



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**EVALUACIÓN DE LA MORFOLOGÍA  
MITOCONDRIAL EN CÉLULAS DE CÁNCER DE  
MAMA TRATADAS CON UN INHIBIDOR DE MEK**

ABRIL 2022

TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**LICENCIATURA EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

PRESENTA:

**p.Q.F.B. MINUET BARRAGÁN OLÁN**

DIRECTOR DE TESIS:

**D.C. PAOLA MAYCOTTE GONZÁLEZ**

ASESOR DE TESIS:

**D.C. LAURA MORALES LARA**



# ÍNDICE

Resumen.....	1
1. Introducción .....	2
2. Antecedentes .....	3
2.1 Cáncer.....	3
2.1.1 Cáncer de mama.....	6
2.1.2 Tipos de cáncer de mama .....	7
2.1.3 Tratamientos .....	10
2.2 Vía RAF/MEK/ERK .....	12
2.3 Morfología y dinámica mitocondrial.....	14
3. Justificación .....	15
4. Hipótesis .....	15
5. Objetivos .....	16
5.1 Objetivo general.....	16
5.2 Objetivos específicos .....	16
6. Diagrama de trabajo .....	16
7. Metodología .....	17
7.1 Cultivo celular.....	17
7.2 Siembra en placa de 6 pozos .....	17
7.3 Tratamiento con inhibidor de MEK .....	18
7.4 Tinción con MitoTracker Red .....	19
7.5 Evaluación de la morfología mitocondrial .....	21
7.6 Análisis estadístico.....	21
8. Discusión de resultados .....	21
9. Conclusiones .....	26
Bibliografía .....	27

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tipos histológicos especiales de cáncer de mama preferentemente con receptor de estrógeno positivo.....	8
Figura 2. Tipos histológicos especiales de cáncer de mama preferentemente receptor de estrógeno negativo.....	9
Figura 3. Activación de las vías RAS/MAPK y PI3K mediante señalización de RKT .....	13
Figura 4. Morfología mitocondrial y funciones celulares asociadas .....	14
Figura 5. Esquema del procedimiento de la siembra en placa de 6 pozos. ....	18
Figura 6. Esquema del tratamiento con PD0325901. ....	19
Figura 7. Esquema de la tinción con MitoTracker Red.....	20
Figura 8. Morfología mitocondrial de las líneas celulares .....	23
Figura 9. Tipos de fragmentación en las líneas celulares. ....	25

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación del cáncer de mama de acuerdo con la etapa.....	7
Tabla 2. Principales subtipos moleculares de cáncer de mama y su pronóstico .....	10
Tabla 3. Tratamientos típicos para cáncer de mama según la etapa.....	11
Tabla 4. Criterios de clasificación de la morfología mitocondrial .....	22

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>BCL2</b>	Proteína 2 de linfoma de células B
<b>BCL-xL</b>	Proteína extragrande de linfoma de células B
<b>CCL5</b>	Quimiocina ligando de tipo 5
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DRP1</b>	Proteína 1 relacionada con la dinamina
<b>EGFR</b>	Receptor de factor de crecimiento epidérmico
<b>ELK-1</b>	Proteína ETS tipo 1
<b>ER</b>	Receptor de estrógenos
<b>ERK/MAPK</b>	Cinasa regulada por señales extracelulares
<b>GAP</b>	Proteína activadora de GTPasa
<b>GDP</b>	Guanosín difosfato
<b>GRB2</b>	Proteína 2 unida al receptor de factor de crecimiento
<b>GTP</b>	Guanosín trifosfato
<b>HER2</b>	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
<b>MAPK</b>	Proteína cinasa activada por mitógeno
<b>MEK/MAPKK/MAP2K</b>	Cinasa de ERK
<b>MEKi</b>	Inhibidor de MEK PD0325901
<b>MNK1</b>	Serina/treonina proteína cinasa 1 de interacción con MAPK
<b>MSK1</b>	Proteína cinasa 1 activada por mitógeno y estrés
<b>PBS</b>	Buffer fosfato salino
<b>PI3K</b>	Fosfatidilinositol 3-cinasa
<b>PR</b>	Receptor de progesterona
<b>RAF/MAPKKK/MAP3K</b>	Cinasa de MEK
<b>RAS</b>	Proteína de unión a nucleótidos de guanosina
<b>RTK</b>	Receptor de tirosina cinasas
<b>RSK</b>	Proteína cinasa s6 ribosomal
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino
<b>SOS</b>	Factor de intercambio de nucleótidos de guanina
<b>TGF-β</b>	Factor de crecimiento transformante β
<b>TN</b>	Cáncer de mama triple negativo
<b>TP53</b>	Proteína tumoral 53

## Resumen

El cáncer de mama es el cáncer más comúnmente diagnosticado a nivel mundial y en México se ha convertido en la primera causa de muerte por cáncer. Es una enfermedad heterogénea que se clasifica en 3 subtipos moleculares: luminal (positivo a ER), enriquecido en HER2, basal o TN. De estos 3 subtipos, es el TN el de peor pronóstico, debido a su alto grado de recurrencia y al mayor riesgo residual que presenta después del tratamiento en comparación con los otros. El tratamiento mayormente utilizado contra este subtipo de cáncer de mama es la quimioterapia convencional, la cual es muy efectiva ya que las células tumorales TN tienen un alto grado de proliferación, pero su gran desventaja es la toxicidad resultante que afecta gravemente la calidad de vida de las pacientes, por lo que este subtipo sigue siendo muy difícil de tratar. Debido a esto, durante décadas se han estudiado terapias alternativas que vayan dirigidas hacia vías de señalización celular implicadas en la promoción de la malignidad tumoral. En este proyecto la vía de estudio fue RAF/MEK/ERK, la cual participa en procesos celulares importantes como la supervivencia, proliferación, diferenciación y adhesión. En procesos cancerosos, algunas proteínas pertenecientes a esta vía pueden presentar mutaciones, causando así la sobreactivación de la vía y promoviendo la migración de células tumorales. Se sabe que las mitocondrias de las células tumorales TN presentan en su mayoría una morfología fragmentada debido a que ERK2 fosforila directamente a DRP1, por lo que se propone que esta vía está implicada en la modificación de la morfología y la función mitocondrial. Los resultados obtenidos sugieren que ERK no regula la dinámica mitocondrial, esto podría deberse a la activación de otras vías como mecanismo de compensación o que el cambio en la morfología provocado por la inhibición de ERK es tan ligero que no puede ser cuantificado por los métodos utilizados. Sería interesante estudiar si otras vías de señalización como PI3K o STAT3 se activan como mecanismo de compensación ante la inhibición de la fosforilación de ERK y si estas participan en la modificación de la función mitocondrial.

## **1. Introducción**

El cáncer de mama ha superado al cáncer de pulmón como el cáncer más comúnmente diagnosticado a nivel mundial y es la primera causa de muerte por cáncer en mujeres, con un estimado de 2.3 millones de casos nuevos en 2020 y una mortalidad del 15.5%. En 2020 se reportaron 29,929 casos nuevos y 7,931 muertes en nuestro país, de los cuales el 23% ocurre en una población de 30 a 59 años (INEGI, 2021; Sung et al., 2021). Los tratamientos actuales son insuficientes para curar el cáncer de mama metastásico y normalmente están asociados a efectos secundarios graves, deteriorando la calidad de vida de la paciente incluso más que la enfermedad misma, por lo que es necesario desarrollar nuevos enfoques terapéuticos.

En 1982, diversos autores reportaron la asociación del cáncer con los genes RAS mutados (Santarpia et al., 2012), los cuales codifican para proteínas que controlan vías de señalización intracelular implicadas en procesos como proliferación, diferenciación, migración y apoptosis. Una de estas vías es RAF/MEK/ERK; cuando RAS o RTK presentan mutaciones, se desencadena la fosforilación de las proteínas que integran esta vía, enviando señales al núcleo y promoviendo el crecimiento y la diferenciación celular. Estos tipos de aberraciones en la señalización se han visto implicados en varios tipos de cáncer, lo que hace a las proteínas de esta vía un posible blanco terapéutico en procesos cancerígenos.

Se han realizado pruebas clínicas hasta fase III utilizando diferentes inhibidores de MEK como Trametinib, Cobimetinib, Refametinib, etc., en pacientes con melanoma, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, cáncer de tracto biliar, cáncer de ovario, leucemia y cáncer de mama TN. Los efectos secundarios reportados incluyen erupciones cutáneas, edema, visión borrosa transitoria, entre otros. Los inhibidores de primera generación demostraron tener una exposición interna muy corta en humanos, en cambio, los de segunda generación demostraron ser potentes, pero con efectos tóxicos dependiendo de la dosis administrada. Estudios preclínicos han demostrado que el bloqueo de la vía con inhibidores de MEK restringe la proliferación de células tumorales mediante la inducción del arresto del ciclo celular y la apoptosis. Asimismo, en modelos de xenoinplante se comprobó que la administración oral de estos inhibidores reduce significativamente el tamaño del tumor en

ratones e inhibe la fosforilación constitutiva de ERK (Frémin & Meloche, 2010; Kashatus et al., 2015).

