



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE PUEBLA**

INSTITUTO FISIOLÓGIA



LABORATORIO DE NEUROENDOCRINOLOGÍA

**EFFECTO DEL COMPLEJO IGF/IGFR SOBRE LA CAPACIDAD PROLIFERATIVA Y
MIGRATORIA DE LA LÍNEA TUMORAL MDA-MB 231: PAPEL DE LA ACTIVACIÓN
DEL ER β**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS

PRESENTA

LBM. MAX ALEJANDRO MAXIMINO ROJAS

**DIRECTOR DE TESIS.
DR. EDUARDO MONJARAZ GUZMÁN.**

DICIEMBRE 2019

PUEBLA, PUE.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| ABREVIATURAS ----- | |
| RESUMEN ----- | 1 |
| ANTECEDENTES ----- | 3 |
| CÁNCER ----- | 3 |
| FISIOPATOLOGÍA ----- | 3 |
| EPIDEMIOLOGÍA ----- | 4 |
| CÁNCER EN MÉXICO ----- | 5 |
| CÁNCER DE MAMA ----- | 6 |
| PATOGENESIS ----- | 7 |
| TRANSICIÓN EPITELIO MESÉNQUIMAL ----- | 7 |
| EPIDEMIOLOGÍA GLOBAL ----- | 8 |
| EPIDEMIOLOGÍA NACIONAL ----- | 8 |
| SUBTIPOS DE CÁNCER DE MAMA ----- | 10 |
| ESTRÓGENOS Y CÁNCER ----- | 10 |
| RECEPTORES A ESTRÓGENOS Y SU ACTIVACIÓN ----- | 11 |
| RECEPTOR A ESTRÓGENOS BETA ----- | 12 |
| ER β Y EL CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO ----- | 13 |
| FACTORES DE CRECIMIENTO SIMILARES A INSULINA (IGF) ----- | 15 |
| RECEPTORES DE IGF (IGF-R) ----- | 16 |
| CÁNCER DE MAMA Y EL SISTEMA IGF ----- | 18 |
| ROL DEL SISTEMA DE IGF EN EL TNBC----- | 19 |

| | |
|---|----|
| PAPEL TERAPEUTICO DE IGF EN EL CÁNCER DE MAMA ----- | 20 |
| JUSTIFICACIÓN ----- | 21 |
| HIPÓTESIS ----- | 22 |
| OBJETIVOS ----- | 23 |
| GENERAL ----- | 23 |
| ESPECÍFICOS ----- | 23 |
| METODOLOGÍA ----- | 24 |
| CULTIVO CELULAR ----- | 24 |
| EXPERIMENTOS DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CON TRANSCRIPTASA INVERSA (RT-PCR) ----- | 25 |
| INMUNOCITOQUÍMICA ----- | 28 |
| ELISA ----- | 28 |
| ENSAYO DE PROLIFERACIÓN (CONTEO CELULAR) ----- | 29 |
| ENSAYO DE MIGRACIÓN ----- | 29 |
| ÁREA DE HERIDA ----- | 29 |
| MIGRACIÓN EN CÁMARA TRANSWELL ----- | 30 |
| ANÁLISIS ESTADÍSTICO ----- | 31 |
| RESULTADOS ----- | 32 |
| LAS CÉLULAS MDA-MB 231 EXPRESAN DE MANERA DIFERENCIAL EL ARNM QUE CODIFICAN PARA LOS TRES DIFERENTES RECEPTORES A ESTRÓGENOS (ER α , ER β Y GPER30) ASÍ COMO DIFERENTES ELEMENTOS DEL SISTEMA DE IGF (IGF-1, IGF-R1, IGF-2 E IGF-2R) ----- | 32 |
| LA ACTIVACIÓN DEL ER β AFECTA DE MANERA DIFERENCIAL LA | |

| | |
|---|----|
| EXPRESIÓN DE LOS DISTINTOS ELEMENTOS DEL SISTEMA IGF/IGFR EN LAS CÉLULAS MDA-MB 231 ----- | 33 |
| LA PRESENCIA DE IGF-2 ESTIMULA LA CAPACIDAD PROLIFERATIVA DE LAS CÉLULAS MDA-MB 231 ----- | 38 |
| LA PRESENCIA DE IGF-2 INFLUYE POSITIVAMENTE SOBRE LA CAPACIDAD MIGRATORIA DE LAS CÉLULAS MDA-MB 231 ----- | 41 |
| IGF2 FAVORECE LA EXPRESIÓN DE ELEMENTOS MOLECULARES MDA-MB 231, QUE PARTICIPAN EN LA MIGRACIÓN ----- | 43 |
| LA VÍA PI3K/AKT ESTÁ INVOLUCRADA EN EL EFECTO ESTIMULATORIO QUE EJERCE EL IGF-2 SOBRE LA CAPACIDAD PROLIFERATIVA Y LA CAPACIDAD MIGRATORIA DE LAS CÉLULAS MDA-MB 231 ----- | 47 |
| IGF2 PARTICIPA EN LA CAPACIDAD MIGRATORIA DE LAS CÉLULAS MDA MB 231 ----- | |
| LA VÍA DE LAS MAPK'S ESTÁ INVOLUCRADA EN EL EFECTO ESTIMULATORIO QUE EJERCE EL IGF-2 SOBRE LA CAPACIDAD PROLIFERATIVA Y LA CAPACIDAD MIGRATORIA DE LAS CÉLULAS MDA-MB 231 ----- | 50 |
| DISCUSIÓN ----- | 57 |
| CONCLUSIONES ----- | 61 |
| BIBLIOGRAFÍA ----- | 62 |

ABREVIATURAS

| | |
|--------------------------------|--|
| A | Adenina |
| ACS | American Cancer Society |
| ADN | Ácido Desoxirribonucleico |
| ADNc | Ácido Desoxirribonucleico Complementario |
| AHR | Receptor Aril Hicrocarbono |
| Akt | Proteína Cinasa B |
| ARNm | Ácido Ribonucleico Mensajero |
| ASCO | American Society of Clinical Oncology |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| BRCA1 | Marcador molecular 1 de cáncer de mama |
| BRCA2 | Marcador moleculra 2 de cáncer de mama |
| C | Citocina |
| CDCP | Centers for Disease Control and Prevention |
| DPN | Diarilpropionitrilo |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| E₁ | Estrona |
| E₂ | Estradiol |
| E₃ | Estriol |
| EMT | Transición Epitelio Mesénquima |
| ER | Receptor a Estrógenos |
| ERE | Elementos de Respuesta a Estrógenos |
| ERα | Receptor a Estrógenos Alfa |
| ERβ | Receptor a Estrógenos Beta |
| ERβ-KO | Knockout del Receptor a Estrógenos Beta |
| FAK | Quinasas de adhesión focal |
| G | Guanina |

