (Sawyer et al., 2014).

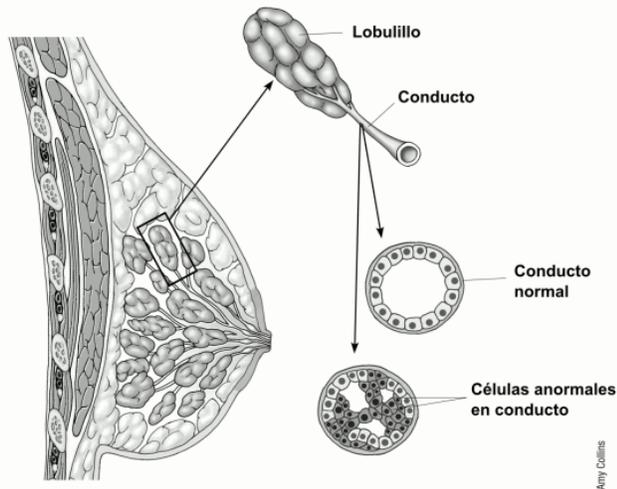


Figura 1. Representación anatómica de la mama. Conformada por dos estructuras, la primera de ella llamada lobulillo lugar donde ocurre la síntesis láctea y el conducto lácteo. <http://www.cancer.org>

Existe otra clasificación del cáncer de mama humano, basándose en el perfil, por inmunohistoquímica (IHQ), de la expresión de receptores de hormonas (RH) tales como el mismo receptor de estrógenos (RE) y de progesterona (RP), así como el receptor tipo 2 del factor de crecimiento epidérmico, (HER2, por sus siglas en inglés) (Toss and Cristofanilli, 2015), por lo que se clasifican en aquellos que expresan RE y RP pero no expresan HER2 como luminal A y luminal B HER2 negativo, existe un luminal B HER2 positivo (+) que expresa a estos tres receptores (Toss and Cristofanilli, 2015); los subtipos luminal se caracterizan por la expresión de ambos receptores de hormonas (estrógenos y progesterona); por otro lado la clasificación de aquellos que no expresan RE ni RP pero si HER2 se le denomina subtipo HER2+; finalmente el subtipo triple negativo (TN), que no expresa ninguno de los tres receptores (Figura 2).

El subtipo luminal A y B HER2 negativo se diferencian por el índice de proliferación celular (Ki-67) (García Mur et al., 2015). Cabe resaltar que los análisis de perfiles de expresión génica son considerados la mejor manera de clasificar el CaM ya que permite identificar genes específicos, pero dado a su costo elevado y difícil aplicación, los servicios de anatomía patológica lo considera como la técnica alternativa más utilizada (García Mur et al., 2015).

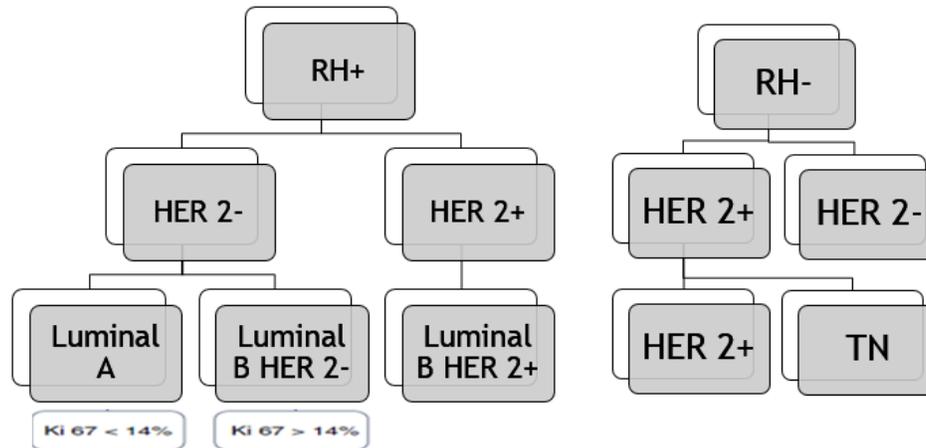


Figura 2. Clasificación del cáncer de mama con base en la detección por inmunohistoquímica de los receptores de las hormonas esteroides (RH), que incluye el de estrógenos (RE) y de progesterona (PR), así como el receptor 2 del Factor de Crecimiento Epidérmico (HER2) y el marcador de proliferación celular Ki-67, el subtipo luminal con Ki67 indica que menos del 14% de las células proliferan, en cuanto a luminal B HER2- hace referencia que más del 14% de las células están proliferando. Los signos positivo (+) y negativo (-) representan expresión o no expresión respectivamente. Modificado de García Mur et al., 2015.

3.4 Cáncer de Mama Triple Negativo

El Cáncer de Mama Triple Negativo (CaM-TN) es de tipo basal, presenta un fenotipo característico por la ausencia en la expresión de los receptores RE, RP y HER2, por tal motivo se utiliza el termino triple negativo y por carecer de estos receptores no es posible el uso de terapia específicas, como anti-hormonales, incluyendo inhibidores de la aromatasa o agentes terapéuticos contra HER2 (trastuzumab, Lapatinib), por lo que el tratamiento principal se reduce al uso de quimioterapia (Cleator et al., 2007; Hudis and Gianni, 2011; Irvin and Carey, 2008), radiación y cirugía (Newman et al., 2015), las cuales son terapias no específicas, con grandes efectos secundario y bajo pronóstico (Finn, 2008).

El cáncer de mama triple negativo tiene pronósticos desfavorables, presentando muy alto riesgo de invasión, formación de metástasis temprana y, por tanto, el tiempo de supervivencia de las pacientes suele ser corto.

Los tumores triple negativo presentan un recuento alto de mitosis, el contenido del estroma es escaso, necrosis central, márgenes de invasión, repuesta

del estroma linfoide y múltiples células apoptóticas, histológicamente son en gran parte ductal, incluyendo metaplásico, medular típico y atípico o carcinoma adenoide quístico (Irvin and Carey, 2008). Este cáncer causa metástasis visceral temprana. Actualmente se observan altas tasas de CaM-TN en mujeres jóvenes, en mujeres afroamericanas, esto podría estar asociado a mutaciones en la expresión de BRCA1 (Hudis and Gianni, 2011). Este subtipo se presenta en el 15-20% de todos los cánceres (Irvin and Carey, 2008).

Las alteraciones moleculares que conducen al desarrollo del CaM-TN no están bien definidas, aunque ha sido posible identificar una de las posibles causas de porque se ha dejado de expresar al RE- α , un estudio en células MDA-MB-231 demostró que, los factores de transcripción RE (Receptor de Estrógenos) factor 1 (REF-1) y RE-B factor 1 (REBF-1) son responsables de regular la expresión RE, debido a que se observó que estos dos factores han dejado de expresarse en esta línea celular, lo que podría explicar el porqué de la ausencia de este receptor en CaM-TN (Pinzone et al., 2004).

Por otra parte se han identificado otras proteínas involucradas en este tipo de cáncer (Finn, 2008); como la familia de proteínas tirosina cinasa que participan en procesos vitales en células normales y cancerosas como, cSrc que ha sido identificado en un estado activo en este CaM-TN (Chong et al., 2005; Finn et al., 2007).

3.5 Receptores de estrógenos

Como se mencionó anteriormente, la implicación que tienen los estrógenos en el desarrollo del cáncer está mediada por sus receptores. Estos receptores nucleares son miembros de la familia de factores de transcripción (Nieto et al., 2015); se han descrito dos tipos de receptores, el RE alfa (RE α) y el RE beta (RE β). Cabe mencionar que existen evidencias de la presencia de otro receptor, que ha sido identificado principalmente en células de cáncer de mama triple negativas (Girgert et al., 2014) este se encuentra asociado a la membrana, denominado GPER o GPR30 (Receptor de estrógenos acoplado a proteínas G o Receptor de 30 KDa acoplado a proteínas G) (Girgert et al., 2014; Lappano and Maggiolini, 2017).

Cada receptor está formado por una sola cadena de aminoácidos, de 565 y 530 aminoácidos para RE- α y RE- β respectivamente, los cuales son codificados por diferentes genes (Noriega and Langley, 2008), localizados en diferentes cromosomas 6q25.1 (RE α) y 14q22-24 (RE β) (Lindgren et al., 2004). Su expresión varía dependiendo del tipo de tejido; mientras que el RE- α es expresado predominantemente en órganos reproductivos (útero, mama y ovario) así como en el hígado y en el sistema nervioso central, el RE- β es expresado mayoritariamente en otros tejidos como hueso, endotelio, pulmones, tracto urogenital, ovario, sistema nervioso central (SNC) y próstata (Noriega and Langley, 2008).