## **2. Antecedentes**

### *2.1 Cáncer*

Según el National Cancer Institute, cáncer es el nombre que se le da a un conjunto de enfermedades relacionadas. Cuando un individuo presenta esta patología, los procesos de división y muerte celular no ocurren de manera normal, esto puede comenzar en casi cualquier parte del cuerpo. A medida que las células se vuelven más anormales, las que son más longevas o las que se encuentran dañadas sobreviven cuando deberían morir y, conjuntamente, ocurre la formación de nuevas células que no se necesitan, las cuales pueden dividirse sin control y formar crecimientos llamados tumores. Alrededor de estos tumores se desarrolla un microambiente conformado por células del sistema inmune que contribuyen a la formación de vasos sanguíneos que suministran oxígeno y otros nutrientes necesarios para su crecimiento, a la vez que retiran sus productos de desecho. Mientras estos tumores están en crecimiento, algunas de las células cancerosas que los componen pueden llegar a desprenderse y viajar a otros tejidos a través de la sangre o del sistema linfático, formando nuevos tumores lejos del tumor original, a este proceso se le llama metástasis.

Hanahan y Weinberg describen 10 características distintivas de las células cancerosas que permiten que el tumor prolifere y se disemine hacia otros tejidos:

1. Sostener la señalización proliferativa: las células cancerosas desregulan de diversas formas la señalización normal para asegurar su homeostasis. Puede ser por estimulación proliferativa autocrina, en donde ellas mismas producen ligandos de factores de crecimiento a los que pueden responder mediante la expresión de receptores afines. Alternativamente, pueden enviar señales para estimular las células normales dentro del estroma asociado con el tumor de apoyo, que actúan en reciprocidad al suministrar a las células cancerosas varios factores de crecimiento.

2. Evadir los supresores del crecimiento: se han descubierto docenas de supresores de tumores que operan de diversas formas para limitar el crecimiento y la proliferación celular, pero las células cancerosas adquieren la capacidad de evitarlos. Siendo la citocina TGF- $\beta$  la mejor conocida por su papel paradójico en el desarrollo del cáncer, pues en etapas tempranas suprime el crecimiento tumoral, mientras que en etapas avanzadas puede estimular su crecimiento.
3. Resistir la muerte celular: las células tumorales son capaces de desarrollar diversas estrategias para limitar o evitar la apoptosis. La más común es la pérdida de la función del gen TP53. Otras estrategias empleadas por los tumores son aumentar la expresión de reguladores antiapoptóticos o de señales de supervivencia.
4. Inducir angiogénesis: durante la progresión del tumor, un interruptor angiogénico permanece activo, lo que provoca que se generen nuevos vasos sanguíneos que ayudan a nutrir a los crecimientos neoplásicos en expansión. Este proceso está regido por factores que inducen o frenan a la angiogénesis.
5. Activar la invasión y la metástasis: diversas interacciones entre células y moléculas son las encargadas de promover estos procesos en el cáncer. Por ejemplo, se ha identificado que un conjunto de factores de transcripción que orquestan la transición epitelial-mesenquimal y los procesos migratorios, se expresan de diversas formas en varios tipos de tumores malignos y se ha demostrado que son causalmente importantes para programar la invasión y provocar metástasis cuando se sobreexpresan ectópicamente. Otro ejemplo es la secreción de CCL5 por células madre mesenquimales presentes en el estroma tumoral como una respuesta a las señales liberadas por las células cancerosas, esta quimiocina actúa sobre células tumorales y estimula su comportamiento invasivo.
6. Permitir la inmortalidad replicativa: las células tumorales tienen la capacidad de mantener el ADN telomérico en las longitudes necesarias para evitar procesos de senescencia o apoptosis, esto gracias a una regulación positiva de la expresión de la enzima telomerasa o un mecanismo alternativo de mantenimiento de telómeros basado en recombinación.

7. Reprogramación del metabolismo celular: las células tumorales son capaces de modificar el metabolismo de la glucosa para producir más energía y estimular su crecimiento y división.
8. Evadir la destrucción por parte del sistema inmune: los tumores poseen la capacidad de evitar la detección del sistema inmune inhabilitando a los componentes del sistema inmune que son enviados para su erradicación. Por ejemplo, son capaces de paralizar a linfocitos T citotóxicos y células *natural killer* mediante la secreción de TGF- $\beta$ .
9. Inestabilidad genómica: la alteración del genoma varía mucho entre los diferentes tipos de cáncer, pero se ha comprobado que es una característica inherente de todas las células cancerosas humanas que permite el crecimiento y dominio de clones de células tumorales en un tejido específico. Los defectos que se desarrollan ocurren de manera selectiva y ventajosa y son esenciales para la progresión del tumor.
10. Inflamación: células del sistema inmune, tanto innato como adaptativo, se infiltran en tejidos no neoplásicos para promover tumorigénesis mediante el suministro de moléculas bioactivas que enriquezcan al microambiente tumoral como factores de crecimiento, de supervivencia y de angiogénesis, así como enzimas modificadoras de la matriz extracelular.

Ante la necesidad de realizar una descripción completa de aquellos rasgos que comparten todos los tipos de cáncer, en 2022, Hanahan propone 4 características adicionales, las cuales denomina “*enabling characteristics*”. Estas incluyen desbloqueo de la plasticidad fenotípica, reprogramación epigenética no mutacional, microbiomas polimórficos y células senescentes. Si bien, tales características podrían ser reconocidas posteriormente como componentes centrales, actualmente se consideran una consecuencia de la neoplasia que permite a las células cancerosas y tumores adoptar rasgos funcionales.

El cáncer es causado por cambios en los genes que controlan la forma en que crecen y se dividen las células. Esta enfermedad puede ser hereditaria o puede surgir a lo largo de la vida de una persona como resultado de errores que ocurren cuando las células se dividen o debido al daño causado al ADN por exposiciones ambientales como sustancias carcinogénicas, algunos virus o bacterias, radiación, dieta o incluso inflamación (NIH,

2015). Se sabe también que hay diversos factores de riesgos para desarrollar cáncer, como lo son el uso del tabaco y alcohol, bajo consumo de frutas y verduras, raza, sedentarismo, sobrepeso y obesidad (Ott et al., 2011).

### *2.1.1 Cáncer de mama*

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea que comprende numerosas entidades distintas que no solo tienen diferentes características biológicas e histológicas sino también diferentes comportamientos clínicos, originadas por diferentes factores de riesgo y con respuestas a terapia muy diferentes (Weigelt et al., 2010).

El IMSS establece diversos factores de riesgo para que la población mexicana presente cáncer de mama, como lo son tener antecedentes de un familiar con esta enfermedad, tener 45 años o más, tener la primera menstruación antes de los 12 años, usar anticonceptivos hormonales por más de 5 años, tener el primer hijo después de los 30 años, no haber tenido hijos, tener la última menstruación después de los 50 años, tomar hormonas para la menopausia, obesidad, sedentarismo, consumo de alcohol mayor a 15 gramos al día y tabaquismo. Otro factor muy relacionado con esta patología es tener una alimentación rica en carbohidratos, baja en fibra y rica en grasas animales y ácidos grasos trans.

Debido al prolongado debate sobre el potencial preneoplásico de las lesiones benignas proliferativas de la mama, no se ha determinado un modelo de progresión definitivo. Los cambios displásicos citológicos o arquitectónicos pueden localizarse en diversas enfermedades mamarias no malignas, como la hiperplasia del conducto florido y columnar, la adenosis y los papilomas, pero su potencial precanceroso real no está definido (Woolston, 2015). No todos los cambios preinvasivos continúan en el carcinoma invasivo y el proceso puede llevar décadas (Libson & Lippman, 2014).

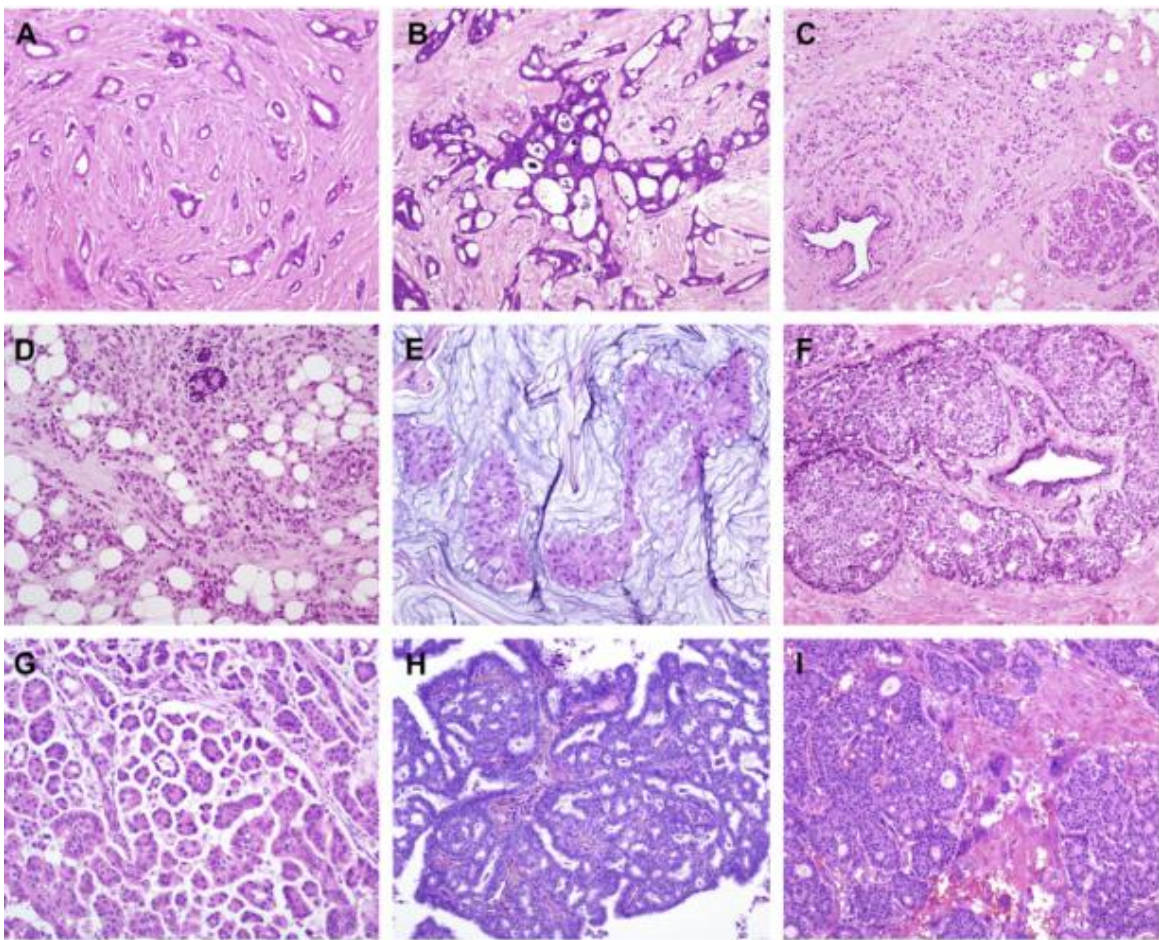
### 2.1.2 Tipos de cáncer de mama

El cáncer de mama puede estadificarse de acuerdo con la etapa en la que se encuentre y clasificarse de acuerdo con sus características histológicas y/o moleculares (Tabla 1).