| | |
|-------------------|--|
| Grb2 | Proteína unida al receptor del factor de crecimiento 2 |
| GH | Hormona de Crecimiento |
| GPER | Receptor a Estrógenos acoplado a proteínas G |
| HER2 | Receptor 2 del Factor de Crecimiento Epidérmico Humano |
| Hsp90 | Proteína de Choque Térmico 90 |
| IARC | International Agency For Research On Cancer |
| IGF1 | Factores de Crecimiento Similares a Insulina Tipo 1 |
| IGF1R | Receptor al Factor de Crecimiento Similar a Insulina Tipo 1 |
| IGF2 | Factor de Crecimiento Similar a Insulina Tipo 2 |
| IGF2R | Receptor al Factor de Crecimiento a Similar a Insulina Tipo 2 |
| IGF | Factor de Crecimiento Similar a Insulina |
| INEGI | Instituto Nacional de Estadística y Geografía |
| INSP | Instituto Nacional de Salud Pública |
| INSR | Receptor a Insulina |
| IRS | Sustrato del Receptor a Insulina |
| KO | Knockout |
| LBD | Dominio de Unión a Ligando |
| MAPK | Proteína Cinasa Activada por Mitógeno |
| MB | Meduloblastoma |
| MDA MB 231 | MD Anderson Main Building 231 |
| MMP 14 | Metaloproteinasa 14 |
| mTOR | Complejo Sensible a Rapamicina |
| Nav 1.5 | Canal de Sodio dependiente de Voltaje Isoforma 1.5 |
| NCI | National Cancer Institute |
| OMS | Organización Mundial de La Salud |
| PAHO | Organización Panamericana de La Salud |
| PKD1 | Proteína Cinasa dependiente de 3 fosfoinositidin |
| PD | PD98059 |
| PHTPP | 4-[2-Phenyl-5,7-bis(trifluoromethyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl]phenol |
| PTEN | Supresor de tumores homólogo de la fosfatasa y tensina |

| | |
|------------------------|--|
| PCR | Reacción en Cadena de la Polimerasa |
| PI3K | Proteína Cinasa dependiente de Fosfoinositol 3 |
| PIP3 | Fosfatidil Inositol 3,4,5 Trifosfato |
| PR | Receptor a Progesterona |
| RT | Transcriptasa Reversa |
| SFB | Suero Fetal Bovino |
| shERβ | Silenciamiento de ERβ (<i>Knocdown</i>) |
| T | Timina |
| TK | Tirosin Cinasa |
| TNBC | Cáncer de Mama Triple Negativo |
| UICC | Unión Internacional Contra El Cáncer |
| Wort | Wortmanina |
| Zn²⁺ | Zinc |

RESUMEN

El cáncer de mama triple negativo, TNBC, (*Triple Negative Breast Cáncer*) representa del 15% al 20% del total de casos de cáncer de mama reportados, se caracteriza por ser altamente invasivo y quimio-resistente, por lo que presenta una alta tasa de mortalidad, observándose una mayor incidencia en mujeres jóvenes afroamericanas y latinas. El TNBC no responde a la hormonoterapia convencional, ya que no expresa receptores a progesterona, factor de crecimiento epidérmico y receptor a estrógenos α , de ahí la búsqueda de nuevos blancos farmacológicos para su tratamiento, encontrándose que estas células sobre-expresan el receptor a estrógenos β (ER β), sin conocerse a detalle el papel funcional de estos receptores en las células tumorales.

Antecedentes recientes obtenidos en el laboratorio de Neuroendocrinología del Instituto de Fisiología, mostraron que las células MDA-MB 231, células tumorales triple negativo, expresan el ARNm que codifica para el ER β , y que al ser activado con un agonista específico (DPN), estimula su capacidad proliferativa y migratoria (Avalos R., 2017), desconociéndose el mecanismo molecular involucrado.

Por lo que el propósito general del presente trabajo, fue evaluar el efecto que ejerce la activación del ER β sobre los elementos moleculares del sistema de los factores de crecimiento similares a insulina (IGF) en el cáncer de mama triple negativo, ya que numerosas evidencias muestran que el sistema del IGF incide positivamente sobre la capacidad proliferativa y migratoria de las células tumorales.

Experimentos iniciales de RT-PCR muestran que la línea celular MDA-MB 231 expresa el ARNm que codifica para el ER β , así como para los elementos moleculares del sistema IGF (IGF-1, IGF-2, IGF-R1, IGF-R2). La activación del ER β por la presencia crónica de DPN por 72 horas, induce un cambio diferencial en el nivel de expresión del ARNm que codifica para los diferentes elementos moleculares del sistema de IGF, llamando la atención un incremento en la expresión de IGF-2 (Factor de crecimiento similar a insulina tipo 2), tanto a nivel de ARNm como de proteína. El efecto observado se debe a

la activación del ER β , ya que la presencia de un antagonista específico (PHTTP), reduce la expresión de IGF-2.

La presencia crónica de IGF-2 exagera la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231, esta capacidad se relaciona positivamente con el mantenimiento del fenotipo mesénquimal, caracterizado por un incremento en el nivel de expresión del factor de transcripción Zeb1 (marcador del fenotipo mesénquimal) y una reducción en la expresión de E-Cadherina (marcador del fenotipo epitelial). Otro elemento molecular involucrado en la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231 es la expresión funcional del canal de sodio Nav 1.5, ya que su bloqueo con TTX reduce el porcentaje de células que migran. Las células MDA-MB 231 expuestas a IGF-2 aumentan el nivel de expresión de este canal.

Las células MDA-MB 231 en condiciones basales expresan con mayor intensidad el ARNm que codifica para IGF-R1 (Receptor tipo 1 para el factor de crecimiento al factor de insulina), receptor específico para IGF-1 (Factor de crecimiento similar a insulina tipo 1) e IGF-2. La activación de este receptor, que posee una actividad intrínseca de tirosina cinasa, desencadena dos vías de señalización: la vía PI3K/AKT y la vía de las MAPK. Con el interés de poder discriminar cuál de las dos rutas intracelulares está involucrada en la capacidad migratoria estimulada por IGF-2, empleamos antagonistas específicos para cada una de las vías. Los resultados obtenidos muestran que al bloquear cualquiera de las dos vías, repercute de manera negativa no solamente en la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231, sino también en su capacidad proliferativa.

Los resultados obtenidos sientan las bases para proponer a corto y mediano plazo al ER β y al complejo IGF-2/IGF-R1 como nuevos blancos farmacológicos para el tratamiento del cáncer de mama triple negativo.

ANTECEDENTES

▪ CÁNCER

La proliferación y la muerte son características que las células sanas mantienen bajo un control estricto a nivel molecular, equilibrados por estímulos de diferente naturaleza (**Podoa F et al., 2010.**) como, por mencionar algunos ejemplos, cuando las células normales envejecen, o sufren daño alguno y mueren, estas son remplazadas por células nuevas. En el cáncer, sin embargo, este proceso se encuentra alterado.