Particularmente, el RE- α estimula la proliferación celular (Yue et al., 2010), mientras que el RE- β puede presentar efectos opuestos al RE- α , por lo que pudiera actuar como su regulador dominante negativo en el CaM (Hinsche et al., 2014; Wisinski et al., 2016) ya que en cánceres dependientes de estrógenos, el RE- α se encuentra mayormente expresado en comparación con el RE- β que generalmente se encuentra disminuido en este mismo tipo de cánceres (Shupnik, 2004; Anbalagan and Rowan, 2015; Hayes and Lewis-Wambi, 2015); mientras que en CaM-TN el RE- β está presente de 50 a 80% y el RE α en baja o nula expresión (Wisinski et al., 2016). La expresión del RE- β en CaM-TN está asociada a la disminución de la progresión e invasión del tumor, ya que algunos autores han descrito que este receptor tiene un papel antiproliferativo (Hinsche et al., 2014).

3.6 Cinasas de la familia Src

Estas proteínas, como se mencionó anteriormente, son muy importantes en múltiples procesos celulares, su clasificación corresponde a enzimas con actividad de tirosina cinasa que pertenecen a una misma familia. Los miembros de este grupo se denominan: cSrc (sarcoma), Blk (tirosina cinasa de linfocitos B), Fyn, Frk (cinastas relacionadas con Fyn), Hck (cinasa de células hematopoyéticas), Lck (cinasa específica de linfocitos), Lyn, Yes (sarcoma de Yamagichi), Yrk (cinasa relacionada con Yes). Interesantemente se ha observado que cSrc se encuentra asociada a oncogénesis debido a que se encuentra hiperactivada (Aleshin and Finn, 2010; Guarino, 2009; Patel et al., 2016). Sin embargo, también se ha observado su

expresión en células no cancerosas, incluyendo las neuronas, osteoclastos y plaquetas que son controladas por reguladores endógenos como la Cinasa del carboxilo terminal de cSrc o CSK (Chong et al., 2005; Guarino, 2009; Roskoski, 2004).

Cronológicamente, primero fue identificada la enzima vSrc, por Peyton Rous en 1911, como agente transformante de sarcoma en pollos (Finn, 2008); posteriormente fue descubierto el protooncogén cSrc en fibroblastos normales de pollo (Stehelin et al., 1976). Posteriormente, surgieron muchos datos acerca de la función de cSrc como proteína clave en muchas vías celulares importantes como proliferación, sobrevivencia, motilidad y angiogénesis (Finn, 2008).

La enzima cSrc, tiene una actividad de tirosina-cinasa, es un no-receptor que cataliza la transferencia del grupo fosfato terminal del ATP a tirosinas específicas en diversas proteínas. Esta modificación activa es una parte importante en la transducción de señales desde el medio extracelular en las vías intracelulares (Guarino, 2009). La importancia de cSrc en procesos celulares se debe a su participación en proliferación, motilidad, metástasis (Chu et al., 2007), sobrevivencia, diferenciación (Roskoski, 2005) y angiogénesis (Mayer and Krop, 2010).

cSrc puede ser activada por otras proteínas citoplasmáticas como la cinasa de adhesión focal (FAK) o su sustrato molecular asociado a Crk (CAS), los cuales juegan un papel importante en la señalización de las integrinas, y en la activación de los receptores de la superficie celular, EGFR o HER-1 (Anbalagan et al., 2012; Finn, 2008; Gucalp et al., 2011). Por otro lado, la proteína cSrc también puede ser activada a través de la unión del RE- α a la región SH2 de está cinasa lo que induce a su autofosforilación (Chu et al., 2007; Shupnik, 2004). Para que se lleve a cabo la activación de cSrc es importante que primero se realice la desfosforilación en la tirosina 527, mediada por la proteína fosfatasa tirosina alfa (RPTP α), lo que permite la consecuente fosforilación o autofosforilación de la tirosina 416 lo que finalmente resulta en la activación de cSrc (Maruyama et al., 2004; Patel et al., 2016).

La proteína cSrc tiene un peso molecular de 60 KDa y presenta un sitio de miristilación (M) denominado SH4, es decir se puede unir a un ácido mirístico que facilita su anclaje a la membrana, además de tener 2 a 3 dominios homólogos a Src (SH2, SH3) estos dominios el primero le permite reconocer sitios fosforilados, mientras que SH3 reconoce sitios ricos en prolina, el dominio catalítico y un residuo tirosina (Y530), cerca del dominio C-terminal que actúa como regulador negativo en humanos (Figura 3) (Finn, 2008; Liu and Feng, 2010).



Figura 3. Estructura de la proteína Src con sus diferentes dominios. Los residuos de tirosina (Y416 y Y527) que pueden ser fosforilados/desfosforilados para modificar su actividad. Tomado de Finn, 2008.

4. Antecedentes

Existen líneas celulares de CaM humano triple negativo, como MDA-MB-231, MDA-MB-157 y MDA-MB-468 que han dejado de expresar los RE, RP y HER2, en las cuales se ha observado niveles elevados de la proteína cSrc (Anbalagan et al., 2012), por lo que se han buscado fármacos cuyo efecto sea más específicos para inhibir esta cinasa.

La cinasa cSrc al ser una proteína de gran importancia para las células, ha sido una de las más estudiadas debido a su implicación en la oncogénesis (Aleshin and Finn, 2010) dado que se encuentra sobreactivada de forma constitutiva en cáncer (Guarino, 2009), y debido a su participación en procesos celulares como proliferación, diferenciación, migración, angiogénesis, sobrevivencia, cSrc se ha convertido en un blanco terapéutico en cáncer (Finn, 2008; Sánchez-Bailón et al., 2012).

Existen algunos inhibidores de cSrc sin embargo han demostrado una baja actividad en los estudios clínicos, Anbalagan y colaboradores., (2012) estudiaron, en las líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB-231, MDA-MB-157 y MDA-MB-468), el uso de peptidomiméticos (péptidos que interactúan con los sitios activos de las enzimas) para inhibir a cSrc y los denominaron KX-01 (KX2-391). Este fármaco presenta una actividad dual, al inhibir la actividad de cSrc e interrumpir los microtúbulos en el CaM-TN, presentando mejores resultados que aquellos componentes que solo inhiben a cSrc. Al utilizar las concentraciones de 1 y 5 mg/Kg de KX-01, por vía oral durante 28 días, en ratones inoculados con las líneas celulares de CaM-TN, midieron proliferación, apoptosis, migración, invasión y metástasis se observó que KX-01 inhibió la actividad de cSrc, reduciendo la proliferación celular e incrementando la apoptosis. Por otro lado cuando se utilizó en combinación con paclitaxel (quimioterapia), disminuyó significativamente la formación de tumores, inducidos por células MDA-MB-231, y la metástasis a pulmón e hígado. En esta misma línea celular, los tratamientos que mostraron mayor reducción del tumor (79 %) al grupo que se les administro 5mg/Kg, mientras que los que recibieron la dosis de 1mg/kg mostraron el 35.3% de reducción del tumor.

Mientras que el modelo donde se inocularon células MDA-MB-157 se observó una reducción del 23.5% y 42.0% para las dosis de 1mg/kg y 5mg/kg respectivamente (Anbalagan et al., 2012). Esto demuestra que el bloqueo de la cinasa cSrc, en combinación con un agente quimioterapéutico, potencian la reducción de tumores inducidos con células de cáncer de mama TN.

Antes del uso de los antagonistas de cSrc de tipo peptidomiméticos, se utilizaban inhibidores químicos los cuales compiten por los sitios de unión al ATP en el sitio catalítico de estas enzimas, entre estos inhibidores se encuentra PP2 o pirazole pirimidinil amina, (Chong et al., 2005; Maruyama et al., 2004). Se ha demostrado que el tratamiento de células MDA-MB-231 con 10 μ M de PP2 inhibe la proliferación celular a través de la disminución de la fosforilación de cSrc.

Por otra parte, se ha descrito otro mecanismo de inhibición de cSrc utilizando cSrc inactivo para disminuir los efectos mitogénicos de estrógenos a través de microinyecciones con plásmidos de cSrc inactivo dentro de células de cáncer de mama MCF-7 y T47D de mama para evitar la estimulación proliferativa del E₂ y progesterona (Castoria et al., 1999; Finn, 2008; Shupnik, 2004).