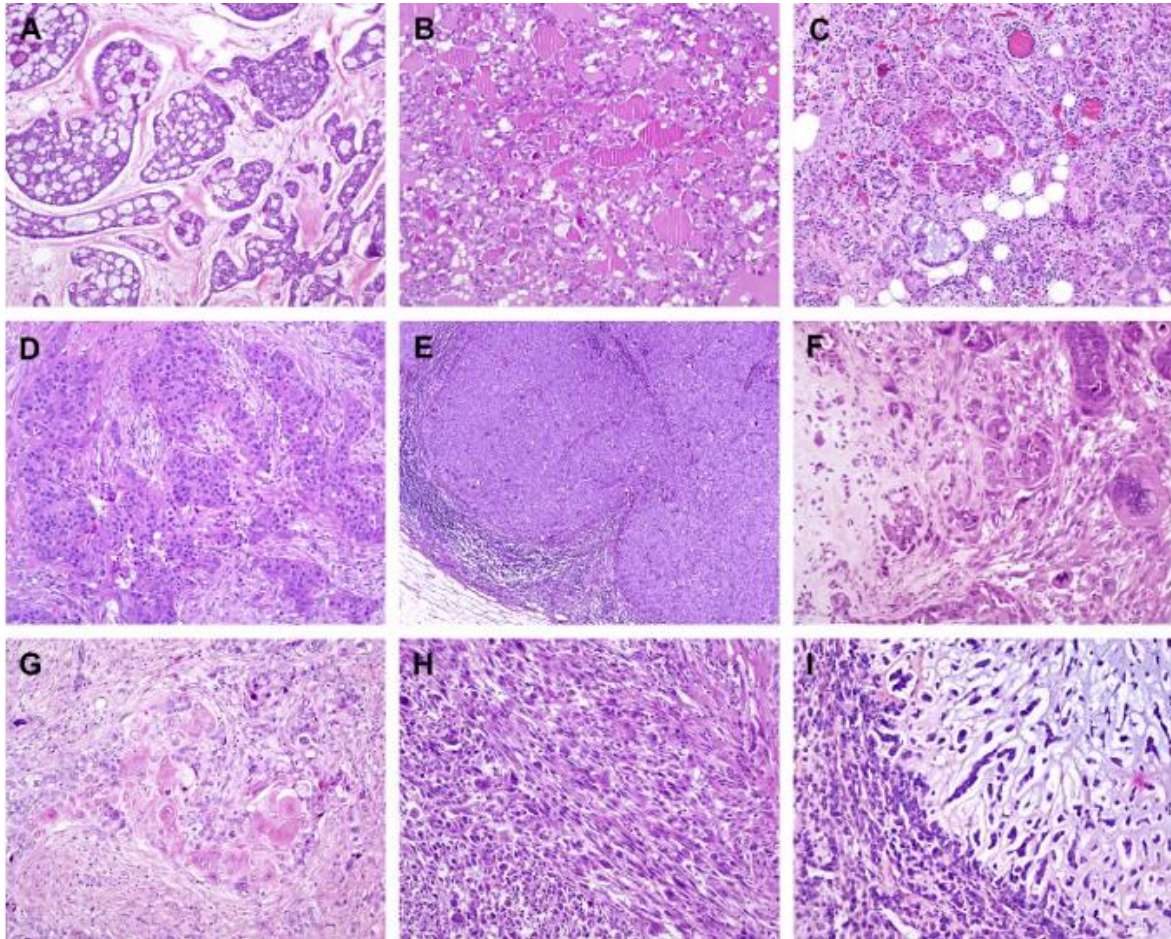
Etapa	Descripción
No invasivo	
0 (lobular <i>in situ</i> )	Sin evidencia de células cancerosas o invasión de la membrana basal del conducto o tejido normal vecino. No progresa a cáncer invasivo, pero incrementa el riesgo en un 7% de padecerlo dentro de 10 años.
0 (ductal <i>in situ</i> )	Puede progresar a cáncer invasivo. Rara vez ocurre metástasis a ganglios linfáticos.
Invasivo	
IA	Tumor $\leq 2$ cm que no se propaga fuera del seno, sin ganglios linfáticos afectados.
IB	-No hay tumor en la mama ni en ganglios linfáticos axilares, pero hay metástasis microscópicas ( $> 0.2$ mm, pero $\leq 2$ mm). -Tumor presente en la mama, $\leq 2$ cm, con afectación del ganglio linfático.
IIA	-No hay tumor en la mama, pero cáncer macroscópico ( $> 2$ mm) en 1-3 ganglios linfáticos axilares. -Tumor $\leq 2$ cm, con diseminación a los ganglios linfáticos axilares. -Tumor $> 2$ cm, pero $\leq 5$ cm, sin diseminación a los ganglios linfáticos axilares.
IIB	-Tumor $> 2$ cm, pero $\leq 5$ cm, con diseminación a 1-3 ganglios linfáticos axilares. -Tumor $> 5$ cm, sin diseminación a los ganglios linfáticos axilares.
IIIA	-No hay tumor en la mama o presencia de un tumor de mama de cualquier tamaño asociado con metástasis en 4 a 9 ganglios linfáticos axilares o en ganglios mamaros internos. -Tumor $> 5$ cm, con diseminación a los ganglios mamaros internos y/o axilares.
IIIB	Tumor de cualquier tamaño, con diseminación a la pared torácica y/o piel de la mama o diseminación a los ganglios mamaros axilares o internos.
IIIC	-Tumor de cualquier tamaño, con diseminación a 10 ganglios linfáticos axilares. -Diseminación a los ganglios linfáticos supraclaviculares. -Propagación tanto a los ganglios linfáticos axilares como a los ganglios mamaros internos.
Metastásico	
IV	Propagación del cáncer a otras partes del cuerpo como hígado, pulmón o hueso.

Tabla 1. Clasificación del cáncer de mama de acuerdo con la etapa (Modificado de Simos et al., 2015).

En cuanto a la clasificación histológica, la lesión más común es el carcinoma ductal, que es un grupo muy heterogéneo que comprende el 80% de todos los cánceres de mama. El segundo tipo más frecuente (10-20%) es el carcinoma lobulillar categorizado como lesiones negativas para E-cadherina. Los subtipos adicionales que incluyen tubular, mucinoso, medular, papilar, micropapilar y metaplásico, constituyen el 5% de todas las lesiones. Cada lesión puede clasificarse aún más evaluando tres características: formación tubular, pleomorfismo nuclear y actividad mitótica (Libson & Lippman, 2014).



*Figura 1. Tipos histológicos especiales de cáncer de mama preferentemente con receptor de estrógeno positivo. (A) Carcinoma tubular, (B) carcinoma cribiforme, (C) carcinoma lobular invasivo clásico, (D) carcinoma lobular invasivo pleomórfico, (E) carcinoma mucinoso, (F) carcinoma neuroendocrino, (G) carcinoma micropapilar, (H) carcinoma papilar, (I) carcinoma ductal invasivo de bajo grado con células gigantes similares a osteoclastos (Weigelt et al., 2010).*



*Figura 2. Tipos histológicos especiales de cáncer de mama preferentemente receptor de estrógeno negativo. (A) Carcinoma quístico adenoide, (B) carcinoma secretor, (C) carcinoma de células acínicas, (D) carcinoma apocrino, (E) carcinoma medular, (F) carcinoma metaplásico con elementos heterólogos, (G) carcinoma metaplásico con metaplasia escamosa, (H) carcinoma metaplásico de células fusiformes, (I) carcinoma metaplásico productor de matriz (Weigelt et al., 2010).*

En la clínica, la clasificación del cáncer de mama en subtipos moleculares se establece de acuerdo con los niveles de expresión del receptor de estrógeno (ER) y el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2). Eliyatkin y colaboradores presentan 4 subtipos moleculares y su correlación clínica e histológica (Tabla 2).

