

ESTUDIO DE LAS CÉLULAS CANCEROSAS Y SU ACTIVACIÓN CELULAR EN EL CÁNCER DE MAMA*

López-Naranjo, F**¹, Ávila-Álvarez, E. P¹, Guadarrama-Flores, B²,
Córdova-Moreno, R¹, Hernández-Rodríguez, N. A³.

¹División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Departamento de Sistemas Biológicos. Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Xochimilco (UAM-X).

²Laboratorio de Bioquímica y Biotecnología Enzimática. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular A (DBBMA). Facultad de Veterinaria. E-30100 Espinardo. Universidad de Murcia (UM), España.

³Laboratorio de Transducción de señales. División de Investigación Clínica. Instituto Nacional de Cancerología.

**Correspondencia: correo E: flopez@correo.xoc.uam.mx

RESUMEN

En México se diagnostican 25 nuevos casos de cáncer de mama (tasa de incidencia de 100.000 mujeres mayores a 25 años). La principal causa de muerte por cáncer es la metástasis, donde la trombina y su receptor PAR1, constituyen un sistema factor de crecimiento/receptor relevante en el proceso invasivo del cáncer. El objetivo de este estudio fue determinar la actividad de las ERKs en relación al potencial invasivo de dos líneas celulares de cáncer de mama asociado a la expresión del receptor PAR1 de trombina, y conocer la contribución específica de las MAP cinasas como inhibidor específico. En las dos líneas celulares se encontró un incremento significativo de ERK2. Esto sugiere que las diferencias entre la activación de las isoformas de ERKs, podría evidenciar algún tipo de regulación entre ellas.

PALABRAS

CLAVE:

Cáncer de mama, PAR, MAP cinasas.

ABSTRACT

25 new cases of breast cancer (death rate of 100,000 women over 25 years) are diagnosed in Mexico. The leading cause of death by cancer is metastasis, where Thrombin and its receptor, PAR1, constitute a system relevant receptor/growth factor in the invasive cancer process. The objective of this study was to determine the activity of the ERKs in relation to the invasive potential of two cell lines of breast cancer associated with the expression of Thrombin receptor PAR1, and know the contribution specified in the MAP kinase inhibitor specific. A significant increase of ERK2 were found in the two cell lines. This suggests that the differences between the activation of ERKs isoforms, could reveal some type of regulation among them.

KEY WORDS:

Breast cancer, PAR, MAP kinases.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama, es el cáncer más común entre las mujeres con casi 1.7 millones de casos diagnosticados en 2012, esto representa 1 de cada 3 cánceres detectados en pacientes femeninas (1,2). Su evolución es compleja y a pesar de los avances en los tratamientos oncológicos en México, la tasa de incidencia en 2014 fue de 28.75 casos nuevos por cada 100 mil mujeres de 20 años y más, la tasa de mortalidad de mujeres mayores a 25 años, a consecuencia de cáncer de mama ascendió a 100

mil entre 2002 y 2011, lo que equivale al diagnóstico de 25 nuevos casos diarios de este tipo de neoplasia (3). Una de las principales causas de mortalidad por cáncer es la metástasis (4). La tasa de mortalidad en México se ha incrementando, el Instituto Nacional de Estadística y Geografía e Informática (INEGI) reportó que en 2016 se presentaron 16 defunciones por cada 100 mil mujeres de 20 años y más; por lo tanto en nuestro país a nivel legislativo se han promovido cambios en los procesos médico sanitarios para tratar de contener esta tendencia, la Norma Oficial Mexicana NOM-

041-SSA2-2011 para la prevención, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer de mama, propone tres medidas de detección: la autoexploración, el examen clínico de las mamas y la mastografía (5).

La autoexploración es cuestión de conciencia poblacional, se debe realizar a partir de los 20 años; el examen clínico a partir de los 25 años y la mastografía entre los 40 a los 69 años; esto dependerá de los antecedentes clínicos familiares, se recomiendan los estudios cada dos años. Aunque esta situación se puede atender en cualquier momento que la paciente detecte indicios de alteraciones en sus senos y/o ganglios linfáticos debajo del brazo (Diario Oficial de la Federación [DOF], 2011). La metástasis es un proceso de múltiples etapas que implica la difusión de las células cancerosas de un tumor primario a órganos distantes (6). Algunos ejemplos de biomarcadores son glucoproteínas que debido a su falta de sensibilidad y especificidad diagnósticas, no sirven para la detección del cáncer en los estadios iniciales de la enfermedad, su concentración se dispara en presencia de células cancerosas y se relaciona directamente con el tamaño del tumor, varias sustancias se clasifican como biomarcadores tumorales, los cuales pueden ser producidos por el tumor o estar asociados a este (antígenos, enzimas, proteínas específicas y metabolitos) también depende de los antecedentes patológico tumorales de la familia, son detectables en diferentes fluidos biológicos (7). El PAR-1 es el receptor principal de trombina en las plaquetas y produce la activación de la plaqueta con concentraciones bajas de trombina (EC₅₀, 50pM), mientras que PAR-4 necesita concentraciones de trombina mayores (EC₅₀, 5.000pM). Se ha encontrado que los receptores activados por proteasas (PAR), están implicados de manera importante en el desarrollo del cáncer de mama, ya que se expresa en fibroblastos relacionados con la metástasis, en vasos sanguíneos, miocitos, y macrófagos en el microambiente tumoral (8).

Independientemente de la impactante situación emocional de las pacientes y su familia, el sector salud nacional reportó en el año 2002, que la carga socio económica anual promedio fue de \$ 110 459, esto varía con el grado de avance del cáncer mamario: para las mujeres diagnosticadas en la estadio I tuvo un costo de \$ 74 522, mientras que para el estadio II fue de \$102 042, \$ 154 018 en el estadio III y de \$ 199 274 en el estadio IV, es decir que conforme avanza el estadio de la enfermedad así se incrementarán los gastos de su atención médica. Diversos estudios realizados sobre el costo de la atención del cáncer de mama señalan que la detección temprana y oportuna es

la alternativa más efectiva en términos del costo (9).