También se ha demostrado que el RE, mediante su hélice 12, puede interaccionar directamente con la secuencia SH2 de cSrc (Figura 4) (Nieto et al., 2015), lo que permite entender mejor su interacción con vías no genómicas, especialmente en el proceso de proliferación celular y migración, a través de vías de transducción de señales estudiadas en nuestro laboratorio (Jiménez-Salazar et al., 2014).

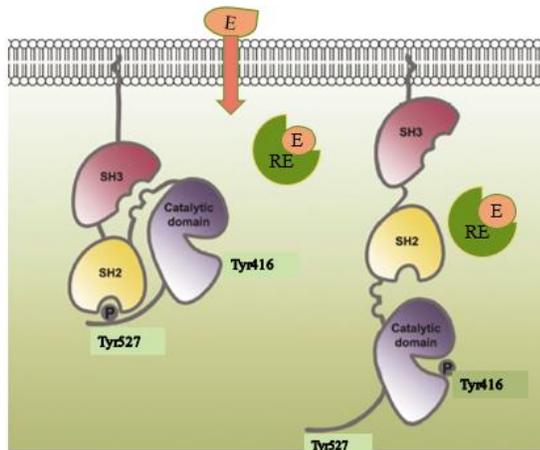


Figura 4. Representación esquemática de la forma activa e inactiva de cSrc, en la conformación cerrada de cSrc, la tirosina 527 (Tyr 527) se encuentra fosforilada y anclada al dominio SH2, mientras que en la activación la fosforilación ocurre en la tirosina 416 (Tyr416) y queda expuesto el dominio catalítico, y hay una interacción con el RE unido a su ligando en la región SH2 de cSrc. Modificado de Guarino, 2010.

Recientemente se ha reportado que cSrc puede inducir la degradación del RE- α , a través del proteosoma, en células de cáncer de mama humano MCF-7, BT-20, BT549 y MDA-MB-361 (Chu et al., 2007), por lo que este podría ser un mecanismo por el cual en CaM-TN se pierde la expresión del RE- α lo que conlleva a un aumento en la capacidad proliferativa y metastática (Sánchez-Bailón et al., 2012).

Por otro lado los blancos terapéuticos utilizados en pacientes con cáncer de mama están enfocados en tratamientos anti-hormonales o contra moléculas biológicas como HER2. Sin embargo, en CaM-TN debido a la ausencia de los receptores de estrógenos, progesterona y HER2, disminuyen las posibilidades de tratamiento que están dirigidos contra estas proteínas (Girgert et al., 2014).

5. Planteamiento del problema

Debido a el CaM-TN, se presenta con más frecuencia en mujeres jóvenes afroamericanas e hispanas, en comparación con la caucásicas o asiáticas (Amirikia et al., 2011), y al haber ausencia de los RE, RP y HER2, no se pueden utilizar tratamientos anti hormonales, por lo que los tratamientos mediante quimioterapia son más agresivos y menos específicos en estas pacientes.

Recientemente algunos grupos de investigación han sugerido un mecanismo por el cual se induce la re-expresión del RE- α (o evitar que se degrade), siendo a través de la inhibición de la proteína cSrc, lo que resultaría finalmente en el incremento en la cantidad de este receptor y su funcionalidad.

Con base en estas observaciones se ha planteado que el bloqueo químico de cSrc, utilizando PP2, pudiera inducir la re-expresión del RE- α en las células de CaM-TN, y con ello inhibir su proliferación, invasión y metástasis, lo que permitirá utilizar terapias más efectivas en pacientes con CaM-TN.

6. Pregunta de investigación

¿Qué efecto tendrá la inhibición química de la cinasa cSrc sobre la expresión del RE- α en células de cáncer de mama triple negativo, MDA-MB-231?

7. Hipótesis

Si la cinasa cSrc inhibe la expresión o induce la degradación del RE- α en células MDA-MB-231, entonces su inhibición química, mediante PP2, aumentará la cantidad del RE- α , tanto del ARNm como de la proteína.

8. Objetivo General

Analizar el efecto de la inhibición química de cSrc sobre la expresión y localización del RE- α en la línea celular de CaM-TN MDA-MB-231.

8.1 Objetivos Específicos

- Determinar el efecto de la inhibición de cSrc sobre la regulación del transcrito que codifica para el RE- α en células de cáncer de mama MDA-MB-231.
- Analizar el efecto de la inhibición de cSrc sobre la presencia de la proteína del RE- α , en estas líneas celulares.
- Analizar el efecto de la inhibición de cSrc sobre la localización de la proteína del RE- α , en estas líneas celulares.

9. Material y Métodos

9.1 Líneas celulares

Se utilizaron las líneas celulares de carcinoma mamario humano MDA-MB-231 (negativas a ER, PR y HER2) que fueron obtenidas de la compañía American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA); y la línea celular de cáncer de mama MCF-7 (positivas al RE- α), que fueron obtenidas del Instituto Nacional de Cancerología, México, estas últimas se utilizaron como control positivo.

9.2 Reactivos

Los medios y complementos para cultivo celular se obtuvieron de Life Technologies (Gaithersburg MD, EUA): Medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM); suero fetal bovino (SFB; Gibco BRL); antibióticos (penicilina, estreptomycin) y de antimicótico (anfotericina B), piruvato de sodio, L-glutamina. El método de extracción de ARN es mediante Trizol (Reagent). Los reactivos de la transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) son de Applied Biosystems (Roche). Los anticuerpos de Santa Cruz Biotechnology. El inhibidor químico de cSrc de Invitrogen (Pirazol pirimidina PP2, Ref. PHZ1223).

9.3 Cultivo celular

Las células MDA-MB-231 y MCF-7 se incubaron en medio DMEM libre de rojo fenol, esterilizado por filtración en membranas de nylon con poro de 0.22 μ m (Corning, NY, EUA), pH 7.4 y SFB al 2.5%, L-glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales (100 mM), piruvato de sodio a una concentración final de 100 mM, penicilina 100 U / mL, estreptomycin 100 mg / ml y antimicótico (anfotericina B 250 ng / mL). En una atmósfera de 5% de CO₂ a 37 ° C.

9.3.1 Tratamientos

Para los tratamientos se sembraron (2x10⁶ células por caja de cultivo) (Corning) MDA-MB-231, y se incubaron hasta que alcanzaron una alta confluencia (5x10⁶ aproximadamente). Una vez alcanzada esta confluencia las células fueron

incubadas con el inhibidor químico de cSrc, PP2 (5 μ M) y como vehículo se utilizó 0.01 % DMSO. Los tiempos de incubación fueron 12, 24, o 48 h.

9.4 Análisis de la expresión del ARNm que codifica para el RE- α

9.4.1 Extracción de ARN mediante la técnica de TRIZOL

Para la extracción del RNA se sembraron (2×10^6 células por caja de cultivo) (Corning, 100mmx20mm, capacidad 10 mL), hasta alcanzar alta confluencia, para después ser incubadas con PP2 y vehículo como control en las concentraciones y periodos de tiempo descritos anteriormente. Se desechó el medio y se le agregaron 800 μ L de Trizol, se incubó por 5 min en cama de hielo para posteriormente raspar con un gendarme, se recuperó en un tubo de 1.5 mL y se agito vigorosamente por un minuto en vortex 2 veces, se agregaron 200 μ L de cloroformo y se centrifugaron a 12,000 g por 15 min, se recuperó el sobrenadante acuoso en un nuevo tubo de 1.5 mL, se le adicionaron 500 μ L de Isopropanol y se incubó por 1 h a 4°C, posteriormente se centrifugó a 12,000 g por 10 min, se decantó el sobrenadante y se agregó 1mL de etanol al 75% y se centrifugó a 75,00 g por 5 min, se decantó sobrenadante y el pellet se resuspendio en 100 μ L de H₂O libre de nucleasas.

9.4.2 Análisis de la integridad del ARN

Se separó el ARN obtenido con base en su peso molecular mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.2% (Gibco BRL, grado Biología Molecular) conteniendo la solución amortiguadora de TBE (Tris Base, ácido bórico, EDTA y H₂O 1X en H₂O con DEPC (Dietil pirocarbonato, SIGMA, no. Cat. 1609-47-8). A cada muestra (5 μ L) se les adicionó 2.0 μ L de la solución de carga para ARN (30% glicerol, 0.1% azul de bromofenol y 0.1% xilencianol) y 0.2 μ L de la solución RED-GEL (Biotium). Una vez depositadas las muestras en los pozos del gel, éste se cubrió totalmente con TBE 1X y se llevó a corrimiento electroforético a 65 V por 1.2 h. Cuando el colorante de bajo peso molecular alcanzó las 2/3 partes de la longitud total del gel, se fotografió en un transiluminador de luz ultra violeta Gel Logic 200® (Kodak, EUA).