<b>Subtipo molecular</b>	<b>Propiedades clínicas y biológicas</b>	<b>Correlación histológica</b>	<b>Pronóstico</b>
Luminal A	50% del cáncer invasivo ER/PR + HER2/neu -	Carcinoma tubular Carcinoma cribiforme Carcinoma lobular invasivo clásico Carcinoma ductal invasivo de bajo grado	Bueno
Luminal B	20% del cáncer invasivo Mayor proliferación que luminal A ER/PR + HER2/neu +/-	Carcinoma ductal invasivo Carcinoma micropapilar	No tan bueno como luminal A
HER2/neu	15% del cáncer invasivo Proliferación alta ER/PR - HER2/neu +	Carcinoma ductal invasivo de alto grado	Usualmente desfavorable
Basal like (triple negativo)	~15% del cáncer invasivo Proliferación alta ER/PR - HER2/neu -	Carcinoma ductal invasivo de alto grado Carcinoma metaplásico Carcinoma medular	Usualmente muy malo

Tabla 2. Principales subtipos moleculares de cáncer de mama y su pronóstico (Eliyatkin et al., 2015).

### 2.1.3 Tratamientos

La Guía de Práctica Clínica para el Diagnóstico y Tratamiento del Cáncer de Mama en Segundo y Tercer nivel de Atención de la Secretaría de Salud de México propone diversas recomendaciones de tratamientos basadas en guías como American Society of Clinical oncology, Guía Clínica del gobierno de Chile, Clinical Practice Guidelines in Oncology, SIGN, NHS, entre otras. A cada paciente se le ofrecen diversas opciones de tratamiento dependiendo del tipo de cáncer que presente y la etapa en la que se encuentre. El uso de terapia adyuvante se valora conforme a los criterios de Van Nuys. Los tratamientos que pueden brindarse se encuentran especificados en la tabla 3.

Etapa	Tratamiento primario	Terapia adyuvante		
		ER/PR -	ER/PR +	Sobreexpresión de HER2
0 Lobular	No se recomienda tratamiento, en algunos casos profilaxis con tamoxifen	-	-	-
0 Ductal	Lumpectomía o mastectomía y radioterapia en caso de ser extensivo	-	-	-
I y II	Lumpectomía y radiación	Quimioterapia	Quimioterapia y terapia endocrina	Quimioterapia y trastuzumab
III	Quimioterapia de inducción, lumpectomía o mastectomía y radiación	Quimioterapia de inducción	Quimioterapia de inducción y terapia endocrina postoperatoria	Quimioterapia de inducción y trastuzumab postoperatorio
IV	Radiación	Quimioterapia	Terapia endocrina con o sin quimioterapia	Trastuzumab con o sin quimioterapia

Tabla 3. Tratamientos típicos para cáncer de mama según la etapa (Maughan et al., 2010).

Una vez completado el tratamiento primario, el examen físico debe realizarse cada 3 a 6 meses durante 3 años. A partir del cuarto y quinto año, debe realizarse cada 6 a 12 meses. A partir del sexto año libre de enfermedad, el examen físico se realiza anualmente.

El uso de radiación y quimioterapias está limitado por la toxicidad del tratamiento y el desarrollo de resistencia a estas terapias. La toxicidad que resulta de la quimioterapia afecta sustancialmente la calidad de vida de los pacientes y aproximadamente 40% de los pacientes sufren recurrencia de la enfermedad y mueren por metástasis. El tratamiento con trastuzumab induce cierto grado de toxicidad cardíaca, y aproximadamente la mitad de los pacientes experimentan una recaída de la enfermedad dentro de los 3 años siguientes (Chaurasiya & Fong, 2020).

Los efectos secundarios a corto y largo plazo de las terapias utilizadas actualmente para erradicar el cáncer son diversos y dependen de diversos factores. Problemas focales

relacionados con las terapias locales pueden ser dolor después de la cirugía por lesiones a músculos y ligamentos, linfedema, restricción de la movilidad de brazos y hombros. Problemas sistémicos relacionados con el tratamiento pueden ser neuropatía, menopausia prematura, enfermedad cardiovascular (Ewertz & Jensen, 2011).

## *2.2 Vía RAF/MEK/ERK*

RAS es el principal regulador de diversos mecanismos de señalización relacionados con la homeostasis celular como lo son el crecimiento, la proliferación, integridad del citoesqueleto, adhesión, migración, diferenciación y supervivencia. En condiciones normales, su activación es regulada por GAP. Las mutaciones en este gen ocurren en aproximadamente el 33% de todos los cánceres, con una prevalencia de entre 7 y 12% en cáncer de mama. Estas mutaciones pueden conducir a un aumento de la producción de proteínas y alterar el microambiente tumoral, sobreactivando así la vía y promoviendo la tumorigénesis (Roskoski, 2019; Khan et al., 2019).

La función normal de MAPK/ERK también es responsable de la supresión tumoral a través de la inducción de la senescencia, ubiquitinación y degradación de proteínas necesarias para la actividad y supervivencia del ciclo celular. La activación anormal por RAS provoca la degradación de las proteínas necesarias para la migración y progresión a través del ciclo celular. Las mutaciones pueden desregular la actividad de la cinasa e hiperactivar la vía durante la inducción y progresión de la tumorigénesis (Burotto et al., 2014).

Las MAP cinasas ERK1/2 son activadas por prácticamente todos los factores de crecimiento y citocinas que actúan a través de receptores tirosina cinasas, receptores de citocinas o receptores acoplados a proteína G. La unión del ligando al receptor de tirosina cinasas induce la dimerización del receptor y la autofosforilación de residuos de tirosina específicos en la región C-terminal. Esto genera sitios de unión para proteínas adaptadoras, como la proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento (GRB2), que recluta al factor de intercambio de nucleótidos de guanina Sos en la membrana plasmática. Sos activa a Ras unido a la membrana catalizando el reemplazo de GDP por GTP. En su forma unida a GTP, Ras recluta a Raf, este actúa como MAP cinasa cinasa cinasa (MAPKKK) y activa las MAP

cinasa cinasa (MAPKKs) MEK1 y MEK2 que, a su vez, catalizan la activación de las MAP cinasa efectoras ERK1 y ERK2. Una vez activados, ERK1/2 fosforilan diversos sustratos nucleares y citoplasmáticos como MSK1, RSK, MNK1, ELK-1 y SAP-1 implicados en proliferación celular, supervivencia, diferenciación, motilidad y angiogénesis (Figura 3) (Cook et al., 2017; Frémin & Meloche, 2010; Wortzel & Seger Rony, 2011).

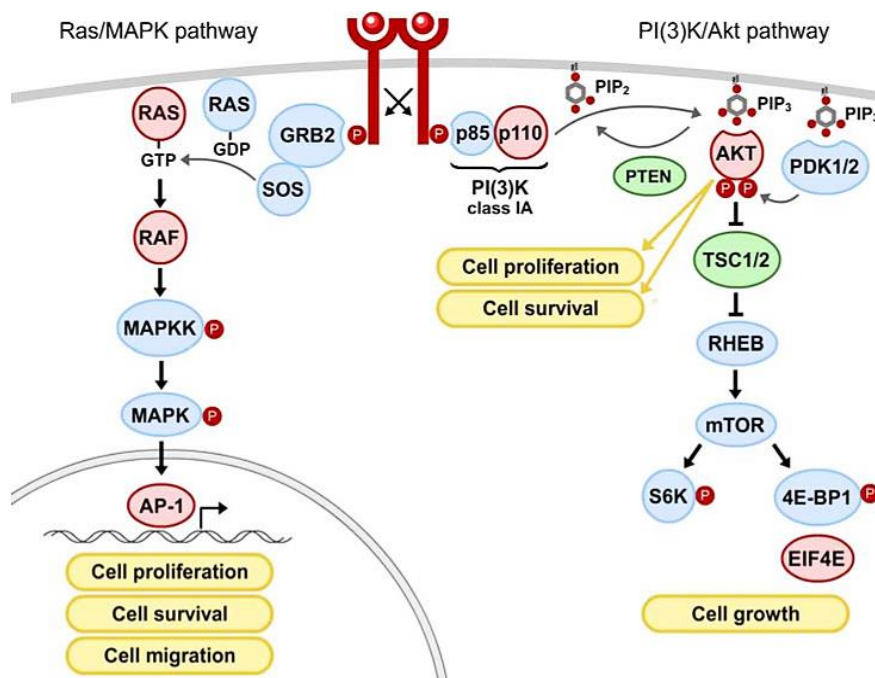


Figura 3. Activación de las vías RAS/MAPK y PI3K mediante señalización de receptores tirosina cinasa (RTK) (Haglund et al., 2007).

Aunque las mutaciones en RAS no son tan comunes en cáncer de mama, diversos autores demuestran que la expresión constitutiva de ERK, causada por factores de crecimiento y señalización hormonal, también juega un papel importante en el desarrollo del cáncer de mama y su mal pronóstico, ocasionando una señalización aberrante, proliferación incontrolada y el silenciamiento de la maquinaria de muerte celular. Debido a esto, se han realizado diversos experimentos *in vitro* e *in vivo* con inhibidores de MAPK en combinación con quimioterapia o terapia inmune, obteniéndose mejores resultados con un inhibidor de MEK de segunda generación: PD0325901. Este compuesto tiene superiores

propiedades farmacológicas y biofarmacéuticas, incluyendo una biodisponibilidad oral mucho mejor y una duración más prolongada de la supresión de MEK (Dhillon et al., 2007; Lake et al., 2016; Osborne & Schiff, 2011; Rinehart et al., 2004; Shao et al., 2018).

### 2.3 Morfología y dinámica mitocondrial

Las mitocondrias son organelos celulares que tienen la función de proporcionar energía a la célula a través de diferentes procesos como la producción de ATP, gluconeogénesis, producción de cuerpos cetónicos, degradación y elongación de lípidos, entre otros. Se ha descrito también su importancia en la señalización celular y la progresión del cáncer (Maycotte et al., 2017).