Las MAP cinasas no se encuentran asociadas directamente con el receptor membranal, necesitan activarse por componentes intermediarios cuya actividad sí puede depender del propio receptor; en modelos animales se ha demostrado que la activación de PAR1 aumenta muchas veces la temprana incidencia de metástasis e incrementa la adhesión de células tumorales en el endotelio, estas cascadas de señalización se activan por mitógenos, los cuales son componentes frecuentes en la transducción de señales de células eucarióticas, en donde su principal función en la transducción de estímulos extracelulares que son reconocidos por los receptores específicos, integrando las respuestas intracelulares correspondientes (10).

Existen estudios que indican que modificaciones epigenéticas provocan cambios en el desarrollo de la glándula mamaria, incrementando su vulnerabilidad de blancos epiteliales para la transformación maligna, estos cambios se pueden manifestar en la vida adulta por expresión alterada de transcriptores como ER y MAP cinasas, y por alteración de la morfología de glándula mamaria, la cual induce cambios en las unidades terminales ductales lobulares (12). La trombina es el agonista plaquetario más potente que también facilita la producción de fibrina desde el fibrinógeno. Se ha demostrado la importancia del receptor de la trombina: PAR1 en el cáncer de mama, en donde presenta altos niveles de expresión en líneas celulares tumorales y cultivos primarios de células tumorales y se correlacionan con su grado de invasividad (11), se han detectado niveles altos de mRNA de PAR1 en muestras de pacientes con cáncer de mama tipo carcinoma ductal infiltrante, en comparación con los bajos niveles encontrados en células normales y de hiperplasia pre-maligna atípica intraductal, existen otras isoformas PAR2, PAR3 y PAR4 (18).

El PAR1 es un oncogén, sobre expresado en las células cancerosas y su activación contribuye a la malignidad del tumor y al proceso metastásico invasivo. Se ha demostrado que la trombina activa a PAR1, y éste a su vez moviliza proteínas-cinasas activadas por mitógenos (p44 y p42 también llamado ERK1/2) que conducen a la proliferación celular. La trombina también utiliza al EGFR (factor de crecimiento epidérmico), para retransmitir señales que promueven el crecimiento celular y la invasión del tumor, demostrándose que el bloqueo de EGFR puede disminuir de manera considerable el aumento del crecimiento del tumor; este fenómeno al parecer podría estar relacionado con los efectos de activación de ERK1/2 (19,20,21).

Las proteín-quinasas poseen una amplia variedad de sustratos, tales como: proteínas estructurales, enzimas metabólicas, reguladores del ciclo celular, factores de transcripción. Debido a ello, las rutas de transducción de señal, tienen un papel crucial en la regulación de procesos celulares fundamentales como la proliferación celular, la diferenciación celular; cualquier perturbación en la vía de transducción desregula los procesos celulares y da lugar a la formación de fenotipos malignos. (17). En la cascada de señalización, la secuencia de las isoformas ERK1 y ERK2 es idéntica en un 84% y están involucrados en una gran variedad de procesos celulares y fisiológicos. Sin embargo al igual que todas las proteín-quinasas, contienen extensiones N y C terminal, lo que proporciona especificidad de señalización. ERK1 posee una inserción de 17 residuos de aminoácidos en su extensión N-terminal. La familia ERK1/2 tiene una inserción de 31 residuos de aminoácidos dentro del dominio quinasas, que proporciona especificidad funcional. Existe evidencia provisional de la función diferencial de estas isoformas. ERK1/2 participan en la regulación de una gran variedad de procesos que incluyen la adhesión celular, la progresión del ciclo celular, la migración celular, la transcripción, la diferenciación, el metabolismo, la proliferación, la invasión y la supervivencia celular (12, 13). ERK1/2 en la cascada de señalización tienen varias funciones distintas que difieren de acuerdo a su localización subcelular, por lo que la actividad nuclear ERK1/2 (p-ERK), ha sido asociada con tumores malignos mamarios y su mal pronóstico (23). Se ha sugerido que la hiperexpresión de estas MAP quinasas puede ser un proceso clave en el potencial metastásico de cáncer de mama, y que su inhibición puede ser un método prometedor para disminuir el crecimiento del tumor (3, 19). La cascada de señalización MEK / ERK integra pistas extracelulares de los receptores de la superficie celular para la expresión génica y la regulación de múltiples proteínas celulares. ERK cascada juega un papel crucial en múltiples procesos celulares como la proliferación celular. Sin embargo, el uso de inhibidor MEK para tratar cáncer de mama, no ha sido del todo exitosa (22).

Existen varias líneas celulares disponibles para el estudio de cáncer de mama. MCF-7 se le considera de bajo potencial maligno y es la línea celular más extensamente usada para estudiar la biología del cáncer; fue obtenida de un adenocarcinoma de mama, es negativa a la expresión del receptor EGF y al receptor PAR1 de la trombina, pero positiva al receptor de estrógeno alfa. MDA-MB-231 también usada ampliamente como una línea celular de cáncer de mama altamente invasiva; proviene de una metástasis de glándula mamaria, es positiva

a la expresión del receptor EGF y al receptor PAR1 de la trombina (23, 24). El objetivo del presente trabajo fue determinar la activación de ERK's en relación al potencial invasivo en la línea celular MCF-7 y la línea celular MDA-MB-231, asociado a la expresión del receptor PAR1 de trombina y conocer la contribución específica de MAP quinasas como inhibidor específico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivo celular

Se emplearon dos líneas celulares epiteliales humanas de cáncer de mama, MCF-7 (negativa al receptor PAR1) y MDA-MB-231 (positiva a la expresión del receptor de EGF y al receptor PAR1 de la trombina), se crecieron en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium GIBCO-BRL, Gaithersburg, USA) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS) (GIBCO-BRL, Gaithersburg, USA), L-glutamina (200mM) (GIBCO-BRL, Gaithersburg, USA) y los antibióticos: penicilina (10,000U) y estreptomycin (10mg/ml) (Sigma, St Louis, USA). La línea MCF-7 se mantuvo con MEM (GIBCO-BRL, Gaithersburg, USA), medio de cultivo sin rojo de fenol. Todos los cultivos se mantuvieron en una incubadora (REVCO, México) a 37°C y al 5% de CO₂. Se tripsinizó una monocapa celular totalmente confluyente y se sembraron 750,000 células/mL de medio de cultivo, en cada pozo de placas de 6 pozos. Se preincubaron por 24 hrs para asegurar su adherencia a la placa; Después, se cambió el medio sustituyendo el suero (FBS) por el suplemento: Insulina, Transferrina y Selenio (ITS) disuelto al 1% en medio de cultivo y se incubaron nuevamente por 24 hrs.