9.4.3 Expresión del ARNm mediante la técnica RT-PCR

Para el análisis de la expresión del gen que codifica a RE- α y β -actina (utilizada como gen de normalización) se utilizaron los siguientes cebadores diseñados mediante el programa PRIMER QUEST:

RE- α humano (NM_001437.2)

Sentido 5' ATGGTGCCTGAAAGAAGCA 3',

Antisentido 5' AATTGGTTGTGGCTGCGCTT 3',

β -Actina (NM_001101.3)

Sentido 5' CTGTGGCATCCACGAAACTA 3'

Antisentido 5' GATCCACATCTGCTGGAAGG 3'.

La síntesis y amplificación del ADNc se realizó mediante las técnicas de retro transcripción seguidas de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), se empleó el kit de amplificación RT/PCR Applied Biosystems (Roche) de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

Para llevar a cabo la retotranscripción se colocaron en un tubo estéril de 0.2 mL se colocaron los siguientes componentes:

0.5 μ L de H₂O libre de nucleasas, 0.6 μ L de MgCl₂, 2 μ L de la mezcla de dNTP's, Buffer de reacción 10X PCR, 0.25 μ L de la enzima MuL_v Transcriptasa Reversa, 0.25 μ L de inhibidor de ARNasa y 0.25 μ L de muestra de ARN.

Posteriormente llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se agregó 16.77 μ L de H₂O libre de nucleasas, 0.6 μ L de MgCl₂, 2 μ L de la mezcla de dNTP's, Buffer de reacción 10X PCR, 0.125 μ L de la enzima ampli Taq ADN polimerasa, 0.6 μ L de MgCl₂, 0.25 μ L de los cebadores Low y Up de RE- α y β -actina. Las condiciones que se utilizaron para la RT fueron una fase de 42°C por 15 min seguida de 99°C por 5 min; mientras que para la PCR RE- α la temperatura de desnaturalización del ADNc fue a 95°C por 30 segundos, seguida por la temperatura de alineación de los oligonucleótidos a 50°C por 30 segundos y una fase de

extensión a 72°C por 1 min, y finalmente para β -actina la temperatura de alineamiento que fue 55°C.

9.5 Análisis de la expresión de proteína RE- α mediante Western Blot

Las células que recibieron los tratamientos se resuspendieron en buffer de lisis (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 120 mM NaCl, 0,5% NP-40, 100 mM NaF, 0,2 mM NaVO₃, 1 ug / mL de aprotinina, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM, 1 g / mL de leupeptina), y se incubaron a 4 °C durante 5 a 10 min y se centrifugaron a 22.000 x g, 4 °C, durante 15 min. La concentración de proteína en el sobrenadante se determinó usando el método de Bradford (1976) BioRad (Hercules CA, USA). Los lisados celulares se separaron en geles al 10% de SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de Polivinil difluorometano (PVDF) (Invitrogen). Con la finalidad de evitar la unión inespecífica del anticuerpo primario en las membranas, estas fueron incubadas con solución de bloqueo (TBS: Tris-HCl y NaCl; pH: 7.6, 1x) Tween 20 (Sigma) 0.1% conteniendo 8% de leche sin grasa) por 2 h después del bloqueo y a continuación fueron incubadas con el anticuerpo primario anti-RE- α (Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, USA, no. catalogo SC-542, a una concentración de 1:100) durante toda la noche (12 h) a 4°C. Después las membranas fueron incubadas con solución de bloqueo durante 1 h, posteriormente las membranas fueron lavadas en dos ocasiones con TBS Tween 0.1% e incubadas durante 2 h con el anticuerpo secundario anti conejo específico para RE- α (Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, USA, no. catálogo SC-2004, a una concentración de 1:100). Después se realizaron tres lavados consecutivos, y las membranas fueron reveladas mediante el reactivo comercial quimiolumincente Supersignal (Pierce Rockford IL, USA).

9.6 Expresión de la proteína RE- α por inmunocitofluorescencia

Las células MDA-MB-231 tratadas con 5 μ M de PP2 y DMSO como vehículo, se sembraron 300,000 en cubreobjetos durante 24 o 48 h, después se fijaron con Formalina Neutra al 4% durante 20 min, después de la fijación las células se permeabilizaron con Tween 20 al 1% en PBS (Buffer fosfato salino) durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente las células fueron incubadas con el anticuerpo primario anti RE- α conejo antihumano (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA; a una concentración de 1:100) por 1 h, después fueron lavadas con PBS e incubadas por 2 h con el anticuerpo secundario cabra-anti-ratón FITC (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA; a una concentración de 1:100). Después de esta incubación, las células fueron lavadas con PBS. Se montaron con medio de montaje y DAPI (2 ng/ μ L) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) para finalmente analizarlas en el microscopio confocal y se observaron en el microscopio confocal LSM-META-Zeiss Axioplan (Carl Zeiss).

9.7 Análisis estadístico

Todos los ensayos se realizaron por triplicado en al menos tres experimentos independientes. Los resultados se presentan como medias \pm DE. La estadística se realizó en el programa GraphPad Prism (San Diego, CA) mediante análisis t-Student. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0.05$.

10. Resultados

10.1 Estandarización de la técnica de RT-PCR para el RE- α

La técnica se estandarizó para analizar la expresión del RE- α . La temperatura óptima de amplificación se realizó mediante un gradiente de temperaturas de 48°C, 50°C, 52°C y 54°C. Cabe señalar que a medida que la temperatura es más elevada la alineación de los cebadores es más específica hasta que deja de generarse debido a que estos ya no se pueden unir a sus secuencias blanco.

El producto esperado del RE- α es de 250 pares de bases (pb) y la temperatura óptima fue de 52°C, ya que las bandas se muestran mejor definidas, aunque se pueden observar al menos tres productos inespecíficos (Figura 5).

ELECTROFORESIS DE LOS PRODUCTOS DE RT-PCR DEL RE- α DE CÉLULAS MCF7 OBTENIDOS POR GRADIENTE DE TEMPERATURAS

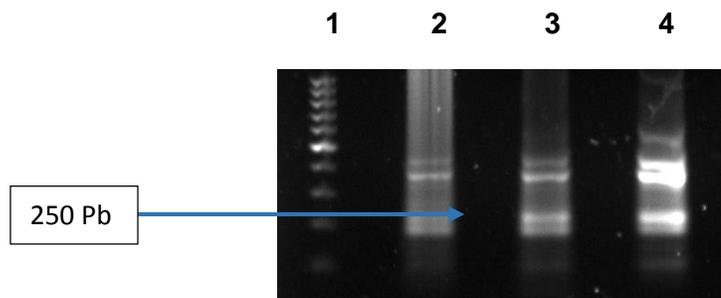


Figura 5: Electroforesis de los productos de RT-PCR del RE- α obtenidos mediante gradiente de temperaturas. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular de 100 pares de bases (pb), donde la banda más intensa corresponde a 500 pb. En los carriles 2 al 4 se muestran los productos formados a las temperaturas de alineación de 54, 52 y 50°C respectivamente. El producto esperado para el RE- α es de 250 pb.

Una vez determinada la temperatura óptima (52°C) y debido a que se formaban varios productos inespecíficos, se procedió a determinar la concentración de MgCl₂ donde se presente un solo producto de RT-PCR en el tamaño esperado. En la

Figura 6 se muestran los productos obtenidos utilizando diferentes concentraciones del cofactor. Como se puede apreciar en la figura 6 la concentración de 1.2 μM de MgCl_2 (carril 2) es la que genera el producto que corresponde al RE- α , con un peso molecular de 250 pb.

ELECTROFORESIS DE LOS PRODUCTOS DE RT-PCR DEL RE- α OBTENIDOS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE MgCl_2

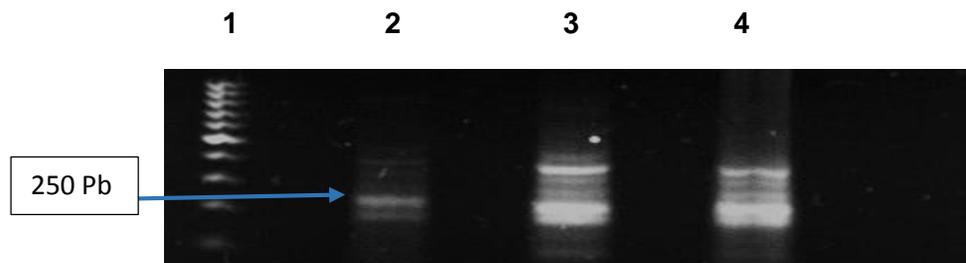


Figura 6. Electroforesis de los productos de RT-PCR del RE- α , obtenido utilizando diferentes concentraciones de MgCl_2 . En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular de 100 pb. En los carriles 2 al 4 se muestran los productos utilizando las concentraciones de 1.2, 1.6 μM y 2.4 μM de MgCl_2 .