La dinámica mitocondrial es el equilibrio que existe entre la fusión (mitocondrias con túbulos largos interconectados) y la fisión (mitocondrias pequeñas y fragmentadas). Se han asociado diversas funciones y procesos celulares con la morfología mitocondrial (Figura 4).

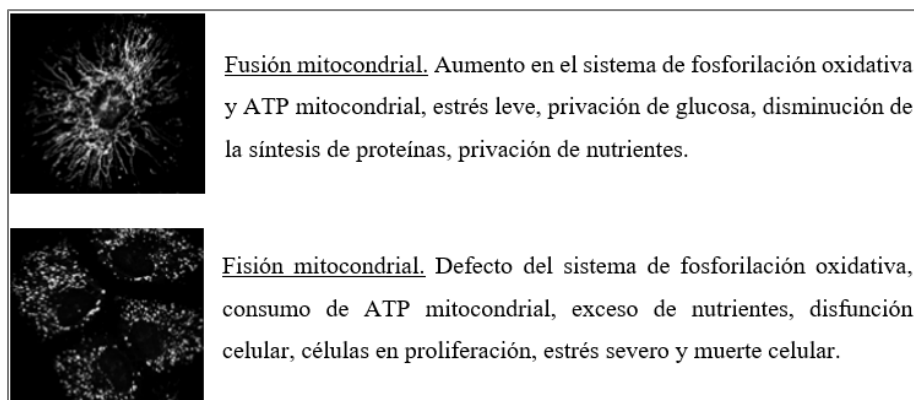


Figura 4. Morfología mitocondrial y funciones celulares asociadas (Maycotte et al., 2017).

En procesos tumorigénicos, la dinámica mitocondrial se ve alterada por cambios en el estado fisiológico de las células. En la revisión realizada por Maycotte y colaboradores, se demuestra que diversas líneas de células cancerosas o células que han sido transformadas con oncogenes en diferentes experimentos tienen más mitocondrias fragmentadas que los controles no oncogénicos. Asimismo, la mayoría de los estudios sobre morfología

mitocondrial en células tumorales indican que la fisión mitocondrial promueve un papel protumorigénico (Kashatus et al., 2015).

La proteína 1 relacionada con la dinamina (DRP1) es una GTPasa que es fosforilada directamente por ERK2, esta es la encargada de mediar la fisión de la membrana mitocondrial, dando como resultado una morfología mitocondrial fragmentada. La fisión mitocondrial promueve el crecimiento tumoral en conjunto con mecanismos de proliferación, angiogénesis, migración, etc. Se ha observado que, al silenciar a esta proteína en células tumorales, se previenen estos mecanismos y se incrementa la apoptosis, por lo que demuestra ser un blanco terapéutico importante (Serasinghe et al., 2015).

### **3. Justificación**

Los tratamientos actuales son insuficientes para curar el cáncer de mama triple negativo y normalmente están asociados a efectos secundarios graves, deteriorando la calidad de vida de la paciente, incluso más que la enfermedad misma. Por lo tanto, es necesario desarrollar nuevos enfoques terapéuticos que contribuyan a mejorar su calidad de vida.

La vía RAF/MEK/ERK ha sido ampliamente estudiada en los últimos años, por lo que se conoce su implicación en el desarrollo del cáncer. Las células de cáncer de mama, principalmente triple negativo, presentan en su mayoría una morfología mitocondrial fragmentada y se sabe que pueden tener esta vía sobreactivada dado que, si un tumor demuestra dependencia de ella, es posible que sea sensible a los inhibidores de RAF y MEK. Por lo tanto, se pretende dilucidar si la inhibición de MEK tiene relación directa con los cambios en la morfología mitocondrial y si este mecanismo pudiera ser un blanco terapéutico potencial para el tratamiento del cáncer de mama TN.

### **4. Hipótesis**

La inhibición de la fosforilación constitutiva de ERK con PD0325901 induce cambios en la fragmentación mitocondrial en células de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231 y MDA-MB-468.

## 5. Objetivos

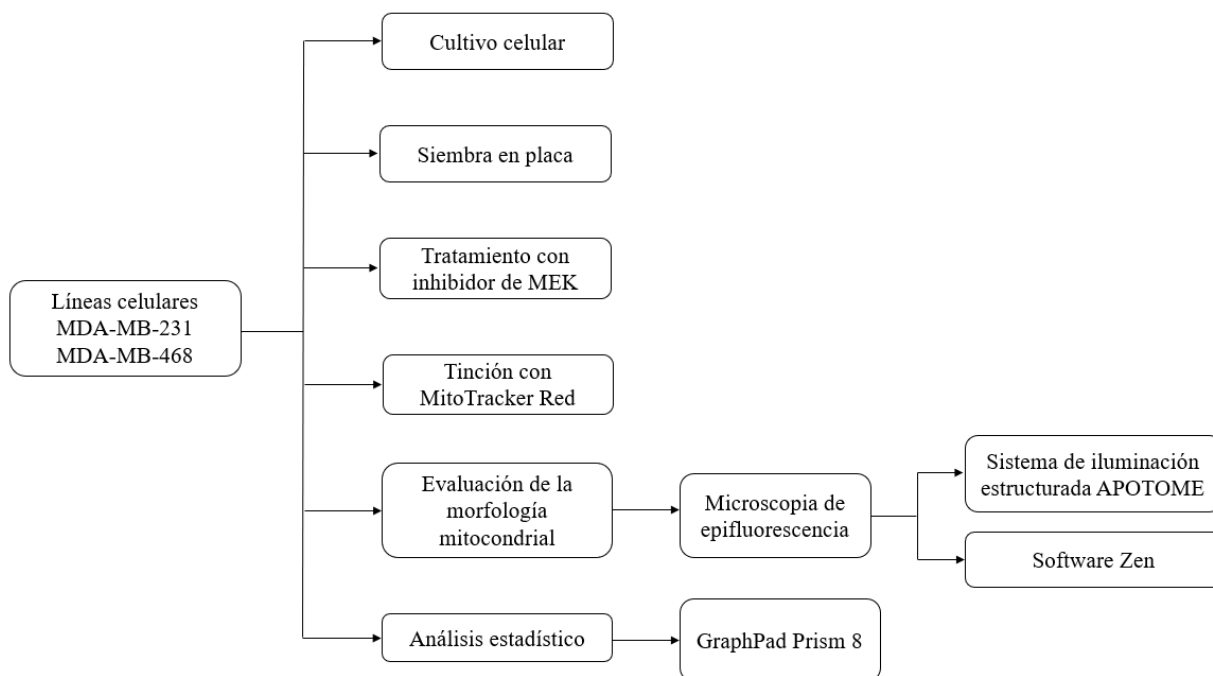
### 5.1 Objetivo general

Evaluar si la inhibición de la fosforilación constitutiva de ERK en las líneas celulares MDA-MB-231 y MDA-MB-468 tiene un papel importante en la morfología mitocondrial.

### 5.2 Objetivos específicos

- Inhibir MEK por acción del PD0325901 en las líneas celulares MDA-MB-231 y MDA-MB-468.
- Caracterizar la morfología mitocondrial en los grupos de estudio mediante microscopía de epifluorescencia.
- Identificar las diferencias significativas entre los grupos control y problemas mediante un análisis estadístico no paramétrico.

## 6. Diagrama de trabajo



## **7. Metodología**

### *7.1 Cultivo celular*

Para este trabajo se utilizaron las líneas celulares MDA-MB-231 y MDA-MB-468. Ambas son de adenocarcinoma de mama humano metastásico altamente agresivo, presentan morfología epitelial (MDA-MB-468) o mesenquimal (MDA-MB-231), carecen de receptores ER, PR y HER2. La MDA-MB-231 tiene una mutación en el gen KRAS lo que mantiene la vía de ERK constitutivamente activada y la MDA-MB-468 presenta sobreexpresión del EGFR, por lo que la vía de ERK también se encuentra sobreactivada (Chavez et al., 2010).

Estas líneas celulares fueron cultivadas en medio DMEM-Ham's F12 suplementado con suero fetal bovino (SFB) Biowest al 10% y 1% de antibiótico penicilina-estreptomicina de Caisson en frascos T25 de 50 mL de poliestireno. Las células fueron incubadas a 37°C con 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) de acuerdo con las recomendaciones de la American Type Culture Collection.

### *7.2 Siembra en placa de 6 pozos*

Se requiere sembrar aproximadamente 100,000 células tumorales de cada línea celular en cada pozo, para lo cual se extrajo el medio de cultivo de cada frasco T25 en donde se encontraban adheridas las células y se realizó un lavado con 1 mL de buffer fosfato salino, después de remover la solución PBS se agregaron 500 µL de tripsina 1x y se incubó por 10 minutos para romper los enlaces proteicos entre las células y así poder obtener una suspensión de estas. Posteriormente se inactivó la tripsina con 500 µL de medio DMEM-Ham's F12 suplementado con suero bovino fetal al 10% y se transfirieron las células de cada línea celular a un tubo cónico. Ambos tubos se centrifugaron a 2,500 rpm durante 5 minutos, se les retiró el medio de cultivo sobrenadante y al pellet resultante se le agregó 1 mL de medio F12 suplementado. Se procedió a realizar el conteo en una cámara de Neubauer de cristal con 2 compartimentos, a cada compartimento se le agregaron 10 µL del contenido de cada tubo cónico, encontrándose en el compartimento 1 las células de la línea MDA-MB-231 y en el compartimento 2 las células de la línea MDA-MB-468. La cámara

fue observada en un microscopio invertido para cultivo celular. El conteo se realizó en los 4 cuadrantes de leucocitos, se sumó la cantidad de células hallada en cada cuadrante, se calculó su promedio y se multiplicó por 10 para calcular el número de células por microlitro. El número de células deseado (100,000) fue dividido entre la cantidad resultante (número de células por microlitro) para saber cuántos microlitros de cultivo deben agregarse en cada pozo y así tener aproximadamente 100,000 células en cada uno. En cada pozo de una placa de 6 pozos, se colocó 1 cubreobjetos de 20x20 mm y sobre este se agregó 1.5 mL de medio F12 suplementado y la cantidad requerida de cada tubo cónico, encontrándose en la fila A la línea celular MDA-MB-231 y en la fila B la línea celular MDA-MB-468. La placa se incubó a 36°C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 h para la línea MDA-MB-231 y durante 48 h para la línea MDA-MB-468. Este procedimiento se encuentra esquematizado en la figura 5.