En el comienzo del estudio de esta enfermedad, en 1838, se describió que el tejido canceroso estaba conformado por células con morfología alterada, y se postuló que la causa de esta enfermedad yacía en lesiones celulares (**Hajdu S., 2004**). Actualmente, la Organización Mundial de la Salud (**OMS**) define al cáncer como un grupo de más de 100 diferentes entidades clínicas de diverso origen que tiene como característica principal el rápido y desordenado crecimiento de células anormales; en la mayoría de los casos se trata de padecimientos crónico-degenerativos. (**OMS, 2018**).

FISIOPATOLOGÍA

La división descontrolada de células anormales, involucra múltiples etapas, iniciando con un daño o alteración en el ADN ya sea por mutaciones, deleciones, amplificaciones y translocaciones cromosómicas (**Cobaleda et al., 1998**), que conduce a la formación de agregados que crecen dañando tejidos vecinos y alteran su fisiología. La acumulación de defectos en los mecanismos que regulan el ciclo celular y la proliferación es la causa subyacente de la heterogeneidad de los diversos tipos de cáncer; y sus diferentes respuestas a los tratamientos. Además, dichas células cancerosas pueden migrar e invadir tejidos lejanos, donde encuentran un nicho apropiado para continuar su crecimiento originando una metástasis seguida de una transformación progresiva de las células normales a derivados altamente malignos, con una alta tasa de división y aumentada capacidad de sobrevivida (**Sánchez C., 2013**). Además se han propuesto

características adicionales como la evasión de la vigilancia inmune, un mejorado metabolismo anabólico, inestabilidad genómica, entre otras (Hanahan y Weinberg, 2011) (Figura 1).



Figura 1. Características de las células tumorales (Modificado de Hanahan y Weinberg, 2014).

A medida que las células adquieren un mayor número de mutaciones, un mayor número de células nuevas anormales se acumulan. Estas células adicionales pueden proliferar, tendiendo a formar masas, comúnmente llamadas “tumores”. Durante el desarrollo del tumor, dichas células suelen adquirir ciertas propiedades que le permiten invadir tejidos vecinos o distantes, proceso conocido como metástasis. (OMS, 2018).

EPIDEMIOLOGÍA

Hoy día, el cáncer es uno de los principales problemas de salud pública a nivel global; a pesar de los esfuerzos por reducir el impacto de esta enfermedad, datos recientes muestran que la incidencia a nivel mundial es de más de 18 millones de casos nuevos, encabezado por el cáncer de pulmón y el cáncer de mama, ambos con una incidencia del 11.6% (**Figura 2 Derecha**) del total de cánceres. Del mismo modo, los datos revelan que la mortalidad de esta enfermedad, alcanzó los 9 millones de muertes, representando el 6.6% de las muertes por cáncer de mama (**Figura 2 Izquierda**) (IARC, 2018).

Estadística mundial para todos los cánceres (2018)

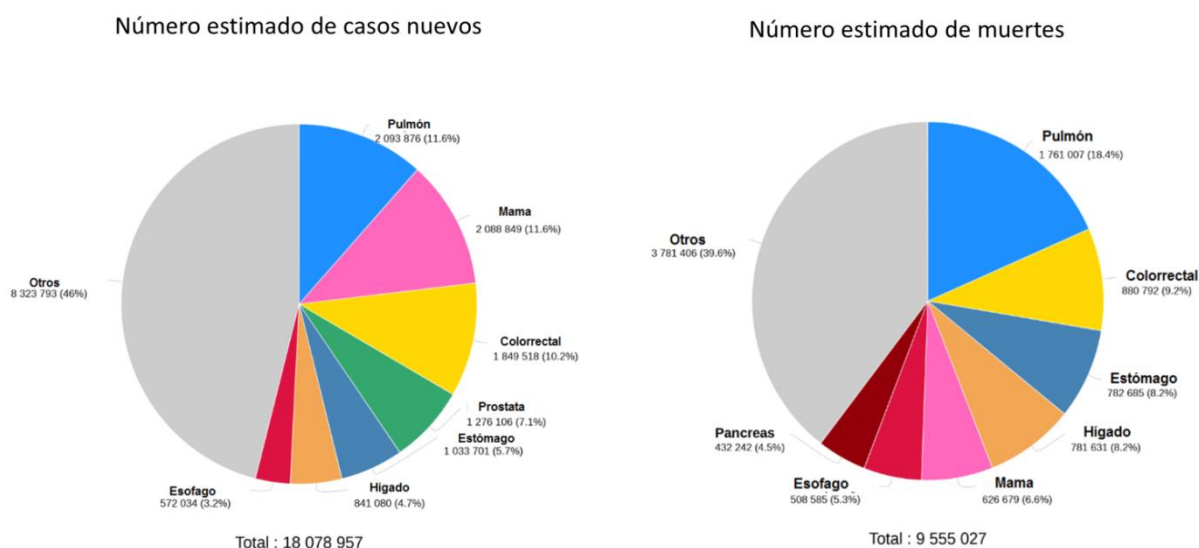


Figura 2. Estadística mundial para todos los cánceres, para ambos sexos y todas las edades (Modificado de IARC, OMS, 2018).

Sin embargo, los índices de morbilidad y mortalidad de los diversos tipos de cáncer varían según el sexo, la edad, la raza, la ubicación geográfica e incluso las condiciones socioeconómicas, entre muchos otros más factores que pueden determinar el desarrollo de esta enfermedad en la población.

CÁNCER EN MÉXICO

En México, según la Unión Internacional Contra el Cáncer, este padecimiento tiene una alta incidencia y mortalidad, sólo después de la diabetes y las enfermedades cardiovasculares. En 2013, la Secretaría de Salud y la Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud, estimaron que se detectaron 128 mil casos nuevos anuales **(Hernández J. A., 2016)**.

Estudios realizados por el **IARC (*International Agency for Research on Cancer*)** sobre el riesgo acumulado de incidencia estimado en 2018, mostró que la mayor incidencia de cáncer en México se deben al cáncer de mama y al cáncer de próstata, sin embargo, el mismo reporte señala que la mayor tasa de mortalidad por cáncer es debida al cáncer de mama, aún sin hacer diferencias entre el sexo **(IARC 2018)**.

- **CÁNCER DE MAMA**

La mama está conformada por tejido adiposo y glóbulos glandulares. En este tejido, se encuentra una red de lóbulos (de 15 a 20), formado por minúsculas estructuras tubulares llamadas lobulillos, irrigada por vasos sanguíneos y linfáticos. Los lóbulos y lobulillos están unidos por una serie de ductos o conductos galactóforos que conducen la leche hacia el pezón durante la lactancia **(NCI 2012)**.

A través de las diferentes etapas de la vida humana, bajo el control hormonal, la mama se encuentra sometida a una remodelación y diferenciación constante. Las mamas crecen, durante la pubertad como resultado de la actividad endocrina del ovario, presentándose un aumento en los niveles de producción de hormonas esteroideas femeninas (estrógenos y progesterona) **(Polyak, 2007)**.

La incidencia del cáncer de mama en el mundo industrializado ha incrementado en los últimos 50 años, en mujeres adultas a nivel mundial. A pesar de que las razones de esto aún no son del todo claras, se considera resultado de la acumulación de cambios

genéticos y epigenéticos, donde las hormonas tienen un papel relevante (**Hartman J. et al., 2009**).