10.2 Efecto del inhibidor de cSrc sobre la expresión del ARNm que codifica para al RE- α

Se extrajo ARN de las células MDA-MB-231 después de 24 h de incubación con el inhibidor de cSrc (PP2; 5 μM) o con el vehículo (DMSO) como testigo y de las células MCF-7 como control positivo del RE- α . Posteriormente se amplificó por RT-PCR de punto final el RE- α o la beta actina (como control de normalización). Los resultados se muestran en la Figura 7, donde se puede observar que se detecta la expresión del ARNm del RE- α en muy baja cantidad en las muestras de MDA-MB-231 en presencia o ausencia de PP2, en comparación con la expresión observada en las células MCF-7. En la imagen superior se muestra un gel representativo del

producto de PCR para el RE- α , mientras que en la imagen inferior el de normalización, que en este caso fue β -actina.

Cabe señalar que se pueden observar, de manera muy débil, dos bandas en las muestras de las células MDA-MB-231, principalmente en las incubadas con el vehículo. Esto puede ser debido a la presencia de isoformas del RE- α presentes en esta línea celular, lo cual concuerda con lo reportado por Bader y colaboradores (Al-Bader, 2011) en otras líneas celulares negativas para este receptor como SK-BR3, MDA-MB-453 y HCC1954.

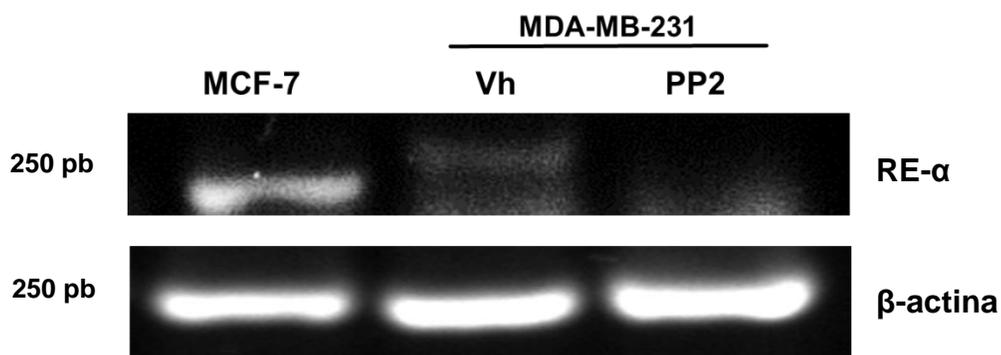


Figura 7. Expresión del ARNm que codifica para el RE- α (superior) y β -actina (inferior) que se utilizó como gen de normalización. Los productos de RT-PCR se separaron en geles de agarosa al 1% y en ambos casos el producto esperado es de 250 pb.

10.3 Efecto del inhibidor de cSrc sobre la expresión de la proteína del RE- α mediante Western blot

Se extrajo proteína de las células MDA-MB-231, después de 24 o 48 h de tratamiento con PP2 y las células MCF-7 como control positivo. Las proteínas se analizaron mediante el inmunoanálisis tipo Western blot con la finalidad de observar y cuantificar la expresión de las proteínas del RE- α y de actina, esta última de normalización debido a que su expresión es constitutiva. En la figura 8 se observa la expresión del RE- α en las células que fueron incubadas con PP2 o DMSO, así como la expresada en las células MCF-7. Los resultados señalan que no hay diferencias entre el tratamiento con PP2 y el vehículo.

En las densitometrías (Gráfica 1) se observó que la incubación con PP2 durante 48 h no genera diferencias significativas en la expresión de la proteína del RE- α en las células MDA-MB-213.

EFFECTO DE PP2 SOBRE LA PRESENCIA DE LA PROTEÍNA RE- α EN CÉLULAS MDA-MB-231

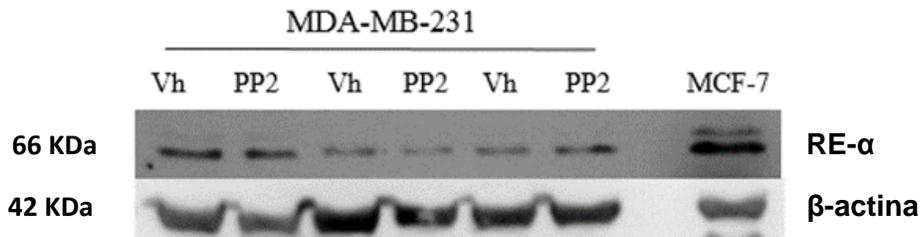
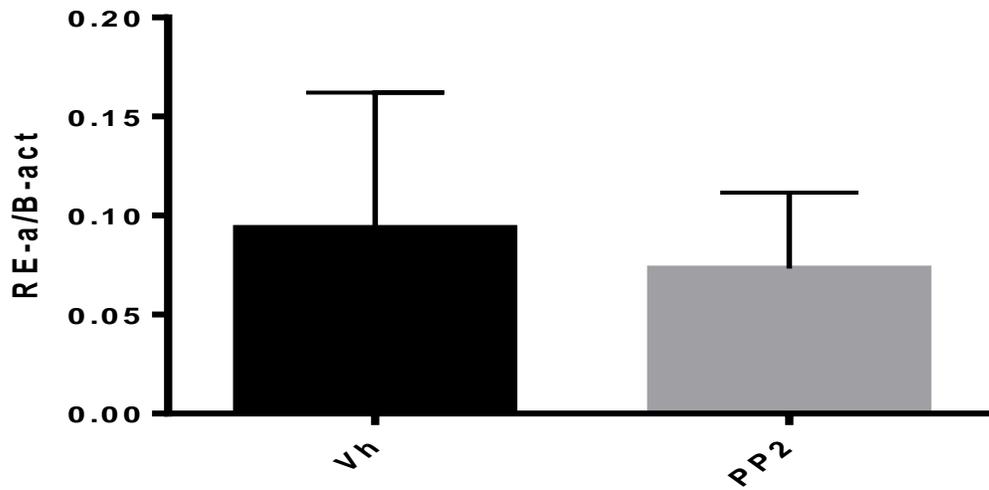


Figura 8. Efecto de PP2 sobre la Expresión de la proteína RE- α en células MDA-MB-231. La figura muestra las bandas de la proteína de interés RE- α con un peso molecular de 66 KDa y la proteína β -Actina con un peso molecular de 42 KDa: Las células fueron incubadas con el inhibidor de cSrc (PP2; 5 μ M) o con DMSO (vehículo; Vh) durante 48 h. Gel representativo de tres experimentos independientes.



Gráfica 1. Cociente de los valores obtenidos mediante densitometría del RE- α y de β -Actina. Las células MDA-MB-231 fueron incubadas con PP2 o con vehículo (Vh). La gráfica representa el promedio de 3 experimentos independientes realizados por triplicado y las barras de dispersión representan la desviación estándar. No existe diferencia significativa entre grupos dado que $p < 0.05$, mediante la prueba estadística de t de Student.

10.4 Efecto del inhibidor de cSrc sobre la expresión de la proteína del RE- α mediante Inmunofluorescencia

Posteriormente se realizó la técnica de inmunofluorescencia para corroborar el efecto de PP2 sobre la presencia del RE- α . La técnica se estandarizó utilizando la línea celular MCF-7, que son positivas a dicho receptor. En la figura 9 se muestran las imágenes obtenidas por microscopía confocal de barrido láser donde se observa la presencia del receptor (FITC, verde) en las células MCF-7, mientras que los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Dado que el medio carece de estrógenos, el RE- α se observa principalmente en el citoplasma de las células.