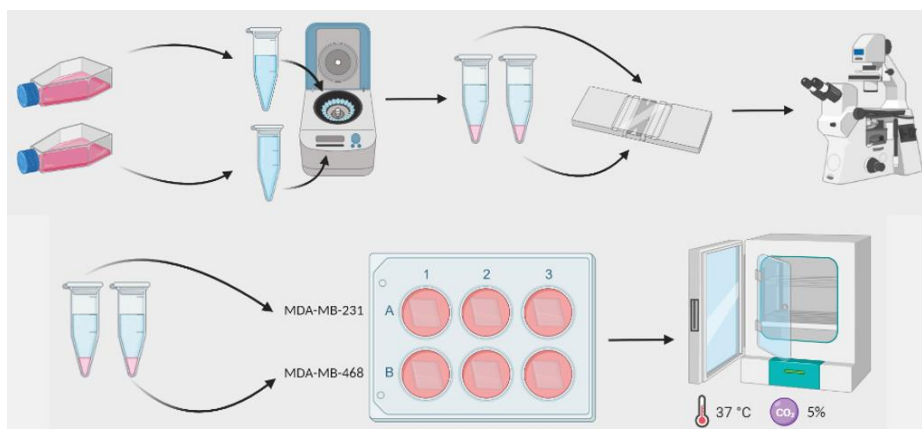


Figura 5. Esquema del procedimiento de la siembra en placa de 6 pozos.

### 7.3 Tratamiento con inhibidor de MEK

Después del tiempo de incubación respectivo de cada línea celular, se observó cada pozo en el microscopio invertido con un objetivo de 40x para revisar la confluencia. Se busca obtener una confluencia de aproximadamente 80% para que sea fácil visualizar las células al microscopio, que estas no se encuentren demasiado cerca y así sea posible delimitar el área de cada una.

Se utilizó el inhibidor PD0325901 de Sigma Aldrich con dimetilsulfóxido (DMSO) de Sigma Aldrich como vehículo. El stock de trabajo se preparó a una concentración de 20  $\mu$ M, para lo cual se utilizó 1  $\mu$ L de PD con una concentración de 20 mM y 1 mL de DMSO. En un tubo cónico (Tubo 1, Figura 6) se agregó 1 mL de medio F12 suplementado, en otro tubo (Tubo 2, Figura 6) se agregó 1 mL de medio F12 suplementado y 1  $\mu$ L de DMSO para utilizarse como control con vehículo, finalmente en un tercer tubo cónico se agregó 1 mL de medio F12 suplementado y 1  $\mu$ L del stock de trabajo para obtener una solución de 20 nM de MEKi para el tratamiento (Tubo 3, Figura 6). Se retiró el medio de cultivo de cada pozo y se hizo un lavado con buffer PBS 1x para posteriormente agregar el contenido de los tubos a cada pozo, encontrándose en el pozo #1 1 mL de medio F12 suplementado, en el pozo #2 1 mL de medio F12 suplementado con 1  $\mu$ L de DMSO (vehículo) y en el pozo #3 1 mL de medio F12 suplementado y 1  $\mu$ L del stock de trabajo (PD0325901 20 nM). Se dejó incubar a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> por 15 minutos (Figura 6). Posteriormente, se trataron con MitoTracker Red como se describe a continuación.

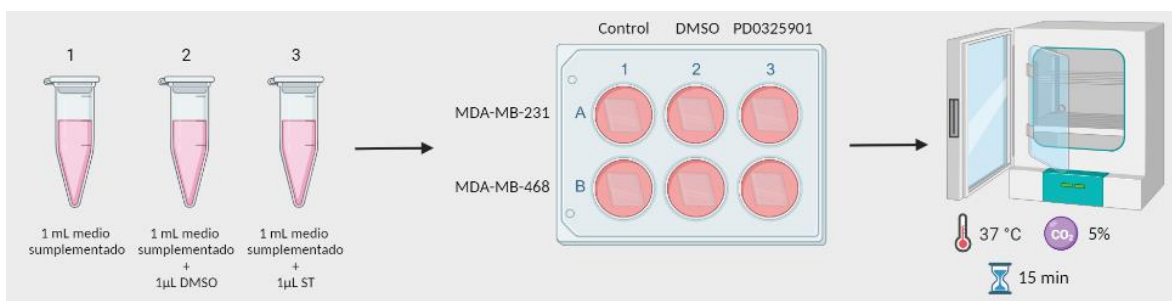


Figura 6. Esquema del tratamiento con PD0325901.

#### 7.4 Tinción con MitoTracker Red

Este procedimiento debe realizarse en ausencia de luz. De acuerdo con lo observado en experimentos anteriores (Goyri, M. 2016), se sabe que la tinción debe tener una concentración de 250 nM para que la morfología mitocondrial pueda ser observada con nitidez en la microscopía de epifluorescencia con un sistema de iluminación estructurada Apotome.2, para lo cual se requiere tener un stock de trabajo con una concentración de 10

μM. Para esto se tomaron 1.5 μL de colorante MitoTracker™ Red CMXRos con una concentración de 1 mM, este se adicionó a 150 μL de medio F12 sin suplementar, pues el colorante es sensible a la oxidación por las oxidasas presentes en el suero. En tres tubos cónicos se agregaron 500 μL de medio F12 suplementado y 37.5 μL de stock de trabajo en el tubo 1; 500 μL de medio F12 suplementado, 37.5 μL de stock de trabajo y 0.5 μL de DMSO en el tubo 2, 500 μL de medio F12 suplementado, 37.5 μL de stock de trabajo y 0.5 μL de stock de trabajo con PD en el tubo 3. Pasados los 15 minutos de incubación con el tratamiento, se agregó el contenido de cada tubo a cada pozo respectivamente y se incubó la placa a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> por 45 minutos.

Después del tiempo de incubación, se retiró el medio con colorante y se realizaron dos lavados, uno con 1 mL de medio F12 sin suplementar y otro con 1 mL de medio F12 suplementado, cada lavado tuvo una duración de 30 segundos. Se procedió a montar cada cubreobjetos en portaobjetos, para lo cual se añadió 1 gota de 10 μL de medio F12 suplementado sobre la mitad superior del portaobjetos y otra sobre la mitad inferior del mismo, en otro portaobjetos se colocó de la misma manera el cubreobjetos de las células control. Se colocó cada cubreobjetos con las células cara abajo sobre el portaobjetos y se rotularon, se sellaron con barniz de uñas y se dejaron secar para su posterior observación al microscopio de epifluorescencia (Figura 7).



Figura 7. Esquema de la tinción con MitoTracker Red.

### *7.5 Evaluación de la morfología mitocondrial*

Las células fueron observadas inmediatamente después de haber realizado la tinción, ya que al estar montadas en el portaobjetos las células no se encuentran en su temperatura ni concentración óptima de CO<sub>2</sub>, por lo que la morfología mitocondrial puede verse afectada si se deja pasar tiempo. Se realizó la observación en un microscopio de epifluorescencia PALM ZEISS con un objetivo de 63x con aceite de inmersión y un sistema de iluminación estructurada ApoTome.2 y software ZEN. Se tomaron de 10 a 15 fotos por experimento, los campos fotografiados fueron elegidos al azar. Posteriormente, se editó cada foto con Paint 3D para obtener fotos individuales de cada mitocondria y poder clasificarlas en 3 categorías: tubulares, intermedias y fragmentadas. Los criterios de clasificación se especifican en la tabla 4.

### *7.6 Análisis estadístico*

Para saber si hay diferencias entre la morfología mitocondrial de las dos líneas celulares de estudio, se realizó el análisis Mann-Whitney, considerando un nivel de significancia  $p < 0.05$ . Los resultados del tratamiento con MEK<sub>i</sub> fueron analizados mediante la prueba Kruskal-Wallis, considerando un nivel de significancia  $p < 0.05$ . Ambos análisis fueron realizados con el software GraphPad Prism 8.

## **8. Discusión de resultados**

Diversos procesos de gran importancia para el funcionamiento de las mitocondrias están relacionados al equilibrio entre la fusión y fisión de estas, lo que sugiere que los cambios en la morfología mitocondrial pueden ser la base de muchos de los fenotipos que impulsan el crecimiento tumoral (Kashatus et al., 2015), por lo tanto, la morfología mitocondrial es de suma importancia. A pesar de que no puede ser medida ni cuantificada con exactitud debido a que es un proceso dinámico, en el presente trabajo se proponen características que describen a cada categoría de clasificación morfológica (Tabla 4).