PATOGÉNESIS

Se define al cáncer de mama como un conjunto de enfermedades cuyo origen son células malignas provenientes del tejido de la glándula mamaria. La historia natural del cáncer de mama se origina cuando las células saludables empiezan a transformarse, cambiando de un fenotipo a otro; generalmente de un fenotipo epitelial a uno mesénquimal, además, presentan serie de mutaciones a nivel genético que son inducen una proliferación descontrolada (**ASCO, 2017**). No obstante, la mayoría de las mutaciones vinculadas al cáncer de mama son adquiridas, es decir que el cambio ocurrió en las células de la glándula mamaria durante el transcurso de la vida, y no es un cambio heredado. El 95% de los cánceres de mama surgen de los elementos epiteliales de la mama, por lo que se les denomina carcinomas.

TRANSICIÓN EPITELIO MESÉNQUIMA

La idea de una transición epitelio mesénquima surge de las observaciones realizadas por la Dr. Elizabeth Hay en 1995. Eventos tales como la pérdida de las uniones y polaridad apico-basal de las células epiteliales, reestructuración del citoesqueleto, así como cambios en los programas de mantenimiento del fenotipo celular son algunos de los procesos clave de dicha EMT (***Epithelial Mesenchymal Transition***) (**Thiery et al., 2009**) De manera fisiológica la EMT juega un rol determinante en procesos tales como la formación del embrión, el desarrollo de la cresta neural, la cicatrización de heridas, la regeneración tisular y en la fibrosis (**Kalluri y Weinberg, 2010**). Hoy en día sabemos que las células epiteliales tienen la capacidad de cambiar de fenotipo, a células mesenquimales y de regresar nuevamente a un fenotipo epitelial, parcial o totalmente.

De manera específica, en el cáncer, la EMT ha demostrado que es un proceso determinante en el potencial metastásico de las células cancerosas. Factores de transcripción, como lo son Snail (1 y 2), Zeb, entre otros, contribuyen en la EMT. La represión de genes determinantes de la unión y polaridad epitelial, como lo es E-Cadherina, así como la activación de genes definen el fenotipo mesenquimal son algunas de las funciones que cumple la expresión de Zeb en el cáncer (**Xu et al., 2009. Peinado et al., 2007**).

Una vez que las células cancerígenas adquieren el fenotipo mesenquimal suelen invadir sitios alejados a su lugar de origen, viajando a través del torrente sanguíneo y/o los vasos linfáticos para llegar a órganos periféricos, siendo tejidos diana secundarios de invasión (**Polyak, 2007**).

EPIDEMIOLOGÍA GLOBAL

En Estados Unidos, el cáncer de mama en las mujeres caucásicas, puede presentarse a cualquier edad, mientras que, en las mujeres afroamericanas hay una mayor incidencia antes de los 40 años de edad con índices de mortalidad altos, según datos del Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos de América (**National Cancer Institute**) (**NCI, 2014**). Así mismo para América Latina y el Caribe, tanto en número de casos nuevos como en número de muertes, no dista de las estadísticas mundiales, de acuerdo con estadísticas de la PAHO (**Pan-American Health Organization**).

El cáncer de mama destaca como una de las primeras causa de muerte por tumores malignos en la población adulta femenina. Los datos más recientes indican que se detectaron poco más de 2 millones de nuevos casos diagnosticados de cáncer de mama, siendo el segundo lugar en incidencia, sólo debajo del cáncer de pulmón; con una mortalidad aproximada de 626 679 millones de defunciones para dicho año (**Figura 2**) (**IARC 2018**).

EPIDEMIOLOGÍA NACIONAL

A partir de la disposición de los primeros datos sobre esta enfermedad, recabados entre 1955 y 1960, hasta fechas más recientes, la incidencia y mortalidad por cáncer de mama se ha elevado. Estudios realizados recientemente por el INEGI sobre las defunciones en mujeres por cáncer de mama, arrojaron una incidencia estimada 27 283 casos nuevos, y 6 854 defunciones por esta enfermedad para la población mexicana (**Figura 3**) (INEGI, 2018. IARC 2018).

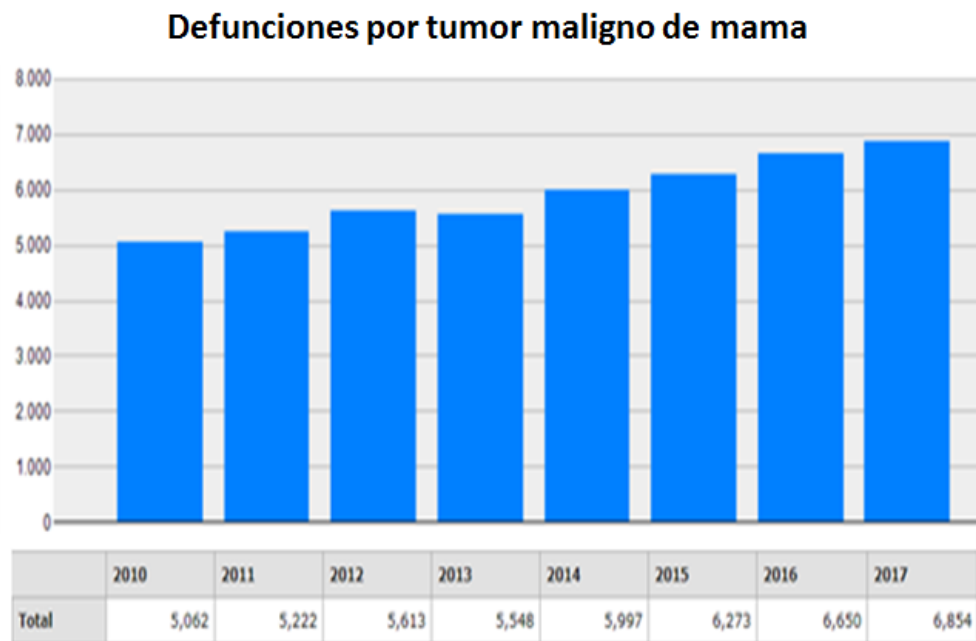


Figura 3. Defunciones por tumor maligno de mama en mujeres mayores de 20 años (INEGI 2018)

- **SUBTIPOS DE CÁNCER DE MAMA**

El 95% de los casos de cáncer de mama son carcinomas, es decir que se originaron en células del tipo epitelial. El cáncer de mama, sin embargo, no es una única enfermedad, entre sí mismo existen diferentes subtipos, que se determinan mediante la realización de diversas pruebas en una muestra del tumor. Dependiendo del estado de los bioindicadores, en cáncer de mama suele clasificarse en:


|  TIPO | CARACTERÍSTICA |
|---|---|
| Luminal A | Positivo al receptor a estrógenos y progesterona, pero negativo a HER2 |
| Luminal B | Positivo al receptor a estrógenos, progesterona y a HER2 |
| Receptor hormonal negativo / HER2 positivo | Negativo para el receptor a estrógenos y progesterona pero positivo para HER2 |
| Triple negativo | Negativo para el receptor a estrógenos, progesterona y a HER2 |

Tabla 1. Clasificación del cáncer de mama

- **ESTRÓGENOS Y CÁNCER**

Los estrógenos son hormonas esteroideas lipofílicas, clásicamente asociadas a la regulación de la diferenciación, el crecimiento y la supervivencia celular en una amplia variedad de tejidos y órganos. Estas moléculas son sintetizadas a partir del colesterol en ovarios y testículos principalmente, y en menor medida en las glándulas suprarrenales (**Gorriña et al., 2014. Petrone et al., 2014**). Existen tres formas de estrógeno: estrona

(E₁), estradiol (E₂) y estriol (E₃) (**Petrone et al., 2014**). De manera puntual, el 17β-estradiol (E₂), participa en el desarrollo morfológico y funcional de la glándula mamaria, actuando a través de sus receptores (**Anderson, 2002**).