Obtención de lisados celulares

Para buscar inducir diferencias en las líneas celulares a nivel experimental transcurrida la segunda incubación en presencia del medio suplementado con ITS, la línea MDA-MB-231 se estimuló con 10 nM de EGF (factor de crecimiento epidérmico) por pozo a diferentes tiempos (5, 15, 30 y 60 min), como control negativo se empleó un tiempo 0, sin estimulación. La línea celular MCF-7 se estimuló con FBS que contiene estradiol y algunos otros factores, se estimuló a los mismos tiempos y se empleó el mismo control de tiempo cero. Con ayuda de un gendarme, se recuperaron las monocapas celulares en buffer de fosfatos (PBS). Se obtuvieron los pellet de células, a éstos últimos se les agregó buffer de lisis (Western Blotting buffer B 1X), adicionado con inhibidores de proteasas (leupeptina, pepstatina, ácido okadaico y aprotinina), en con-

centración 1µl/mL. La incubación duró 20 min a 4°C. Posteriormente se recuperó el lisado celular por centrifugación a 14000 rpm/15 min/4° C). El lisado se almacenó a - 70° C para su uso posterior.

Cuantificación e integridad de proteínas totales

Se determinó la cantidad de proteínas totales en cada uno de los lisados celulares mediante el método de Bradford 17. Se realizó la separación de proteínas (100ug/ml) por electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% a 70 V/15min, y a 80 V/2.30 horas en una cámara CBG-250 (BioRAD, México). Una vez concluida la electroforesis, para verificar la integridad y la estimación de p42 y p44 presentes en cada lisado celular, los geles fueron teñidos con azul de Coomassie. Como control de peso molecular se empleó el marcador Rainbow Molecular Weight Markers Amersham Biosciences, que posee proteínas recombinantes coloreadas, dando diferente color a cada banda correspondiente a cada peso molecular.

Determinación de ERK1 y ERK2 por Western Blot

Una vez separadas las MAP cinasas ERK1 (p44) y ERK2 (p42), por electroforesis se transfirieron del gel de poliacrilamida a una membrana PVDF, en una cámara semi-seca CBG-250 (BioRAD, México), a 12 V/1 hora. Concluida la transferencia, se bloquearon los sitios de unión inespecífica presentes en la membrana de PVDF con una solución Buffer de Tris adicionada con Tween 20 al 0.05% y suplementada con leche descremada al 5%. Se incubó una hora en agitación orbital suave a temperatura ambiente. Después se incubó la membrana en presencia del anticuerpo primario p-ERK (IgG2a monoclonal obtenido en ratón) (Santa Cruz, sc-7383) a una concentración final de 1:2000 disuelto en la solución bloqueadora. Las incubaciones con los anticuerpos primarios se llevaron a cabo por 16 horas a 4°C con agitación orbital suave. Terminado este tiempo se lavó la membrana con TBS-T y se puso en contacto con el anticuerpo secundario anti-mouse (IgG-HRP; Santa Cruz, sc-2031) o anti-rabbit (IgG-HRP; Santa Cruz, sc-2030) diluido en concentración 1:6666. Este se incubó por 1 hora a temperatura ambiente con agitación orbital suave. Después se volvió a lavar con TBS-T para eliminar el exceso de anticuerpo y se le adicionaron los reactivos de detección ECL-Plus (Amersham PLC) a temperatura ambiente. La membrana se incubó entonces por 5min más, se absorbió el exceso de reactivo con un papel y se reveló mediante el uso de un equipo

automatizado KODAK Image Station. Los tiempos de exposición fueron variables dependiendo de la intensidad de la señal de luz emitida y se evaluó esta intensidad. Cada membrana se re-usó al menos 5 veces. En cada membrana se probó la presencia de ERK fosforilado y de las proteínas ERK1 y ERK2 totales. Se empleó el anticuerpo primario anti-ERK1 (IgG policlonal obtenido en conejo; Santa Cruz, sc-94) y el anti-ERK2 (IgG monoclonal obtenido en conejo; Santa Cruz, sc-1647).

Ensayos de fosforilación in vitro (actividad cinasa: KA)

Los ensayos de actividad cinasa (fosforilación in vitro) para ERK1/2, se llevaron a cabo empelando los lisados celulares estimulados en las condiciones y tiempos antes descritos para cada línea celular. En este caso se inmunoprecipitaron específicamente las ERK1/2 de cada lisado celular. Esto se logró mediante una incubación (20 min/4°C) de cada lisado celular, en presencia de 1µg/µL del anticuerpo dirigido contra ERK1 y ERK2. Transcurrido este tiempo, los lisados celulares, se incubaron en agitación constante en presencia de perlas de agarosa (beads) cubiertas con proteína G durante 2 horas a 4° C. Las proteínas G que recubren a dichas perlas de agarosa, unen con alta afinidad al tipo de IgG de los anticuerpos empleados. Después de este tiempo de incubación y una vez eliminado cualquier interacción no específica con la proteína G (mediante lavados con buffer de lisis), se desarrolló el ensayo de actividad cinasa. Las perlas de agarosa que contenían a las ERK1/2 recuperadas de los lisados celulares, se incubaron en buffer de MAPK cinasas, suplementado con inhibidores de proteasas y ATP 100 µM marcado radioactivamente y sin marcar en presencia de 1 µg de un sustrato universal para MAP cinasas. La reacción se llevó a cabo por 30 minutos a 30° C y con agitación suave (Thermoblock- eppendorf). Transcurrido este tiempo de incubación, se detuvo la reacción, se separaron las proteínas marcadas radioactivamente de las perlas de agarosa (incubación a 95°C/5 min), y se vertieron en un gel de poliacrilamida preparado al 12% para separar a las proteínas. El gel se secó (Gel dryer-Amersham), y se expuso a placas de auto radiografía para ser analizado posteriormente en el Kodak Image Station.

Análisis estadístico

La significancia estadística de los resultados se analizó mediante el empleo de pruebas T de Student de dos colas. Un valor de $P < 0.05$ se considera significativo.