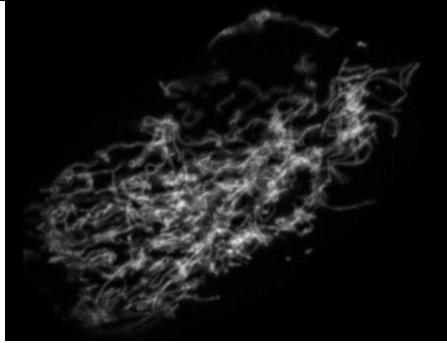
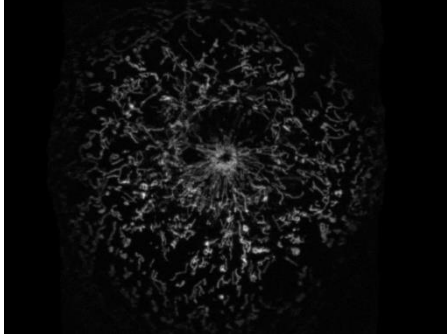
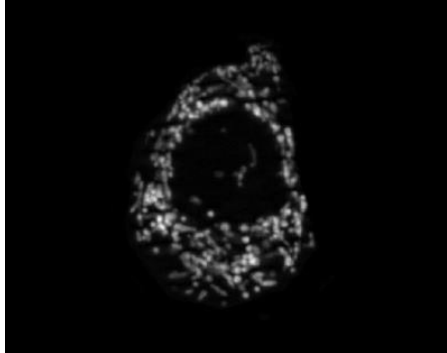
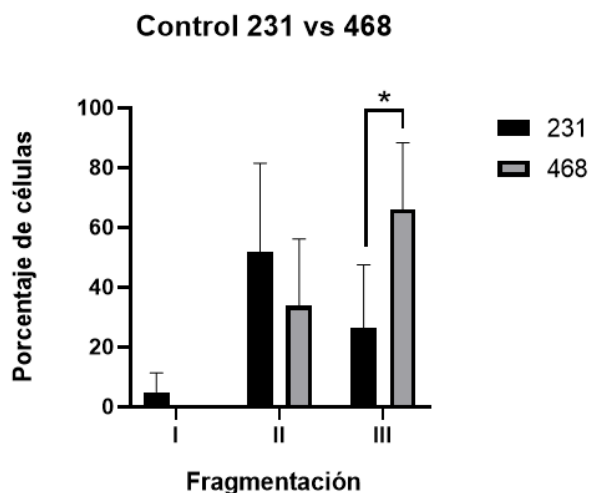
Categoría de clasificación	Características	Imagen representativa
I Tubulares	El 90-100% de los túbulos que se observan son largos (con una longitud mayor a 4 $\mu\text{m}$ aproximadamente) y brindan continuidad al organelo.	
II Intermedias	Se observan mitocondrias con 30-80% de túbulos y fragmentos. El organelo puede tener continuidad en unas partes y en otras no.	
III Fragmentadas	Se observa un 90-100% de fragmentos mitocondriales, con una longitud menor a 3 $\mu\text{m}$ aproximadamente. No hay continuidad en el organelo.	

Tabla 4. Criterios de clasificación de la morfología mitocondrial. Elaboración propia.

Al realizar la cuantificación y clasificación de las mitocondrias, se observaron diferencias entre la morfología mitocondrial de las dos líneas celulares de estudio, por lo tanto, se realizó la prueba estadística Mann-Whitney para saber si estas son significativas, encontrándose que la línea celular MDA-MB-468 presenta un mayor porcentaje de mitocondrias fragmentadas en comparación con la línea celular MDA-MB-231 (Figura 8). Sun y colaboradores describen que la línea MDA-MB-231 es más invasiva, pues esta presenta una proporción FAD/NADH más alta que otras líneas celulares TN, por lo cual

estas células podrían presentar una morfología mitocondrial que tienda más a mantener el equilibrio en su dinámica. El efecto río abajo de la mutación en KRAS presente en la línea MDA-MB-231 es muy poderoso, pues la mutación mantiene una señalización continua de la vía, al contrario de lo que ocurre en la línea MDA-MB-468 en donde la señalización de la vía depende de la cantidad de EGF existente en el medio y de la intensidad de su señalización. Esto también explica por qué la línea MDA-MB-231 es la más invasiva. Es importante recordar que esto es un proceso dinámico y los resultados dependerán de la etapa del ciclo celular en que se encuentren las células tumorales y qué función están cumpliendo (invasión, migración, proliferación, etc.), para lo cual sería interesante, por ejemplo, estudiar las funciones metabólicas de las células que acaban de realizar el proceso de invasión y compararlas con las que no lo han hecho para observar si hay diferencias entre ellas y conocer su importancia en los procesos cancerosos.



*Figura 8. Morfología mitocondrial de las líneas celulares MDA-MB-231 y MDA-MB-468. Se encontraron diferencias significativas entre la categoría III (fragmentadas). Las mitocondrias de la línea celular MDA-MB-468 presentan mayor número de mitocondrias fragmentadas en comparación con las de la línea celular MDA-MB-231. MDA-MB-231 N=6, MDA-MB-468 N=5, MANN-WHITNEY, P<0.05.*

En la investigación realizada por Acosta y colaboradores en 2020, se estandarizó el tratamiento con MEKi, siendo 20 nM la concentración más baja que inhibió considerablemente la fosforilación de ERK1/2 y 60 minutos el tiempo más corto en el que se observó una máxima inhibición. Después de promover la inhibición de MEK con las condiciones previamente mencionadas, se procedió a caracterizar la morfología mitocondrial de los grupos de estudio mediante microscopía de epifluorescencia, proceso en el cual se observó que en las células control de la línea celular MDA-MB-231 predominan mitocondrias de morfología intermedia con mayor porcentaje de túbulos que de fragmentos, se pueden observar también algunos organelos completamente tubulares. En cambio, en las células control de la línea celular MDA-MB-468 no se encontró ninguna mitocondria con morfología tubular y en la mayoría presentan morfología fragmentada (Figura 9). Este tipo de morfología mitocondrial se encuentra mayormente en células tumorales TN y se asocia al grado de malignidad que estas presentan (Sarmiento-Salinas FL et al., 2019; Goyri, M., 2016).

Al realizar el análisis estadístico, no se encontraron diferencias significativas entre las células control y a las que solamente se les aplicó el vehículo (DMSO). A pesar de observarse una tendencia a inducir fragmentación en las células MDA-MB-231, estos cambios no fueron significativos, por lo que se puede decir que el vehículo no causó ningún efecto importante en la morfología mitocondrial de estas. En las células tratadas con MEKi, se observó una tendencia a disminuir la fragmentación mitocondrial pues hay una ligera disminución en la categoría III en ambas líneas celulares al compararse con el vehículo, sin embargo, estas diferencias no fueron significativas (Figura 9).

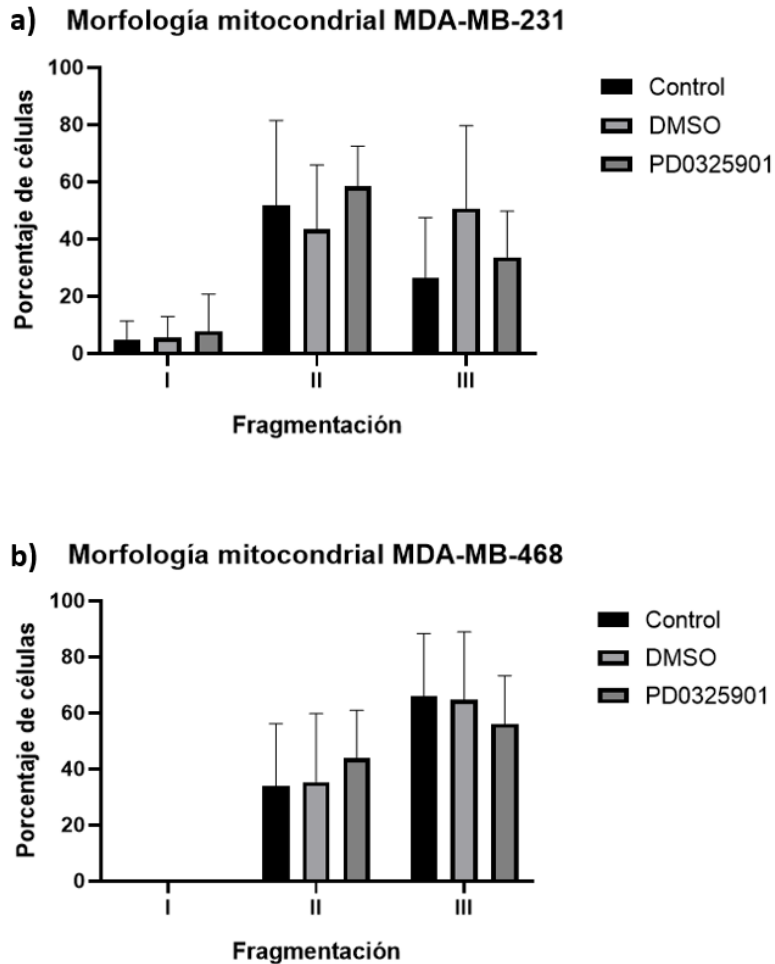


Figura 9. Tipos de fragmentación en las líneas celulares MDA-MB-231 y MDA-MB-468. No se encontraron diferencias significativas entre el control, la administración del vehículo y el tratamiento con el inhibidor de MEK. MDA-MB-231 N=6, MDA-MB-468 N=5, KRUSKAL-WALLIS, +/- SD,  $P < 0.05$ .