Los estrógenos, sin embargo, también tienen un papel esencial en el desarrollo y progresión del cáncer de mama, las propiedades tumorigénicas mediadas por los estrógenos se deben a la interacción de este con su receptor (**ER** por sus siglas en inglés), (**Fagan et al., 2008**) que pertenece a una familia de receptores nucleares (**Piperigkoua et al., 2016. Holdosén et al., 2014**).

RECEPTORES A ESTRÓGENOS Y SU ACTIVACIÓN

Se identificó al primer ER en 1958 por Elwood Jensen, al cual se conoce como ERα y se encuentra en diversos tejidos desde cerebro hasta ovario. Sin embargo en 1996 se descubrió un segundo receptor en próstata de rata al que se le denominó ERβ (**Labrie et al, 1997**). Este se expresa tanto en células del epitelio luminal, mioepitelio, así como en algunas células en el estroma circundante de la glándula mamaria. La primera demostración de sitios específicos de unión a estrógeno fue hecha en células uterinas aisladas de rata en 1977. (**Speirs et al., 2002. Nilsson et al., 2001**). ERα y ERβ comparten 96% de homología, sin embargo difieren significativamente en su afinidad por ligandos sintético, (**Guillette et al., 2018**).

La activación clásica de ER resulta en la disociación de la proteína de choque térmico 90 (**Hsp90**) generando un cambio conformacional. El ER activo se dimeriza y luego, el dímero se une directa o indirectamente a los genes que contienen elementos de respuesta de estrógenos (**ERE**), (**Skandalis et al, 2014**). Ambos receptores contiene un dominio de unión a ligando o dominio E, el cual tiene un 59% de homología entre ambos receptores. El dominio D o región de bisagra, no ha sido bien caracterizada hasta el momento, sin embargo se sabe que participa en la unión a Hsp90, esta se une al dominio C o dominio de unión a ADN, con una homología del 97% siendo la región más conservada entre los diferentes receptores, compuesta por nueve residuos de cisteínas

que son invariablemente conservados entre los diferentes receptores esteroideos, de los cuales, ocho están coordinados alrededor de dos iones de Zn^{2+} para formar los dedos de zinc que le confieren al receptor la capacidad de unirse específicamente al ADN. (Hartman *et al.*, 2009).

Existen regiones del ADN que se unen de manera preferencial por regiones del ER α o del ER β . Por ejemplo las regiones ricas en TA se unen a ER α , mientras que las regiones ricas en GC se unen al ER β (Hartman *et al.*, 2009). Dependiendo del tipo de célula y el contexto, los efectos de su activación pueden conducir a la activación rápida de muchas moléculas de señalización. Cabe resaltar que el ER se une a estrógenos con alta afinidad, pero no otras hormonas esteroideas. Así pues la transcripción estimulada por la activación del ER es altamente regulada y depende del tejido donde ocurre.

RECEPTOR A ESTRÓGENOS BETA

El rol de receptor a estrógenos beta (ER β) en la carcinogénesis es altamente dependiente de la coexpresión de ER α , siendo su ausencia o presencia quien contribuye a la dualidad de sus efectos. El ER β posee un dominio de unión a ligando (LBD) que consiste en 12 α hélices, difiriendo del LBD de ER α en tan solo 2 aminoácidos. Sus isoformas son resultados del splicing alternativo, las cuales son (Holdosén *et al.*, 2014):

- **ER β_1** En modelos *in vivo* usando al pez cebra se ha relacionado de manera inversa al grado de malignidad, aumentando la supervivencia.
- **ER β_2** Se ha sugerido que posee un sitio de inhibición negativo a ER α . Diversos estudios han correlacionado una alta concentración de este receptor en cáncer de mama triple negativo, con un mayor grado de infiltración linfática.
- **ER β_4 y ER β_5** Requieren del ER β_1 para heterodimerizarse y así poder translocarse, pues no poseen *per se* un LBD.

El ER β tiene una alta expresión durante el desarrollo cerebelar, especialmente en periodos diferenciación celular. De manera patológica en el meduloblastoma se observa una sobre expresión de ER β , así como una desregulación de su vía de señalización (**Guillette et al., 2018**).

En el tejido mamario normal el ER β es ampliamente expresado en células luminales y mioepiteliales, así como en células que rodean el estroma. En presencia de ER α , ER β posee un papel anti proliferativo en células de cáncer de mama. Sin embargo en ausencia de ER α , ER β ejerce un efecto estimulatorio de la proliferación celular (**Holdosén et al., 2014. Speirs et al., 2002**). La explicación biológica de esta discrepancia no es del toda clara, posiblemente se debe a mecanismos que involucran la fosforilación del ER β (**Hartman et al., 2009**). Uno de los ejemplos propios de esta discrepancia se encontró en modelos animales de ER β -KO, los cuales muestran un reducido crecimiento de la glándula mamaria respecto a sus controles (**Holdosén et al., 2014**).

ER β Y EL CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO

Como mencionamos anteriormente, en presencia de ER α , el ER β posee efectos antiproliferativos además del correlato con un reducido tamaño tumoral en cáncer de mama hormono dependiente (**Holdosén et al., 2014. Speirs et al., 2002**). Sólo el 70-75% de los casos de cáncer de mama son positivos a ER α y responsivos a tratamientos hormono dependientes, el resto expresa ampliamente ER β (**Holdosén et al., 2014**). El papel de ER β , en el cáncer de mama, se ha asociado a un subtipo que presenta mayor agresividad (**Hamilton et al., 2014**) denominado cáncer de mama triple negativo (**TNBC** por sus siglas en inglés).

El TNBC es un adenocarcinoma, este representa aproximadamente del 15% al 20% de los casos de cáncer de mama invasivos, y parece ser más frecuente entre las mujeres jóvenes, afroamericanas y latinas. En este subtipo de cáncer de mama, no responde a la hormonoterapia convencional (como tamoxifeno o inhibidores de la aromatasa); por lo

que frecuentemente su conducta biológica suele ser más agresiva y con una mayor tendencia a presentar metástasis a distancia, predominando a zonas óseas y viscerales **(Zaharia y Gómez, 2013)**.