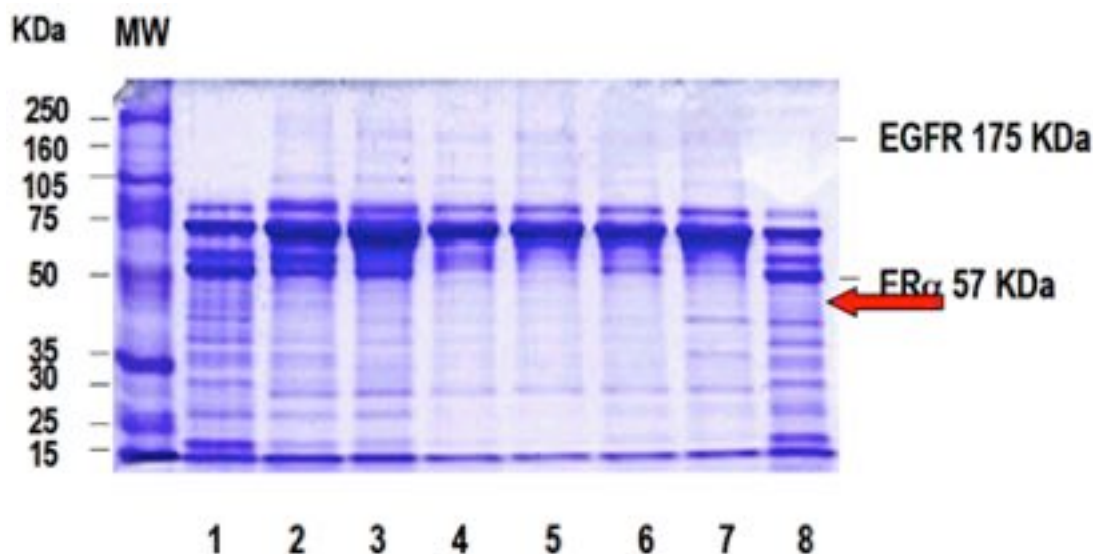


Figura 1. Gel de poliacrilamida al 12 %, teñido con azul de Coomassie. En el primer carril se encuentra el marcador de peso molecular. A la izquierda, se indica el peso molecular en KiloDaltones (KDa), de cada proteína presente en el marcador. En los carriles marcados 1-8, se distingue claramente una serie de bandas definidas en cada uno, que muestra las diferentes proteínas presentes en los lisados celulares. Los carriles 4-7 parecen tener menor concentración de proteína (se observan menos bandas debajo de 50 KDa). No se observa ningún barrido que sería indicativo de degradación proteica. Se indican los pesos moleculares de dos receptores (EGFR y ER α), sólo como referencia. Se observa una diferencia en la concentración de proteínas en cada carril.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuantificación e integridad de proteínas totales

La cuantificación de proteínas se realizó a partir de una curva estándar, utilizando un stock de albúmina humana 1.4 μ g/ μ L como control, obteniéndose un coeficiente de correlación de 0.97 ± 0.02 . Así mismo, mediante electroforesis y tinción con azul de Coomassie, a través de la formación de un complejo con las proteínas presentes en el lisado celular, las cuales conservaron su integridad y reflejan un patrón constante, bien definido en los pesos moleculares. Al ser recuperados de la monocapa de cultivo no presentaron degradación, el colorante se une principalmente a residuos de arginina, triptófano, tirosina, histidina y fenilalanina (Fig. 1).

Las EGFR pesan 175 KDa, ER 57KDa y las ERK1 y ERK2 pesan 44 y 42 KDa, respectivamente. Generalmente se observan como un doblete. Es decir, son dos bandas en paralelo, generalmente separadas por la misma distancia, en el mismo gel. Estas se observan entre las bandas del marcador de peso molecular que corresponde a 35 y 50 kDa. En la figura 1, se observan muy claramente en los lisados celulares de los carriles 1, 2, 3 y 8 como lo indica la flecha roja de la figura 1.

Expresión de PAR1 en líneas celulares de cáncer de mama

En lisados celulares de cada línea celular: la MCF-7 de bajo potencial invasivo y la MDA-MB.231 (MDA) de alto potencial invasivo, se probó por inmunoblot la presencia del receptor de trombina PAR1. Como puede observarse en la figura 2, cuando se empleó el anticuerpo anti-PAR1 sólo se detecta una banda que corresponde a la línea celular de alto potencial invasivo (MDA) como lo indica la flecha roja.

Además de probar en estos lisados celulares la presencia de PAR1, se determinó en las mismas muestras (misma membrana de PDV) otros dos receptores de la familia del factor de crecimiento epidérmico el EGFR1 (EGFR) y el EGFR2. Las líneas celulares se obtienen de tejido metastásico y se clasifican en función de la localización fisiopatológica a partir de la cual han sido aisladas, uno de los prototipos más utilizados para el estudio de células hormonoindependientes ha sido la línea MDA-MB231, permite identificar células malignas compatibles con carcinoma primario de mama. Éstos también se encontraron presentes en la línea celular de alto potencial invasivo MDA como puede verse claramente en la Figura 2, donde en el primer y segundo panel se observan bandas muy claras en el carril de en medio (MDA). A fin de

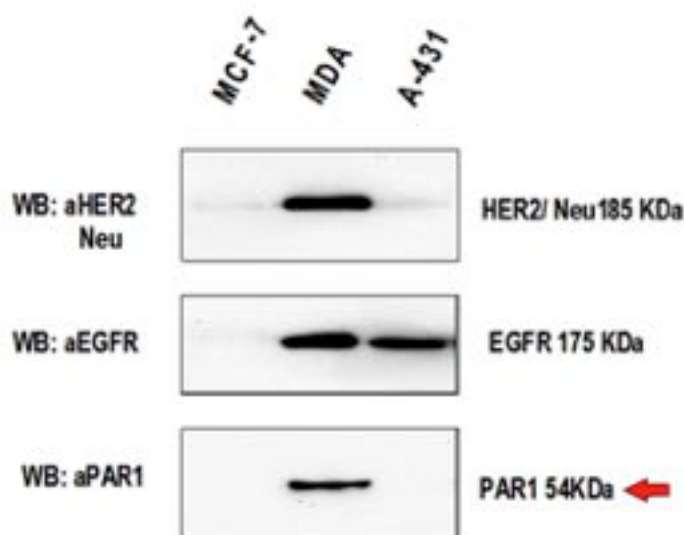


Figura 2. Expresión de PAR1 en líneas celulares de cáncer de mama. Se muestran las líneas celulares de bajo (MCF-7) y alto potencial invasivo (MDA), así como una línea comercial (A-431). Se observa la respuesta de las líneas celulares a diferentes receptores como son HER2/Neu; EGFR; PAR1.

contar con un control se empleó un lisado celular comercial. Éste proveniente de una línea celular epitelial (A-431) que se ha reportado positiva para EGFR (Fig. 2, tercer carril), esta última línea celular muestra una banda muy tenue correspondiente al peso molecular del receptor control (175 KDa).