En investigaciones previas se comprobó que la vía de ERK participa en procesos de migración celular, pero no en procesos de proliferación ni apoptosis (Acosta, D., 2020). Partiendo de esa premisa, en este trabajo se buscó conocer si la vía también participa en los procesos de dinámica mitocondrial mediante la modificación de la morfología mitocondrial. Dado que no se encontraron diferencias significativas entre el tratamiento y los controles, se puede sugerir que esto se debe a diversas causas como la activación de otra vía como mecanismo de compensación, que la fosforilación de ERK no participa en el

desequilibrio de la función mitocondrial de las células cancerígenas o que el cambio inducido por la inhibición de MEK en la morfología mitocondrial es tan ligero que no puede ser cuantificado por los métodos utilizados, para lo cual se sugiere utilizar métodos más sensibles como la medición de especies reactivas de oxígeno mitocondriales o la función mitocondrial por experimentos metabólicos. Los resultados sugieren que, en líneas celulares de cáncer de mama triple negativo, ERK no regula la dinámica mitocondrial y que los efectos de MEKi reportados anteriormente sobre la migración celular probablemente son independientes de la morfología mitocondrial en estas células.

## **9. Conclusiones**

Debido a que se ha demostrado que ERK2 fosforila directamente a DRP1, se esperaba que la activación de la vía indujera cambios en la fragmentación mitocondrial de las células de cáncer de mama triple negativo, pero los experimentos realizados sugieren que la inhibición de la fosforilación constitutiva de ERK con PD0325901 no induce cambios en la morfología mitocondrial en las líneas celulares MDA-MB-231 y MDA-MB-468.

Queda por descubrir si ERK u otras vías de señalización participan en los cambios de la morfología de las células tumorales y será interesante realizar experimentos inhibiendo otras vías como la de PI3K o STAT3 para comprobar si estas se activan como un mecanismo de compensación ante la inhibición de ERK y si participan en la alteración de la dinámica mitocondrial, además de evaluar la actividad de CDK1 para comprobar si puede estar fosforilando a DRP1 ante la inhibición de ERK y con esto identificar otros posibles blancos terapéuticos para el cáncer de mama triple negativo con efectos sobre la dinámica mitocondrial.

## Bibliografía

- Burotto, M., Chiou, V. L., Lee, J. M., & Kohn, E. C. (2014). The MAPK pathway across different malignancies: A new perspective. In *Cancer* (Vol. 120, Issue 22, pp. 3446–3456). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/cncr.28864>
- Chaurasiya, S., & Fong, Y. (2020). Viroimmunotherapy for breast cancer: promises, problems and future directions. In *Cancer Gene Therapy*. Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41417-020-00265-6>
- Chavez, K. J., Garimella, S. v., & Lipkowitz, S. (2010). Triple Negative Breast Cancer Cell Lines: One Tool in the Search for Better Treatment of Triple Negative Breast Cancer. *Breast Dis.*, 35–48.
- Cook, S. J., Stuart, K., Gilley, R., & Sale, M. J. (2017). Control of cell death and mitochondrial fission by ERK1/2 MAP kinase signalling. In *FEBS Journal* (Vol. 284, Issue 24, pp. 4177–4195). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/febs.14122>
- Dhillon, A. S., Hagan, S., Rath, O., & Kolch, W. (2007). MAP kinase signalling pathways in cancer. In *Oncogene* (Vol. 26, Issue 22, pp. 3279–3290). <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210421>
- Eliyatkin, N., Yalcin, E., Zengel, B., Aktaş, S., & Vardar, E. (2015). Molecular Classification of Breast Carcinoma: From Traditional, Old-Fashioned Way to A New Age, and A New Way. *Journal of Breast Health*, 11(2), 59–66. <https://doi.org/10.5152/tjbh.2015.1669>
- Ewertz, M., & Jensen, A. B. (2011). Late effects of breast cancer treatment and potentials for rehabilitation. *Acta Oncologica*, 50(2), 187–193. <https://doi.org/10.3109/0284186X.2010.533190>
- Frémin, C., & Meloche, S. (2010). From basic research to clinical development of MEK1/2 inhibitors for cancer therapy. In *Journal of Hematology and Oncology* (Vol. 3). <https://doi.org/10.1186/1756-8722-3-8>

- Haglund, K., Rusten, T. E., & Stenmark, H. (2007). Aberrant receptor signaling and trafficking as mechanisms in oncogenesis. In *Critical Reviews in Oncogenesis* (Vol. 13, Issue 1, pp. 39–74). Begell House Inc. <https://doi.org/10.1615/critrevoncog.v13.i1.20>
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, *12*, 31–46.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. In *Cell* (Vol. 144, Issue 5, pp. 646–674). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- INEGI. (2021). *ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA MUNDIAL CONTRA EL CÁNCER. COMUNICADO DE PRENSA NÚM. 105/21.*
- Institute, N. C. (2015). What Is Cancer? A Collection Differences between Cancer Cells and Normal Cells. *National Cancer Institute (NIH)*, 1–10. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
- Kashatus, J. A., Nascimento, A., Myers, L. J., Sher, A., Byrne, F. L., Hoehn, K. L., Counter, C. M., & Kashatus, D. F. (2015). Erk2 phosphorylation of Drp1 promotes mitochondrial fission and MAPK-driven tumor growth. *Molecular Cell*, *57*(3), 537–551. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.01.002>
- Lake, D., Corrêa, S. A. L., & Müller, J. (2016). Negative feedback regulation of the ERK1/2 MAPK pathway. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 73, Issue 23, pp. 4397–4413). Birkhauser Verlag AG. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2297-8>
- Libson, S., & Lippman, M. (2014). A review of clinical aspects of breast cancer. *International Review of Psychiatry*, *26*(1), 4–15. <https://doi.org/10.3109/09540261.2013.852971>
- Maughan, K. L., Lutterbie, M. A., & Ham, P. S. (2010). Treatment of breast cancer. *American Family Physician*, *81*(11), 1339–1346. <https://doi.org/10.1056/nejm199810013391407>

- Maycotte, P., Marín-Hernández, A., Goyri-Aguirre, M., Anaya-Ruiz, M., Reyes-Leyva, J., & Cortés-Hernández, P. (2017). Mitochondrial dynamics and cancer. In *Tumor Biology* (Vol. 39, Issue 5). SAGE Publications Ltd. <https://doi.org/10.1177/1010428317698391>
- Osborne, C. K., & Schiff, R. (2011). Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer. *Annual Review of Medicine*, 62, 233–247. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-070909-182917>
- Ott, J. J., Ullrich, A., Mascarenhas, M., & Stevens, G. A. (2011). Global cancer incidence and mortality caused by behavior and infection. *Journal of Public Health*, 33(2), 223–233. <https://doi.org/10.1093/pubmed/fdq076>
- Rinehart, J., Adjei, A. A., LoRusso, P. M., Waterhouse, D., Hecht, J. R., Natale, R. B., Hamid, O., Varterasian, M., Asbury, P., Kaldjian, E. P., Gulyas, S., Mitchell, D. Y., Herrera, R., Sebolt-Leopold, J. S., & Meyer, M. B. (2004). Multicenter phase II study of the oral MEK inhibitor, CI-1040, in patients with advanced non-small-cell lung, breast, colon, and pancreatic cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 22(22), 4456–4462. <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.01.185>
- Santarpia, L., Lippman, S. M., & El-Naggar, A. K. (2012). Targeting the MAPK/RAS/RAF signaling pathway in cancer therapy. In *Expert Opinion on Therapeutic Targets* (Vol. 16, Issue 1, pp. 103–119). <https://doi.org/10.1517/14728222.2011.645805>
- Sarmiento-Salinas, F. L., & et al. (2019). Breast Cancer Subtypes Present a Differential Production of Reactive Oxygen Species (ROS) and Susceptibility to Antioxidant Treatment Sarmiento Salinas. *Frontiers in Oncology*, 9.
- Serasinghe, M. N., Wieder, S. Y., Renault, T. T., Elkholi, R., Ascioia, J. J., Yao, J. L., Jabado, O., Hoehn, K., Kageyama, Y., Sesaki, H., & Chipuk, J. E. (2015). Mitochondrial division is requisite to RAS-induced transformation and targeted by oncogenic MAPK pathway inhibitors.

*Molecular Cell*, 57(3), 521–536.  
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.01.003>

Shao, G. L., Wang, M. C., Fan, X. L., Zhong, L., Ji, S. F., Sang, G., & Wang, S. (2018). Correlation between Raf/MEK/ERKs signaling pathway and clinicopathological features and prognosis for patients with breast cancer having axillary lymph node metastasis. *Technology in Cancer Research and Treatment*, 17. <https://doi.org/10.1177/1533034617754024>

Simos, D., Catley, C., Van Walraven, C., Arnaout, A., Booth, C. M., McInnes, M., Fergusson, D., Dent, S., & Clemons, M. (2015). Imaging for distant metastases in women with early-stage breast cancer: A population-based cohort study. *Cmaj*, 187(12), E387–E397. <https://doi.org/10.1503/cmaj.150003>

Sun, N., Xu, H. N., Luo, Q., & Li, L. Z. (2016). Potential indexing of the invasiveness of breast cancer cells by mitochondrial redox ratios. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 923, 121–127. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-38810-6\\_16](https://doi.org/10.1007/978-3-319-38810-6_16)

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>

Weigelt, B., Geyer, F. C., & Reis-Filho, J. S. (2010). Histological types of breast cancer: How special are they? In *Molecular Oncology* (Vol. 4, Issue 3, pp. 192–208). <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2010.04.004>

Woolston, C. (2015). Breast cancer. *Nature*, 527(7578), S101. <https://doi.org/10.1038/527S101a>

Wortzel, I., & Seger Rony. (2011). The ERK Cascade. *Monographs*, 2, 195–209.