Se ha asociado a mutaciones de los genes BRCA1 y BRCA2. **(ASCO, 2017)**. Otras características notables del TNBC incluyen un alto nivel de expresión de genes proliferativos, como Ki-67, citoqueratinas basales, entre otras, así como una capacidad reducida de reparación del ADN y aumento de la angiogénesis **(Podoa et al., 2010)**.

Hoy en día el TNBC, presenta un creciente interés a nivel biológico, clínico y epidemiológico; debido a su conducta agresiva y peor pronosis. Los avances científicos y tecnológicos recientes han proporcionado una amplia gama de candidatos como biomarcadores, sin embargo, tales predictores aún no se comprenden del todo **(Podoa et al., 2010)** haciendo que los verdaderos desafíos de esta enfermedad aún no se hayan cumplido.

Por otro lado se ha reportado que el TNBC posee altos niveles de expresión del ER β **(Fuqua et al., 2003. Janice et al., 2000)**. Datos experimentales sugieren que el ER β 2 posee rol proliferativo predominante, en modelos celulares de TNBC, aunque estudios no descartan el papel de otras isoformas y su capacidad de heterodimerizarse con ER β 2 **(Guillette et al., 2018)**. Interesantemente, la supresión del ER β tiene efectos sobre la morfología típica de las células de TNBC, mostrando alteraciones en los marcadores del fenotipo mesenquimal, repercutiendo en una marcada reducción en el crecimiento y migración celular **(Piperigkoua et al., 2016)**.

El papel del ER α en mujeres postmenopáusicas con cáncer de mama hormono dependientes se ha dilucidado en los últimos años **(Sánchez-Suárez, 2003)**, por el contrario el valor pronóstico y terapéutico del ER β en el TNBC aún no se ha definido del todo; así como su influencia sobre otras vías de señalización.

- **FACTORES DE CRECIMIENTO SIMILARES A INSULINA (IGF)**

Los factores de crecimiento similares a insulina (**IGF**) son un conjunto de elementos de naturaleza proteica, con una alta similitud secuencial con la insulina, que se conocieron y estudiaron en función de su habilidad para estimular la sulfatación de cartílago, actividad que también presenta GH, y en un principio se les denominó somatomedinas. Actualmente se reconocen dos tipos de IGF, designadas como IGF-1 (anteriormente llamada somatomedina C) e IGF-2 (anteriormente llamada somatomedina A). Estos se sintetizan en el hígado principalmente, y en menor medida en el riñón. La biosíntesis de IGF depende fundamentalmente de los niveles de GH (**Figura 4**) (**Leal-Guadarrama et al., 2002**).

El IGF-1 participa en diversas actividades fisiológicas como agente mitogénico, favorece la supervivencia, diferenciación, replicación y migración celular; además de la estimulación de la síntesis proteica y hormonal; así como efectos metabólicos (**Walenkamp et al., 2013. Rosalyne et al., 2013**).

Por otra parte, la molécula de IGF-2 se ha relacionado con cambios a nivel del trofoblasto, el desarrollo fetal, así como el transporte de nutrientes a través de la placenta. También se ha documentado que IGF-2 incrementa los niveles de expresión de ARNm y de proteína de AHR, el cual se une al promotor del gen para ciclina D1 específica de G1/S, que participa en el ciclo celular, favoreciendo la proliferación (**Justin et al., 2014**).

Los valores de IGF varían con la edad y condición fisiológica. En el feto, por ejemplo, los niveles más altos de IGF-1 se observan durante los días cercanos al nacimiento, mientras que IGF-2 predomina en las cavidades extra embrionarias del feto durante su desarrollo (**Panda et al., 2013. Leal-Guadarrama et al., 2002**). Por otro lado, se ha

observado niveles elevados de IGF-1 durante la pubertad, lo cual sugiere su papel en el desarrollo dependiente de GH, mientras que los niveles de IGF-2 permanecen casi inalterados durante el transcurso de la vida (Leal-Guadarrama *et al.*, 2002). }

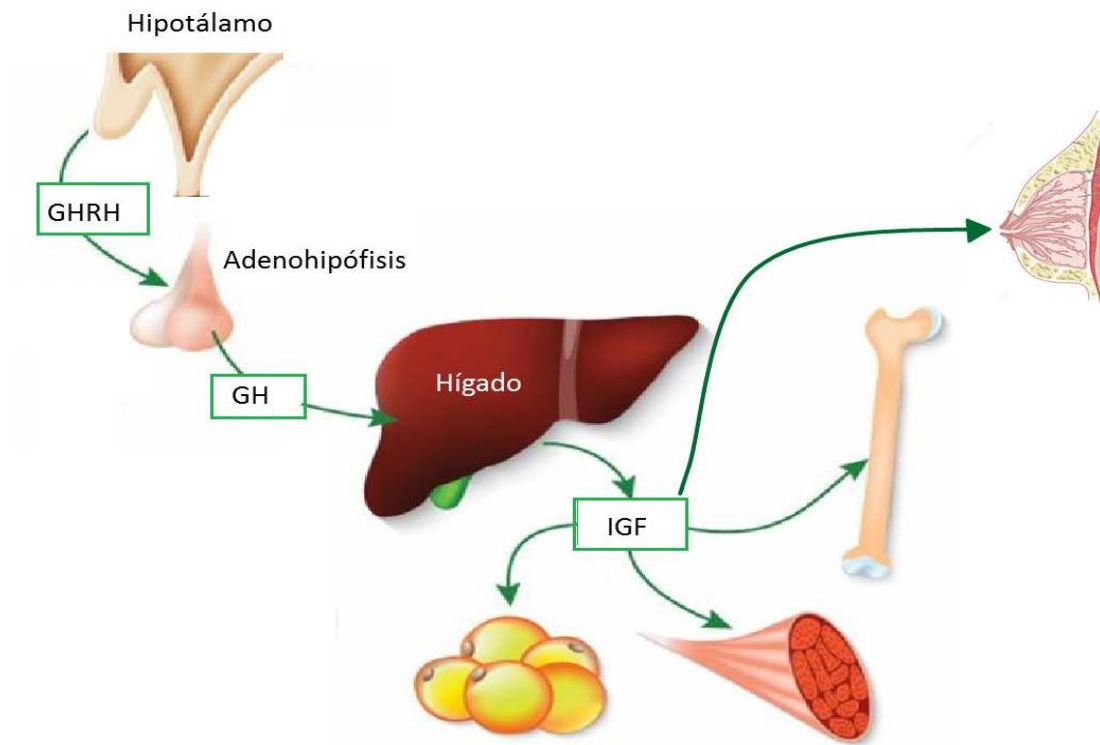


Figura 4. Factores de crecimiento similares a insulina (IGF) Esquema representativo de la vía de producción de IGF. GHRH estimula la producción de GH en la adenohipófisis que a su vez estimula, en el hígado, la producción de IGF.