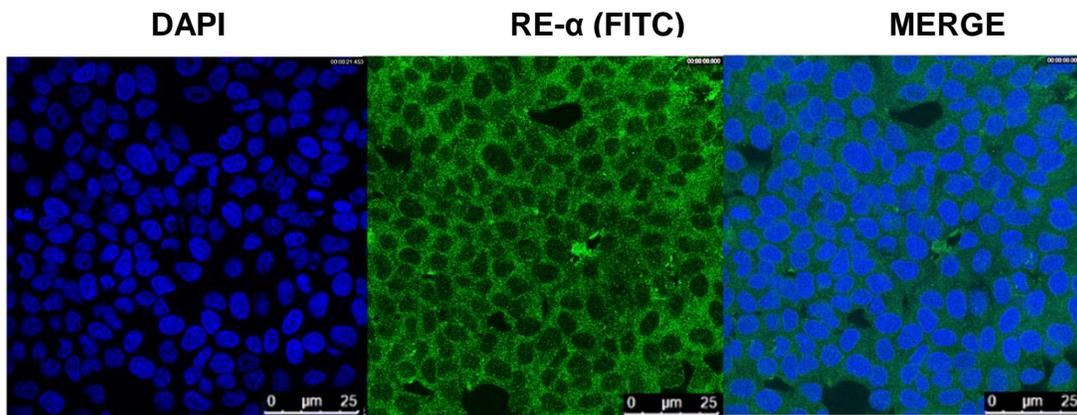


Figura 9. Expresión de la proteína RE- α determinado por inmunofluorescencia en células MCF-7, cultivadas a una alta confluencia, que fueron utilizadas como control positivo. En la imagen izquierda se muestran los núcleos teñidos de DAPI, en la imagen central el RE- α en verde (anticuerpo secundario marcado con FITC), en la imagen derecha la sobre posición de las dos imágenes anteriores. Las imágenes fueron tomadas en el microscopio confocal del Departamento de Embriología, Facultad de Medicina de la UNAM, con la colaboración de la M. en C. María José Gomorra Herrera. Las barras en cada microfotografía representan 25 μ m.

En la Figura 10 se observan células de la línea MDA-MB-231 incubadas con DMSO o con PP2 durante 24 h. Si bien se observa presencia del RE- α en las células MDA-MB-231. No hay diferencias significativas aparentes entre la expresión del RE- α en las células MDA-MB-231 en ausencia o presencia del inhibidor de cSrc. Otro aspecto importante es que el número de células MDA-MB-231 incubadas con PP2 disminuyó de manera evidente, lo cual puede sugerir un efecto citotóxico de este compuesto.

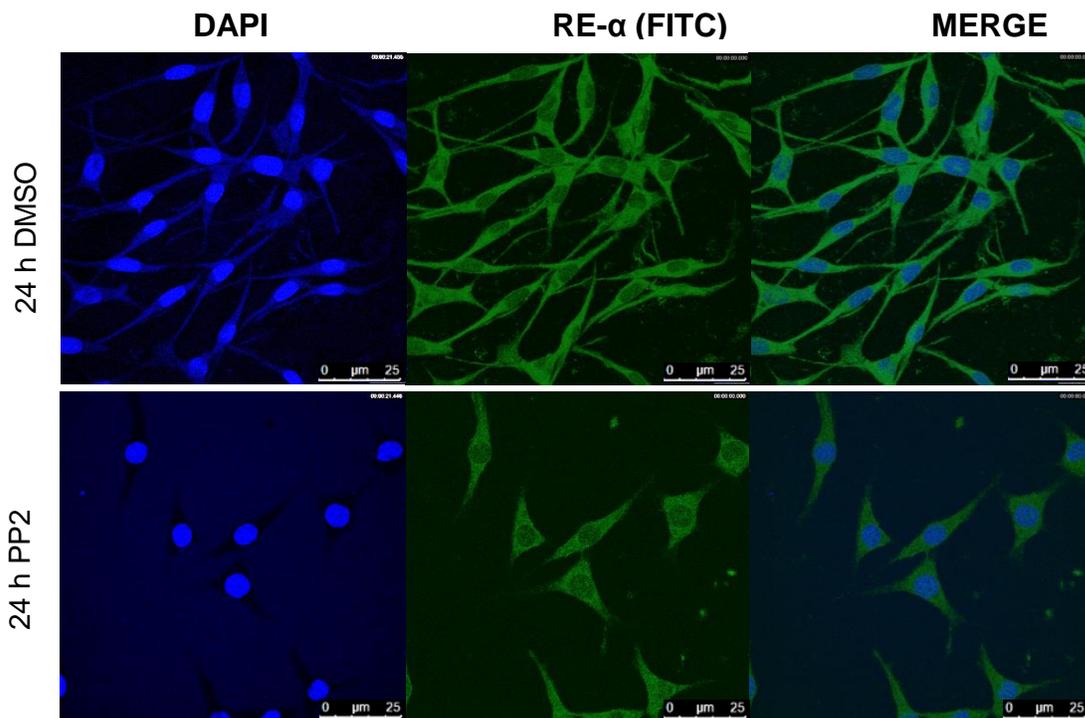


Figura 10. Expresión de la proteína RE- α , por inmunofluorescencia en células MDA-MB-231 incubadas con DMSO, como vehículo (superior), o con PP2 (inferior) durante 24 h. En la imagen superior izquierda se muestran los núcleos teñidos con DAPI (azul), en la superior central el RE- α en verde (anticuerpo secundario acoplado a FITC), y en la imagen superior derecha muestra la superposición de imágenes. En la parte inferior se muestran campos representativos de las células incubadas con 5 μ M de PP2. Las imágenes fueron tomadas en el microscopio confocal del Departamento de Embriología, Facultad de Medicina de la UNAM, con la colaboración de la M. en C. María José Gomorra Herrera. Las barras en cada microfotografía representan 25 μ m.

En la Figura 11 se observa el efecto del inhibidor específico para de cSrc, PP2, después de 48 h de exposición en células MDA-MB-231. Al igual que en la incubación durante 24 h, no hay diferencias aparentes entre las células control y las experimentales lo cual sugiere que el bloqueo con PP2 no incrementa la cantidad del RE- α .

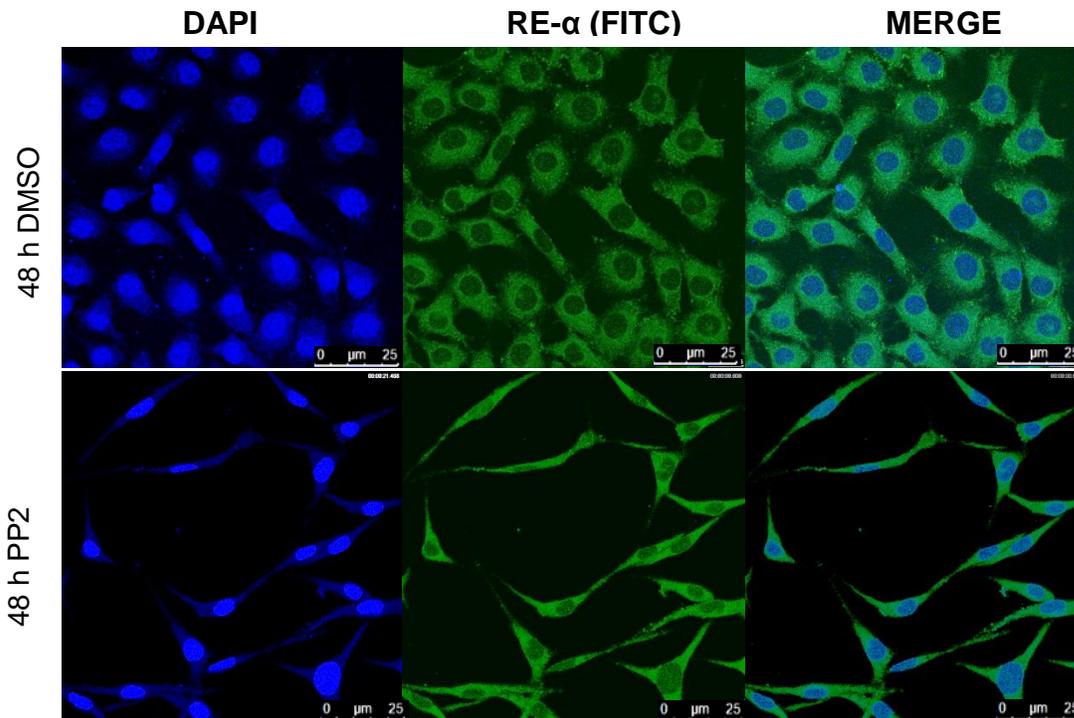


Figura 11. Expresión de la proteína RE- α , por inmunofluorescencia en células MDA-MB-231 incubadas con DMSO, como vehículo (superior), o con PP2 (inferior) durante 48 h. En las imágenes de la izquierda se muestran los núcleos teñidos con DAPI, en el los páneles centrales la presencia el RE- α y en las imágenes derecha el traslape. Las imágenes fueron tomadas en el microscopio confocal del Departamento de Embriología, Facultad de Medicina de la UNAM, con la colaboración de la M. en C. María José Gomorra Herrera. Las barras en cada microfotografía representan 25 μm .