Estos estudios confirmaron en la línea celular poco invasiva MCF-7, bajos niveles de expresión de PAR1 y la ausencia de EGFR, y corroboraron la presencia del receptor PAR1 de la trombina y del EGFR en la línea celular de cáncer de mama con alto potencial invasivo MDA-MB-231, como lo reportaron Kamath y Meydani (20). Esto resulta congruente, ya que PAR1 y EGFR, están relacionados con el estadio del tumor y el cáncer metastásico, lo que justifica que la expresión de PAR1 y EGFR se encuentren presentes en la línea MDA y no en la línea MCF-7. Así mismo, se ha demostrado que PAR-1 recluta transitoriamente beta arrestinas, que funcionan como un andamio para promover la activación de ERK1/2 (9), lo cual concuerda con los resultados obtenidos en esta investigación.

Expresión y activación de ERK1 y ERK2 en la línea celular MCF-7

En la figura 3A, se muestran los resultados de la estimulación de las células MCF-7, con suero bovino fetal (SBF) al 10%, y el anticuerpo dirigido contra la forma activa (fosforilada) de las ERK (indistinta-

mente de ERK1 o ERK2), durante: 0 minutos (1), 5 minutos (2), 15 minutos (3), 30 minutos (4), 60 minutos (5) y 90 minutos (6). Se observa una banda de diferente intensidad en todos los carriles. A los 5 minutos se observa un claro aumento en la intensidad de la banda correspondiente a una mayor cantidad de la proteína ERK1 fosforilada. Ésta siguió aumentando hasta los 30 minutos; tiempo en el que se observó la máxima respuesta de las ERK1 a la estimulación con SBF al 10%. Esta estimulación de la actividad de las ERKs disminuyó con el tiempo. Sin embargo, no se regresó a los niveles iniciales de ERKs observados en el tiempo cero, ni siquiera después de 90 minutos de estimulación con SBF al 10% (carril 6). En cambio para ERK2, se observó un incremento sostenido y significativo en su activación después de 5 minutos de la estimulación celular. Esta activación fue baja y se mantuvo constante hasta los 60 minutos en que se observó un ligero incremento de la intensidad de la banda (fosforilación). Tiempo después del cual, se observó una baja en la fosforilación. Sin embargo, tampoco en este caso se regresó a los niveles de ERK2 previos a la estimulación, observada a tiempo cero. En la figura 3B, se exhiben los resultados representativos de varios blots en los que se observó la misma tendencia de resultados de la estimulación con suero bovino fetal (SBF) al 10 % y el anticuerpo dirigido contra la ERK fosforilada a diferentes tiempos en la línea MCF-7. La intensidad de las bandas se cuantificó mediante un análisis densitométrico realizado en el Kodak image station.

Una vez aisladas las proteínas activas ERK1/2 en la línea celular de bajo potencial invasivo MCF-7, se les sometió a un ensayo de fosforilación in vitro, con ATP marcado radioactivamente. Esto permitió monitorear la cantidad de cada una de las ERKs que se fosforilaron en cada lisado celular in situ (Fig. 4A). En la figura 4B, se exhibe el análisis densitométrico realizado en el Kodak image station.

La expresión directa y específica obtenida de ambas MAP cinasas en la línea MCF-7, al ser estimulada con suero bovino fetal (FBS), se pudo deber a que éste contiene un gran número de factores de crecimiento y estimuladores de la proliferación celular, entre los que se encuentran altos niveles del receptor de estrógeno alfa, del cual se sabe puede modular la activación de las células MCF-7, ya que estas células poseen su respectivo receptor 17. Sin embargo al parecer la forma estructural de cada isoforma de ERK (Fig. 6), podría estar influyendo en la forma de activación específica de cada una de ellas, lo cual podría justificar que en este caso ERK1 presente una activación máxima a

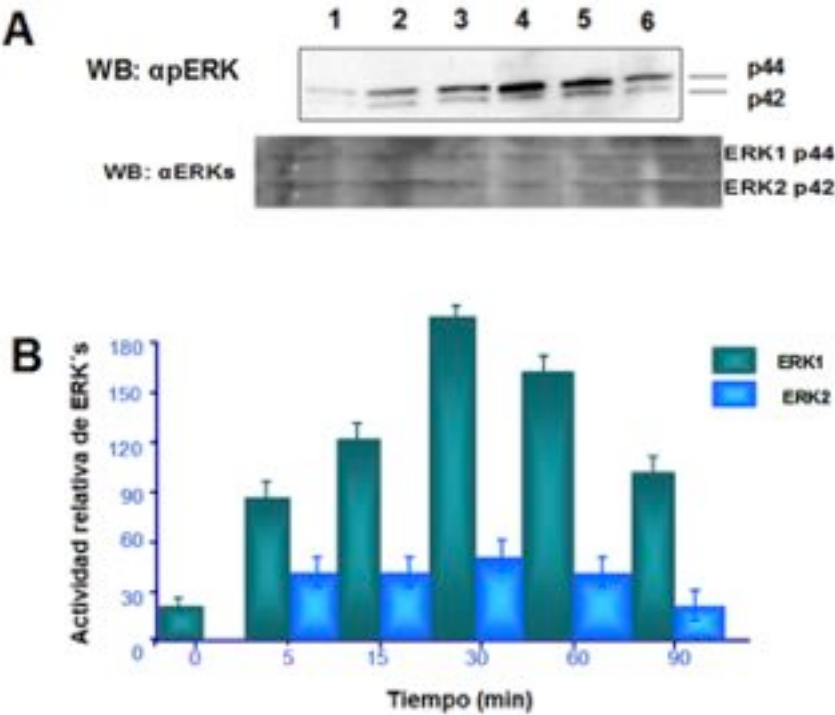


Figura 3. Línea celular MCF-7 estimulada con suero bovino fetal (SBF) al 10 %. A) Activación de la ERK1, cuando se trabajó con el anticuerpo dirigido contra la ERK fosforilada a 0 minutos (1), 5 minutos (2), 15 minutos (3), 30 minutos (4), 60 minutos (5) y 90 minutos (6). B) Análisis densitométrico del inmunoblot realizado para las ERK1 y ERK2 a diferentes tiempos. La gráfica es el resultado del análisis densitométrico realizado en 10 experimentos independientes. Cabe mencionar que hace falta la presencia de una proteína constitutiva que permita realizar adecuadamente de la cuantificación densitométrica.

los 30 minutos, es decir dependiente del tiempo; mientras que ERK2 haya mostrado un significativo incremento sostenido.