RECEPTORES DE IGF (IGF-R)

Tanto IGF-1 e IGF-2 transmiten sus señales a través de los receptores a IGF (IGF-R) que se localizan de manera ubicua en la membrana plasmática. Adicionalmente, el IGF-2 se puede unir tanto al receptor a insulina como IGF-R1, o al híbrido de ambos. (Bartucci *et al.*, 2017. Maccario *et al.*, 2010. Leal-Guadarrama *et al.*, 2002). Los receptores de IGF son:

- IGF-R1:** Es sintetizado como una cadena simple de pre pro receptor, que posterior a la remoción del péptido señal, sigue un plegamiento y dimerización mediante puentes disulfuro, para finalmente ser glucosilado. El resultado es una glicoproteína de transmembrana madura tetramérica, con 2 subunidades α y 2 subunidades β . La subunidad α es la responsable de la unión a ligando mientras que la subunidad β posee actividad tirosin cinasa (TK) (Walenkamp *et al.*, 2013). La activación de IGF-R1 se debe a la fosforilación de la subunidad β del receptor, produciendo la activación las vías PI3K/AKT y MAPK's (Christopoulos *et al.*, 2018. Leal-Guadarrama *et al.*, 2002), mediante la intervención de IRS (IRS₁-IRS₄) Esta activación resulta en una mayor supervivencia celular, proliferación y migración (Rosalyne *et al.*, 2013. Myers *et al.*, 1994).
- IGF-R2** posee una homología con el receptor de manosa-6-fosfato y no posee dominios tirosin cinasa como el IGF-R1 (Leal-Guadarrama *et al.*, 2002) siendo incapaz de presentar actividad TK *per se*, sin embargo si está relacionado a la traducción de señales mediante proteínas G, aunque no se ha descrito del todo el mecanismo mediante el cual lo logra (Harris *et al.*, 2012).

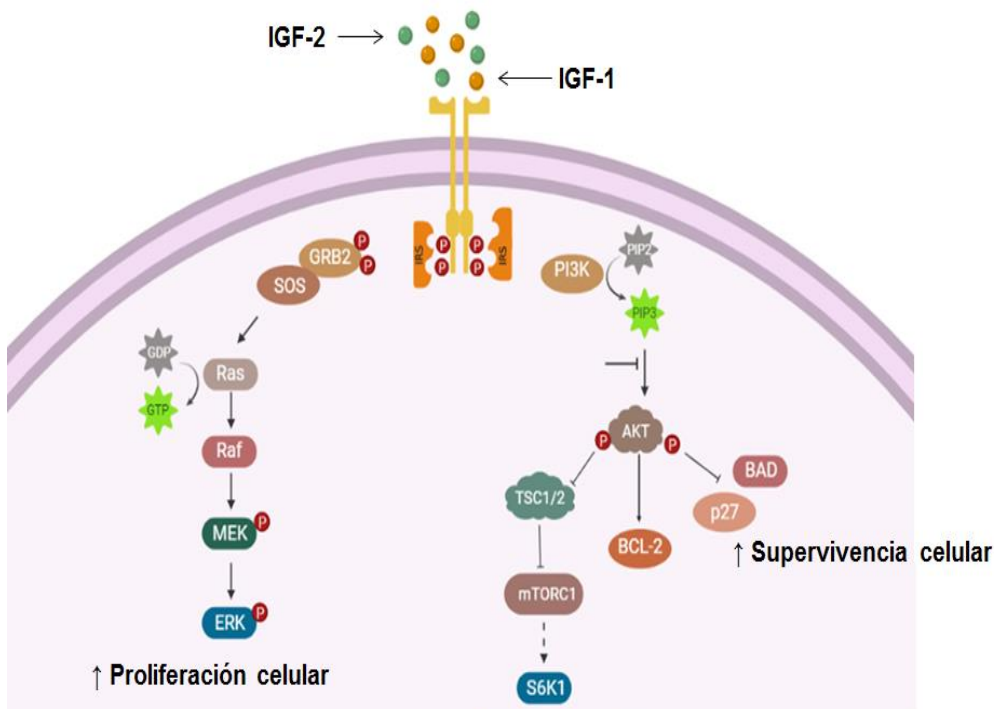


Figura 5. Vía de señalización mediada por IGF-R1: La activación de IGF-R1 se debe a la fosforilación de la subunidad β del receptor, produciendo la activación las vías PI3K/AKT y MAPK's.

- Síntesis proteica
- Crecimiento

- **CÁNCER DE MAMA Y EL SISTEMA IGF**

Más de dos décadas han pasado desde que el sistema de IGF fuera reconocido como un candidato para el tratamiento contra el cáncer de mama (**Christopoulos, 2018**). Los ligandos de IGFR pueden provenir desde fuentes endocrinas o paracrinas, además, la producción autocrina de IGF en algunas células tumorales que expresan su receptor también puede contribuir a la proliferación tumoral y metastasis (**Burrow et al., 1998**). Actualmente diversos estudios muestran una relación del sistema IGF con la proliferación y crecimiento así como la transformación celular y la carcinogénesis mamaria.

Uno de los primeros estudios de casos en establecer la relación entre IGF y el cáncer de mama fue realizado en 1993, en el que se demostró que los niveles circulantes de IGF-1 eran más altos en las mujeres con cáncer de mama en comparación con las mujeres sin cáncer. (**Shanmugalingam et al., 2016**). Recientemente se han relacionado niveles elevados de IGF-1 con una acelerada carcinogénesis, siendo de mayor impacto en mujeres premenopáusicas que post menopáusicas (**Shanmugalingam et al, 2016. Al-Delaimy et al., 2011**).

Por otra parte, IGF-2 juega un papel importante en la autoregeneración y el mantenimiento del fenotipo de células madre cancerígenas, mediante la unión al IGF-R1, activando la vía de señalización río abajo de MAPK's y PI3K/AKT (**De-Freitas et al., 2017. Motallebnezhad et al., 2016**), así como la inducción de una EMT por IGF-R1, son algunos de los elementos clave de la participación de este sistema en la progresión tumoral (**Motallebnezhad et al., 2016**).

Como se mencionó antes, al activar de vías de señalización, PI3K/AKT y MAPK's, mediante IGF-R1, se contribuye a promover la autosuficiencia del crecimiento tumoral (**De-Freitas et al., 2017**), aumentar la supervivencia de células con daño acumulado de ADN, (**Shanmugalingam et al., 2016**) activar la degradación de la matriz extracelular,

vascularización tumoral y repercute en movilidad celular, además de inducir la transcripción de factores que inducen EMT como Snail o Zeb1. Los niveles de IGF-R1 son altamente adaptables durante la progresión tumoral. Sin embargo la inhibición de este, resulta en la inhibición de la metástasis, invasión y adhesión celular (**Cox et al., 2015**).