11. Discusión

El CaM representa un problema grave de salud pública en México y en el mundo. Recientemente se ha convertido en un problema mayor, el reporte de casos de CaM del tipo triple negativo, ya que es más agresivo y se cuenta con menos herramientas para atacarlo. A partir de reportes donde se señala que la cinasa cSrc regula negativamente al RE- α , decidimos analizar el efecto del bloqueo químico de esta enzima para determinar, por diferentes técnicas, el efecto sobre el aumento en la expresión del RE- α .

En el presente estudio utilizamos la línea celular MDA-MB-231 como modelo de CaM-TN, debido a que es negativa para los RE- α , RP y HER2 (Anbalagan et al., 2012). Un aspecto importante de mencionar es que se demostró la presencia del RE- α , tanto a nivel del ARNm como de la proteína, mediante RT-PCR, inmunofluorescencia y Western Blot, una menor cantidad que la detectada en las células MCF-7 (positivas al RE- α). Estos resultados concuerdan con los reportados por Ford *et al.*, (2011) tanto en la expresión del RE- α como en la localización de la proteína, principalmente en el citoplasma. En este estudio se reporta que, además de las células MDA-MB-231, también presentaron positividad al RE- α las líneas celulares MDA-MB-453, HCC1954 y SK-BR-3, de CaM-TN.

En cuanto a la presencia de RNAm que codifica para RE- α , se detectaron dos bandas con muy baja intensidad, lo que puede hacer referencia a formas moleculares de diferente peso. Otros autores (Chu et al., 2007) también han detectado la expresión del RE- α en otras líneas celulares de CaM-TN (BT-20 y BT520), lo cual sugiere que su velocidad de síntesis es baja, la de degradación es alta o ambas, con lo cual el resultado neto es la pérdida de la función biológica de este receptor.

En el caso del análisis del ARNm que codifica para el RE- α , mediante RT-PCR, se diseñaron cebadores que amplifican al dominio AF1, cercano al N-terminal, región con menor homología con respecto al RE- β (17%). Cabe señalar que se han reportado diferentes variantes truncadas del RE- α , que pudieran corresponder a dicho amplicón; sin embargo, dado que no hay diferencias en la expresión en

ausencia y presencia del inhibidor de cSrc, además de que la cantidad de los productos obtenidos fue muy baja, no se realizó la secuenciación correspondiente.

Por otro lado, mediante las técnicas de inmunofluorescencia y Western Blot se comprobó que la inhibición de cSrc (PP2; 5 μ M) no incrementa la presencia del RE- α en células MDA-MB-231, incubadas durante 24 o 48 h. Esto contrasta con lo reportado en otros estudios que demuestran que la incubación con PP1 incrementa la concentración del RE- α en células MCF-7, proponiendo que es debido a que se inhibe la degradación del RE- α por el proteosoma, dependiente de cSrc (Chue *et al.*, 2007). Estos resultados son compatibles si se considera que la cantidad de la proteína RE- α que se sintetiza en las células MCF-7 es detectable con la técnica de Western blot convencional, pero en las células MDA-MB-231 la síntesis es muy baja, por lo que la inhibición de la degradación por el proteosoma no puede verse reflejado en un incremento neto.

Un efecto observado al incubar las células MDA-MB-231 con PP2, especialmente durante 48 h, es la disminución evidente en el número de células y su elongamiento, que coincide con lo reportado por Sánchez-Bailón y col. (2012) usando las mismas condiciones. Lo que sugiere que la inhibición de la cinasa cSrc, mediante el inhibidor PP2 podría tener efectos citotóxicos en nuestro modelo de cáncer de mama triple negativo.

12. Conclusión

El Cáncer de Mama Triple Negativo representa un problema con pocas soluciones, debido a la dificultad para atacarlo con terapias específicas.

En el presente trabajo, la búsqueda de la inhibición de cSrc mediante PP2 en las células MDA-MB-231 no induce diferencias significativas en la expresión del RE- α con respecto al control, ni tampoco genera cambios en la proteína después de 24 o 48 h de tratamiento.

Sin embargo, el tratamiento indujo un cambio morfológico y una disminución en el número de células MDA-MB-231 que fueron incubadas con PP2 a las 48 h, lo que sugiere un efecto citotóxico de PP2, por lo que su uso sigue siendo experimental.

13. Perspectivas

Dado que PP2 inhibe tanto a cSrc y a otros miembros de esta familia de cinasas, se podría considerar utilizar peptidomiméticos exclusivos de cSrc con la finalidad de corroborar estos resultados.

Finalmente es necesario seguir estudiando posibles tratamientos contra el CaM-TN para atacarlo de manera eficiente y con menos efectos secundarios, como sucede con la quimioterapia.

14. Bibliografía

1. Al-Bader, M. (2011). Analysis of estrogen receptor isoforms and variants in breast cancer cell lines. *Exp. Ther. Med.*
2. Aleshin, A., and Finn, R.S. (2010). SRC: A Century of Science Brought to the Clinic. *Neoplasia* 12, 599–607.
3. Amirikia, K.C., Mills, P., Bush, J., and Newman, L.A. (2011). Higher population-based incidence rates of triple-negative breast cancer among young African-American women: Implications for breast cancer screening recommendations. *Cancer* 117, 2747–2753.
4. Anbalagan, M., and Rowan, B.G. (2015). Estrogen receptor alpha phosphorylation and its functional impact in human breast cancer. *Mol. Cell. Endocrinol.* 418, 264–272.
5. Anbalagan, M., Ali, A., Jones, R.K., Marsden, C.G., Sheng, M., Carrier, L., Bu, Y., Hangauer, D., and Rowan, B.G. (2012). Peptidomimetic Src/Pretubulin Inhibitor KX-01 Alone and in Combination with Paclitaxel Suppresses Growth, Metastasis in Human ER/PR/HER2-Negative Tumor Xenografts. *Mol. Cancer Ther.* 11, 1936–1947.
6. Castoria, G., Barone, M.V., Di Domenico, M., Bilancio, A., Ametrano, D., Migliaccio, A., and Auricchio, F. (1999). Non-transcriptional action of oestradiol and progestin triggers DNA synthesis. *EMBO J.* 18, 2500–2510.
7. Chong, Y.-P., Ia, K.K., Mulhern, T.D., and Cheng, H.-C. (2005). Endogenous and synthetic inhibitors of the Src-family protein tyrosine kinases. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* 1754, 210–220.
8. Chu, I., Arnaout, A., Loiseau, S., Sun, J., Seth, A., McMahon, C., Chun, K., Hennessy, B., Mills, G.B., Nawaz, Z., et al. (2007). Src promotes estrogen-dependent estrogen receptor α proteolysis in human breast cancer. *J. Clin. Invest.* 117, 2205–2215.
9. Cleator, S., Heller, W., and Coombes, R.C. (2007). Triple-negative breast cancer: therapeutic options. *Lancet Oncol.* 8, 235–244.
10. DeSantis, C.E., Bray, F., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., Anderson, B.O., and Jemal, A. (2015). International Variation in Female Breast Cancer Incidence and Mortality Rates. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 24, 1495–1506.
11. Fakhrjou, A., Naghavi-Behzad, M., Montazeri, V., Karkon-Shayan, F., Norouzi-Panahi, L., and Piri, R. (2016). The relationship between histologic grades of invasive carcinoma of breast ducts and mast cell infiltration. *South Asian J. Cancer* 5, 5.