A fin de confirmar la contribución específica de las ERKs en la activación antes presentada, este último ensayo de fosforilación in vitro, se repitió en

presencia de un inhibidor específico de las ERKs. MEK funciona como la cinasa que activa a ERK, por lo tanto ERK es el sustrato de MEK, además U0126 es el inhibidor de MEK. Este se denomina U0126 e interactúa específicamente con la proteína cinasa que funge como el sustrato de las ERK1/2 y que se

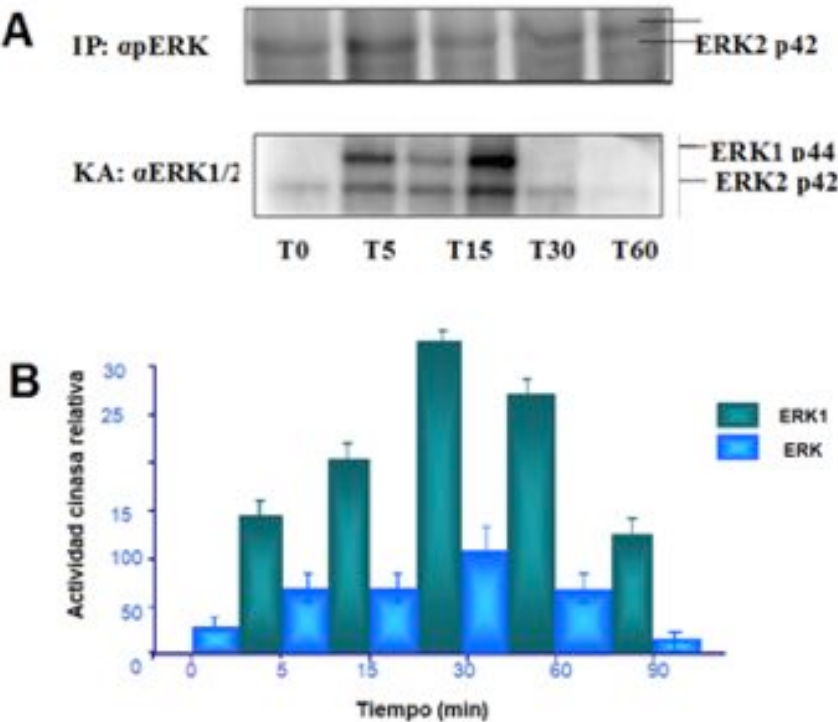


Figura 4. Análisis del ensayo de actividad cinasa: KA, realizado para las ERK1 y ERK2 en la línea celular de bajo potencial invasivo MCF-7. A) Se observa un incremento de la ERK1 hasta alcanzar un punto máximo de estimulación a los 30 minutos. Se muestra que la ERK2 se activa en menor proporción que la ERK1 y se mantiene constante hasta los 30 minutos después de estimular a la línea celular MCF-7 con SBF al 10%. B) Análisis densitométrico del ensayo de actividad cinasa para las ERK1 y ERK2. La gráfica es el resultado del análisis densitométrico realizado en 3 experimentos independientes.

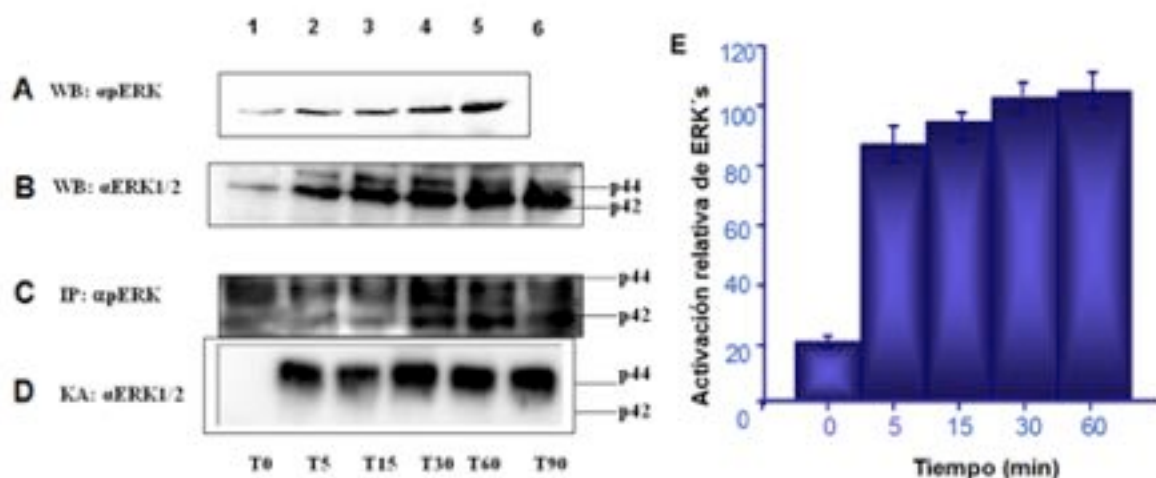


Figura 1. Se muestra un perfil de activación (fosforilación) de las ERK1 y ERK2 cuando se estimuló a las células de alto potencial invasivo (MDA-MB-231), con EGF (10 nM). A) Se observan las 2 MAP cinasas de interés. B) Intensidad de las bandas para ERK1 y ERK2 con sus pesos moleculares respectivos, obtenidas por Western Blot. C) Diferencia en la intensidad de las bandas de la figura B, en relación al tiempo, por Inmuno precipitación. D) Se observan las bandas resultantes de la fosforilación obtenidas en el ensayo de Actividad cinasa. E) Análisis densitométrico del inmunoblot. La gráfica es el resultado del análisis densitométrico realizado en 10 experimentos independientes.

denomina MEK1 y MEK2. En presencia de U0126, se inhibió por completo la actividad de las ERKs. Es decir, que los lisados celulares de la línea con bajo potencial invasivo, que fueron preincubadas con U0126 por 20 minutos y después estimuladas con SBF al 10% se sometieron a la inmunoprecipitación (separación específica) de las ERK1/2 y aunque se incubaron en presencia de un sustrato de ERKs y ATP marcado radioactivamente. No se observó ninguna señal o banda. Es decir que la inhibición fue del 100% (datos no mostrados). Esto se debe a que el inhibidor específico del sustrato de las ERKs: MEK U0126, media la fosforilación de las ERK1 y ERK2 (19, 20).

Expresión y activación de ERK1 y ERK2 en la línea celular MDA-MB-231

En la figura 5A, se muestran los resultados que se obtuvieron de la activación (fosforilación) de las ERK1 y ERK2, cuando se estimuló a las células de alto potencial invasivo (MDA-MB-231), con EGF (10 nM) durante: 0 minutos (1), 5 minutos (2), 15 minutos (3), 30 minutos (4), 60 minutos (5) y 90 minutos (6). Se muestran bandas de diferente intensidad en cada uno de los carriles. En el primero de éstos se observa una banda de muy baja intensidad (aunque al tiempo cero no se estimuló a las células, y no se esperaba activación de las ERKs, se observa una banda tenue). Desde los primeros 5 minutos y hasta los 60 minutos en que se desarrolló

este experimento, se observó un claro aumento en la intensidad de la banda correspondiente a una mayor cantidad de ERK1 activa. En este ensayo, se reportó una inhibición en la expresión de ERK2, ya que no se logró observar la banda correspondiente a esta cinasa. Este experimento se repitió en forma independientemente, al menos 10 veces y mostró gran reproducibilidad, independientemente del tiempo de estimulación de la línea celular con alto potencial invasivo MDA-MB-231.

En la figura 5E, se muestra la intensidad de las bandas se cuantificó mediante un análisis densitométrico realizado en el Kodak image station. Estos resultados se confirmaron mediante la realización de una inmunoprecipitación específica de las ERK1 y ERK2 del lisado celular total. Una vez aisladas las proteínas activas ERK1/2 se les puso en contacto con un sustrato específico en presencia de ATP marcado radioactivamente. Esto permitió monitorear la cantidad de cada una de las ERKs que se fosforiló en cada lisado celular in situ.

La activación de las ERKs en la línea celular MDA, podría atribuirse específicamente al receptor de EGFR, ya que en éste estudio y en reportes previos, se ha observado que en las células estimuladas con EGFE, se encuentran expresados niveles importantes de EGFE 20, 21, como se corroboró en este estudio con la línea MDA y A-431 (Fig. 2). Esta investigación muestra por primera vez una activación selectiva de la ERK1 y una inhibición de la ERK2 en las células de la línea MDA, presentándose

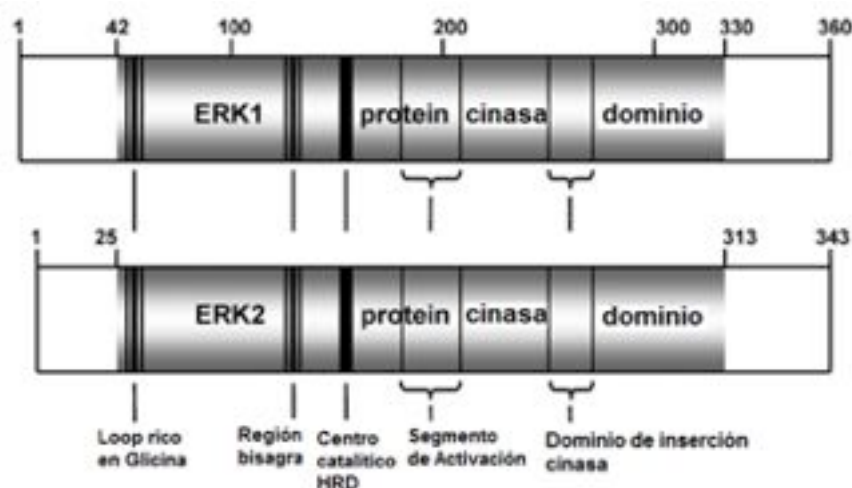



Figura 6. Arquitectura de ERK1 y ERK2 humana. Los números son los de residuos de aminoácidos. Tomada de 27.

estos efectos en las ERKs de manera independiente durante los diferentes tiempos de estimulación con EGF. Lo anterior podría evidenciar que la estructura específica de cada isoforma ERK (Fig. 6), cumple una función biológica concreta, y podría apoyar la hipótesis de que aunque no se conocen funciones únicas para ERK1 y ERK 2, esto no significa que no existan, puesto que se ha demostrado, que ningún animal puede sobrevivir con un solo alelo ERK (20, 22, 23).

El ensayo de fosforilación in vitro, también se repitió en presencia del inhibidor específico de las ERKs: U0126, en donde se inhibió por completo la actividad de las ERKs, debido a que no se realizó la fosforilación de ERK1 y ERK2.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio, sugieren que existe una modulación diferente de las vías de transducción de señales a nivel de las ERKs, en el proceso de la progresión tumoral del cáncer de mama. Se resalta, que posiblemente las diferencias entre la activación de las dos isoformas de las ERK, podría evidenciar algún tipo de regulación entre ellas. Estos trabajos de investigación, son importantes ya que aportan elementos sobre la identificación de los mecanismos moleculares que regulan la sensibilidad/resistencia de las células cancerosas, con el fin de mejorar la calidad de vida de las pacientes con este tipo de neoplasia. 