12. Finn, R.S. (2008). Targeting Src in breast cancer. *Ann. Oncol.* *19*, 1379–1386.
13. Finn, R.S., Dering, J., Ginther, C., Wilson, C.A., Glaspy, P., Tchekmedyian, N., and Slamon, D.J. (2007). Dasatinib, an orally active small molecule inhibitor of both the src and abl kinases, selectively inhibits growth of basal-type/triple-negative breast cancer cell lines growing in vitro. *Breast Cancer Res. Treat.* *105*, 319–326.
14. Ford, C.H.J., Al-Bader, M., Al-Ayadhi, B., and Francis, I. (2011). Reassessment of estrogen receptor expression in human breast cancer cell lines. *Anticancer Res.* *31*, 521–527.
15. García Mur, C., Cruz Ciria, S., and Castán Senar, A. (2015). Papel de la resonancia magnética de mama en la valoración de la respuesta a la neoadyuvancia. *Rev. Senol. Patol. Mamar.* *28*, 181–187.
16. Girgert, R., Emons, G., and Gröndker, C. (2014). Inhibition of GPR30 by estriol prevents growth stimulation of triple-negative breast cancer cells by 17 β -estradiol. *BMC Cancer* *14*.
17. Guarino, M. (2009). Src signaling in cancer invasion. *J. Cell. Physiol.* n/a – n/a.
18. Gucalp, A., Sparano, J.A., Caravelli, J., Santamauro, J., Patil, S., Abbruzzi, A., Pellegrino, C., Bromberg, J., Dang, C., Theodoulou, M., et al. (2011). Phase II Trial of Saracatinib (AZD0530), an Oral SRC-inhibitor for the Treatment of Patients with Hormone Receptor-negative Metastatic Breast Cancer. *Clin. Breast Cancer* *11*, 306–311.
19. Hayes, E.L., and Lewis-Wambi, J.S. (2015). Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer: an overview of the proposed roles of noncoding RNA. *Breast Cancer Res.* *17*, 40.
20. Hinsche, O., Girgert, R., Emons, G., and Gröndker, C. (2014). Estrogen receptor γ selective agonists reduce invasiveness of triple-negative breast cancer cells. *Int. J. Oncol.*
21. Hudis, C.A., and Gianni, L. (2011). Triple-Negative Breast Cancer: An Unmet Medical Need. *The Oncologist* *16*, 1–11.
22. Irvin, W.J., and Carey, L.A. (2008). What is triple-negative breast cancer? *Eur. J. Cancer* *44*, 2799–2805.
23. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Historia (INEGI). 2016. ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA MUNDIAL CONTRA EL CÁNCER (4 DE FEBRERO)”

24. Jiménez-Salazar, J.E., Posadas-Rodríguez, P., Lazzarini-Lechuga, R.C., Luna-López, A., Zentella-Dehesa, A., Gómez-Quiroz, L.E., Königsberg, M., Domínguez-Gómez, G., and Damián-Matsumura, P. (2014). Membrane-Initiated Estradiol Signaling of Epithelial-Mesenchymal Transition-Associated Mechanisms Through Regulation of Tight Junctions in Human Breast Cancer Cells. *Horm. Cancer* 5, 161–173.
25. Lappano, R., and Maggiolini, M. (2017). GPER is involved in the functional liaison between breast tumor cells and cancer-associated fibroblasts (CAFs). *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*
26. Lindgren, P.R., Cajander, S., Bäckström, T., Gustafsson, J.-Å., Mäkelä, S., and Olofsson, J.I. (2004). Estrogen and progesterone receptors in ovarian epithelial tumors. *Mol. Cell. Endocrinol.* 221, 97–104.
27. Liu, X., and Feng, R. (2010). Inhibition of epithelial to mesenchymal transition in metastatic breast carcinoma cells by c-Src suppression. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 42, 496–501.
28. Maruyama, T., Yamamoto, Y., Shimizu, A., Masuda, H., Sakai, N., Sakurai, R., Asada, H., and Yoshimura, Y. (2004). Pyrazolo Pyrimidine-Type Inhibitors of Src Family Tyrosine Kinases Promote Ovarian Steroid-Induced Differentiation of Human Endometrial Stromal Cells In Vitro¹. *Biol. Reprod.* 70, 214–221.
29. Mayer, E.L., and Krop, I.E. (2010). Advances in Targeting Src in the Treatment of Breast Cancer and Other Solid Malignancies. *Clin. Cancer Res.* 16, 3526–3532.
30. Newman, L.A., Reis-Filho, J.S., Morrow, M., Carey, L.A., and King, T.A. (2015). The 2014 Society of Surgical Oncology Susan G. Komen for the Cure Symposium: Triple-Negative Breast Cancer. *Ann. Surg. Oncol.* 22, 874–882.
31. Nieto, L., Tharun, I.M., Balk, M., Wienk, H., Boelens, R., Ottmann, C., Milroy, L.-G., and Brunsveld, L. (2015). Estrogen Receptor Folding Modulates cSrc Kinase SH2 Interaction via a Helical Binding Mode. *ACS Chem. Biol.* 10, 2624–2632.
32. Oliveira, N.C.S., Gomig, T.H.B., Milioli, H.H., Cordeiro, F., Costa, G.G., Urban, C.A., Lima, R.S., Cavalli, I.J., and Ribeiro, E.M.S.F. (2016). Comparative proteomic analysis of ductal and lobular invasive breast carcinoma. *Genet. Mol. Res.* 15.
33. Patel, A., Sabbineni, H., Clarke, A., and Somanath, P.R. (2016). Novel roles of Src in cancer cell epithelial-to-mesenchymal transition, vascular permeability, microinvasion and metastasis. *Life Sci.* 157, 52–61.

34. Pinzone, J.J., Stevenson, H., Strobl, J.S., and Berg, P.E. (2004). Molecular and Cellular Determinants of Estrogen Receptor Expression. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 4605–4612.
35. Roskoski, R. (2004). Src protein–tyrosine kinase structure and regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *324*, 1155–1164.
36. Roskoski, R. (2005). Src kinase regulation by phosphorylation and dephosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *331*, 1–14.
37. Sánchez-Bailón, M.P., Calcabrini, A., Gómez-Domínguez, D., Morte, B., Martín-Forero, E., Gómez-López, G., Molinari, A., Wagner, K.-U., and Martín-Pérez, J. (2012). Src kinases catalytic activity regulates proliferation, migration and invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cell. Signal.* *24*, 1276–1286.
38. Sawyer, E., Roylance, R., Petridis, C., Brook, M.N., Nowinski, S., Papouli, E., Fletcher, O., Pinder, S., Hanby, A., Kohut, K., et al. (2014). Genetic Predisposition to In Situ and Invasive Lobular Carcinoma of the Breast. *PLoS Genet.* *10*, e1004285.
39. Shupnik, M.A. (2004). Crosstalk between steroid receptors and the c-Src-receptor tyrosine kinase pathways: implications for cell proliferation. *Oncogene* *23*, 7979–7989.
40. Stehelin, D., Varmus, H.E., Bishop, J.M., and Vogt, P.K. (1976). DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* *260*, 170–173.
41. Torre, L.A., Bray, F., Siegel, R.L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., and Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012: Global Cancer Statistics, 2012. *CA. Cancer J. Clin.* *65*, 87–108.
42. Toss, A., and Cristofanilli, M. (2015). Molecular characterization and targeted therapeutic approaches in breast cancer. *Breast Cancer Res.* *17*.
43. Wisinski, K.B., Xu, W., Tevaarwerk, A.J., Saha, S., Kim, K., Traynor, A., Dietrich, L., Hegeman, R., Patel, D., Blank, J., et al. (2016). Targeting Estrogen Receptor Beta in a Phase 2 Study of High-Dose Estradiol in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer: A Wisconsin Oncology Network Study. *Clin. Breast Cancer.*
44. Yue, W., Wang, J.-P., Li, Y., Fan, P., Liu, G., Zhang, N., Conaway, M., Wang, H., Korach, K.S., Bocchinfuso, W., et al. (2010). Effects of estrogen on breast cancer development: Role of estrogen receptor independent mechanisms. *Int. J. Cancer* *127*, 1748–1757.

45. Yue, W., Yager, J.D., Wang, J.-P., Jupe, E.R., and Santen, R.J. (2013). Estrogen receptor-dependent and independent mechanisms of breast cancer carcinogenesis. *Steroids* 78, 161–170.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00047

Matrícula: 2153803726

EFFECTO DEL BLOQUEO DE LA
CINASA cSRC SOBRE LA
EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE
ESTRÓGENOS ALFA EN CÉLULAS
DE CÁNCER DE MAMA TRIPLE
NEGATIVAS

En la Ciudad de México, se presentaron a las 13:00 horas del día 17 del mes de noviembre del año 2017 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. JAVIER ESTEBAN JIMENEZ SALAZAR
DRA. MINA KONIGSBERG FAINSTEIN
DRA. NORMA EDITH LOPEZ DIAZ GUERRERO
DRA. MARIA GUADALUPE ISABEL DOMINGUEZ GOMEZ

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL

DE: MARTHA LIZZETE OCAMPO VALDEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



MARTHA LIZZETE OCAMPO VALDEZ
ALUMNA

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTE

DR. JAVIER ESTEBAN JIMENEZ SALAZAR

VOCAL

DRA. MINA KONIGSBERG FAINSTEIN

VOCAL

DRA. NORMA EDITH LOPEZ DIAZ GUERRERO

SECRETARIA

DRA. MARIA GUADALUPE ISABEL
DOMINGUEZ GOMEZ