REFERENCIAS

1. Abdel Z AM, Eldeib AM. (2016) Breast cancer classification using deep belief networks. *Expert Systems with Applications*. 46: 139-144.
2. DeSantis C, Siegel R, Jema A. American Cancer Society. (2012) Breast cancer facts and figures 2011-2012. Atlanta: American Cancer Society, Inc.; 1-36.
3. Sánchez B JJ. (2015) Mortality trends and risk of dying from breast cancer in the 32 states and 7 socioeconomic regions of Mexico, 2002-2011. *Epidemiology Biostatistics and Public Health*. 12(1): 1-12.
4. Zeisberg M, Neilson EG. (2009) Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest*. 119 (6): 1429-1437.
5. "Estadísticas a propósito del día mundial de la lucha contra el cáncer de mama". (2015) INEGI Aguascalientes, Ags.
6. Lim, HC, Multhaupt H AB, Couchman JR. (2015) Cell surface heparin sulfate proteoglycans control adhesion and invasion of breast carcinoma cells. *Molecular Cancer* 14(1):15.
7. Hermida LI, Sánchez TE, Nerín SC, Cordero BR, Mora EI, Pinar SJ. (2016) Marcadores Tumorales. *REV CLÍN MED FAM*; 9(1): 31-42.

8. Lidfeldt J, Bendahl PO, Forsare C, Malmström P, Fernö M., Belting M. (2015) Protease activated receptors 1 and 2 correlate differently with breast cancer aggressiveness depending on tumor ER status. *PLOS ONE*. 10(8): e0134932.
9. Marie KF, Arreola OH, Velázquez E, Dorantes J, Méndez O, Ávila BL. (2009) El costo de la atención médica del cáncer mamario: el caso del Instituto Mexicano del Seguro Social. *Rev. Salud Pública de México*. vol. 51 supl.2
10. Ichimura K, Shinozaki K, Tena G, Sheen J, Henry Y, Champion A, Kreis M, Zhang S, Hirt H, Wilson C, Heberle BE, Ellis BE., Morris PC, Innes RW, Ecker JR, Scheel D, Klessig DF, Machida Y, Munsy J, Ohashi Y and Walker JC. (2002) Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends Plant Sci* 7: 301-308.
11. Santillán B JG, Quiroz OH, Mendieta ZH, Gómez O LM. (2013) Expresión génica y receptores hormonales en cáncer mamario. "El camino hacia la búsqueda de terapias preventivas". *Revista de Medicina e investigación* 1(1): 1-42.
12. Kamath L, Meydani A, Foss F, Kuliopulos A. (2001) Signaling from protease activated receptor-1 inhibits migration and invasion of breast cancer cells. *Cancer Res* 61: 5933.
13. Even RS, Uziely B, Cohen P, Grisaru GS, Maoz M, Ginzburg Y, Reich R, Vlodavsky I, Bar SR. (1998) Thrombin receptor over expression in malignant and physiological invasion process. *Nat Med* 4(8):909-914.
14. Ceballos CG, Maldonado LV, Hernández RN. (2007) Signaling induced by PAR1 on breast cancer cell lines is correlating with its invasive potential. *BMC Cancer*. 7(1):A10. doi:10.1186/1471-2407-7-S1-A10
15. Ohshiro K, Bui N TM, Natha R SD, Schwartz AM, Levine P, Kumar R. (2012) Thrombin stimulation of inflammatory breast cancer cells leads to aggressiveness via the EGFR-PAR1-pak1 pathway. *International Journal of Biological Markers*. 27(4):e305-e313.
16. Maiello MR, D'Alessio A, Bevilacqua S, Gallo M, Normanno N, De Luca A. (2015) EGFR and MEK Blockade in Triple Negative Breast Cancer Cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. 116(12):2778-2785.
17. Ortiz M JM. (2009) Proteína quinasas como dianas farmacológicas. *Real academia nacional de farmacia*. Farmacia 11 28004 Madrid. Spain DOI: <http://dx.doi.org/ES/monoranf.v0i0.808:15-45>.
18. Roskoski RJ. (2012) ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation. *Pharmacological Research*. 66:105- 143.
19. Hsu YL, Hou MF, Kuo PL, Huang YF, Tsai EM. (2013) Breast tumor-associated osteoblast-derived CXCL5 increases cancer progression by ERK/MSK1/Elk1/snail signaling pathway. *Oncogene* 32(37): 4436-4447.
20. Roser B, Pouyssegur J, and Lenormand P. (2016) ERK1 and ERK2 Map Kinases: Specific Roles or Functional Redundancy?. *Front Cell Dev Biol*. 4: 53:1-23. doi: 10.3389/fcell.2016.00053
21. Smith BN, Burton LJ, Henderson V, Randle DD, Morton DJ, Smith BA, Taliaferro SL, Nagappan, P, Yates C, Zayzafoon, M, Leland WK, Chung VA, Otero M. (2014) Snail Promotes Epithelial Mesenchymal Transition in Breast Cancer Cells in Part via Activation of Nuclear ERK2. *PLOS ONE*. 9 (8):e104987.
22. Kabir MH, Suh EJ, Lee C. (2012) Comparative phosphoproteome analysis reveals more ERK activation in MDA-MB-231 than in MCF-7. *International Journal of Mass Spectrometry*. (309): 1- 12.
23. Chu HW, Cheng CW, Chou WC, Hu LY, Wang HW, Hsiung CN, Hsu HM, Wu PE, Hou MF, Shen CY, Yu JC. (2014) A novel estrogen receptor-microRNA 190a-PAR-1-pathway regulates breast cancer progression, a finding initially suggested by genome-wide analysis of loci associated with lymph-node metastasis. *Human Molecular Genetics*. 23 (2):355-367.
24. Bradford M MA. (1976) Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. (72): 248-254.
25. Kamath L, Meydani A. (2001) Signaling from Protease Activated Receptor-1 inhibits migration and invasion of breast cancer cells. *Cancer Res*. (61): 5933-5940.
26. Ray LB, Sturgill TW. (1998) Insulin-stimulated microtubule-associated protein kinase is phosphorylated on tyrosine and threonine in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. (85):3753-3757.
27. Roskoski, JR. (2012) MEK1/2 dual-specificity protein kinases: structure and regulation. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 417:5-10.

28. Prenzel N, Zwick E, Daub H, Leserer M, Abraham R, Wallasch Ch, Ullrich A. (1999) EGF-receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature*. 402:884-888.
29. Prenzel N, Zwick E, Leserer M, Ullrich A. (2000) Tyrosine kinase signalling in breast cancer Epidermal Growth factor receptor: convergence point for signal integration and diversification. *Breast Cancer Res*. 2:184-190.
30. wLefloch R, Pouysségur J, Lenormand P. (2008) Single and combined silencing of ERK1 and ERK2 reveals their positive contribution to growth signaling depending on their expression levels. *Molecular and Cellular Biology*. 28: 511-27.