La activación del sistema IGF puede tener una interacción con hormonas como estradiol y GH (**Guillette et al., 2018**). En modelos *in vitro* de cáncer de mama hormono dependiente, IGF-1 y E₂ pueden regular diversos genes asociados a la expresión de factores asociados a la progresión tumoral (**De-Freitas et al., 2017**), pues el E₂ activa rápidamente muchas moléculas, incluyendo a IGF-R1 y sus vías de señalización río abajo, siendo importante en el mantenimiento del potencial metastásico (**Skandalis et al., 2014**).

PAPEL DEL SISTEMA DE IGF EN EL TNBC

En muestras procedentes de pacientes con TNBC se encontraron niveles significativamente altos de IGF-2 (**Hamilton et al., 2014**), además, el IGF-2 se puede unir tanto al receptor a insulina como IGF-R1, o al híbrido de ambos, induciendo efectos proliferativos, de supervivencia, diferenciación y migración (**Motallebnezhad et al., 2016**), inclusive se ha propuesto que IGF-2 puede regular la expresión de ER β que a su vez modula vías metabólicas y del propio IGF en la progresión del cáncer (**Hamilton et al., 2014**). La activación posterior de las vías de señalización de PI3K/AKT y MAPK's así como su interacción con genes regulados por ER, participa en la progresión del cáncer de mama, mientras que los estrógenos desencadenan la expresión de moléculas importantes de la vía de señalización de IGF, como IGF-R1 e IRS, que a su vez promueven la migración (**Guillette et al., 2018. Skandalis et al., 2014**).

Aunque la presencia de una transducción de señal de la vía IGF en las células del TNBC ha recibido poca atención y su participación aún es controversial (**Davison et al., 2011**), la pregunta que surge en este contexto es la medida en que el sistema de

transducción de señales de IGF es responsable de los efectos de la progresión del TNBC.

PAPEL TERAPEUTICO DE IGF EN EL CÁNCER DE MAMA

El entrecruzamiento entre el sistema IGF-1 y los estrógenos en el cáncer de mama es un hecho fehaciente. Las 2 últimas décadas se han encaminado en la búsqueda de tratamientos contra el cáncer de mama en la interrupción de las vías de señalización activadas por el sistema de IGF así como de ER (**Christopoulos et al., 2018**).

Los estrógenos pueden regular la expresión factores transcripcionales claves involucrados en la señalización mediada por IGF-1 (c-myc, c-fos y c-jun). La mayor parte de los datos preclínicos muestran que la activación de IGF-R1 refuerza y amplifica potencialmente los efectos biológicos de la activación de ER (**Fagan y Yee, 2008**).

Varias líneas de investigación señalan al sistema IGF como elemento responsable de proporcionar mecanismos de resistencia, ya sean intrínsecos o adquiridos, a terapias convencionales citotóxicas o dirigidas en el cáncer de mama. (**Christopoulos et al., 2018**). Conociendo esto, algunas investigaciones implementaron el uso de inhibidores de IGF-R1 (**NVP-AEW541**) encontrando que puede prevenir el crecimiento tumoral de TNBC (**Hamilton et al., 2017**), por otra parte, la aplicación de tratamientos con anticuerpos monoclonales de IGF-1 resultaron en hiperglicemia, así como en aumentos de GH (**Ekyalongo y Yee 2017**). No obstante, apostar por tratamientos con anticuerpos específicos podría suponer una ruta no adecuada debido a la existencia de receptores híbridos y del potencial de IGF-2 como ligando a IGF-R1, por lo que la necesidad de encontrar alternativas terapéuticas eficientes es imperativo.

JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama es un problema de salud pública grave, pues afecta principalmente a las mujeres en diversas etapas de la vida, aunque no en la misma proporción. Datos de la OMS ubican al cáncer de mama como la principal causa de muerte por tumor maligno en Latinoamérica, mientras que, en la población mexicana, estudios realizados recientemente por el INEGI, reportan una incidencia estimada de 27,283 casos nuevos y de 6,854 defunciones por esta enfermedad. Entre los diferentes tipos de cáncer de mama, el cáncer de mama triple negativo presenta la conducta biológica más agresiva y la mayor tasa de mortalidad, ya que los pacientes no responden de manera eficiente a los tratamientos convencionales, tales como quimio y radioterapia.

Un elemento molecular clave para el entendimiento de los mecanismos de progresión y desarrollo del cáncer de mama triple negativo pudiera ser el receptor a estrógenos β (ER β), ya que se encuentra ampliamente expresado en este tipo de cáncer, asumiendo muy probablemente el papel del receptor a estrógenos α (ER α) ausente en estas células tumorales y que en condiciones fisiológicas estimula la proliferación y diferenciación celular. Por otro lado, se ha demostrado la relación positiva que existe entre la expresión de factores de crecimiento y la progresión del cáncer, por lo que resultará interesante investigar, si la activación del ER β presente en las células tumorales, induce cambios en los niveles de expresión de factores de crecimiento relacionados con el potencial metastásico de las células de cáncer de mama triple negativo.

La información actual con que se cuenta sobre el complejo IGF/IGFR y su participación en la progresión de diversos tipos de cáncer es prometedora; sin embargo, se desconoce la participación de este sistema (IGF/IGFR) en el cáncer de mama triple negativo, por lo que decidimos resolver esta interrogante en el presente trabajo, esto con el propósito de proponer nuevos blancos farmacológicos para el tratamiento efectivo del cáncer de mama triple negativo, aumentando en consecuencia la esperanza de vida de las mujeres que lo padecen.

HIPÓTESIS

La activación del ER β estimula la expresión funcional del complejo IGF/IGFR, sistema que exagera a su vez, la capacidad proliferativa y migratoria de las células de cáncer de mama triple negativo MDA-MB 231.

OBJETIVOS

GENERAL

Evaluar si la activación del ER β induce un cambio en la expresión funcional del complejo IGF/IGFR y si éste a su vez, incide sobre la capacidad proliferativa y migratoria de las células de cáncer de mama triple negativo MDA-MB 231.

ESPECÍFICOS

1. Detectar los niveles de expresión del ARNm que codifican para los tres diferentes receptores a estrógenos: ER α , ER β y GPER30; así como los niveles de expresión de los elementos del sistema de IGF (IGF-1, IGF-R1, IGF-2, IGF-R2) en la línea tumoral MDA-MB 231.
2. Evaluar si la activación del ER β modifica los niveles de expresión del ARNm y de proteína de los elementos del complejo IGF/IGFR en células MDA-MB 231.
3. Determinar el efecto que ejerce el IGF sobre la capacidad proliferativa y migratoria en células MDA-MB 231.
4. Iniciar el estudio acerca de la vía de señalización activada por el IGF relacionada con la capacidad proliferativa y migratoria de las células MDA- MB 231.

METODOLOGIA

▪ CULTIVO CELULAR

La línea celular MDA-MB 231 proviene de un adenocarcinoma grado IV, posee características fenotípicas similares al cáncer de mama triple negativo, por ejemplo, carecen del ER α , PR y HER2 y baja expresión Claudina. Estas células presentan morfología fusiforme y crecen en modalidad de monocapa (**Figura 6**). Las células MDA-MB 231 fueron adquiridas a la ATCC.

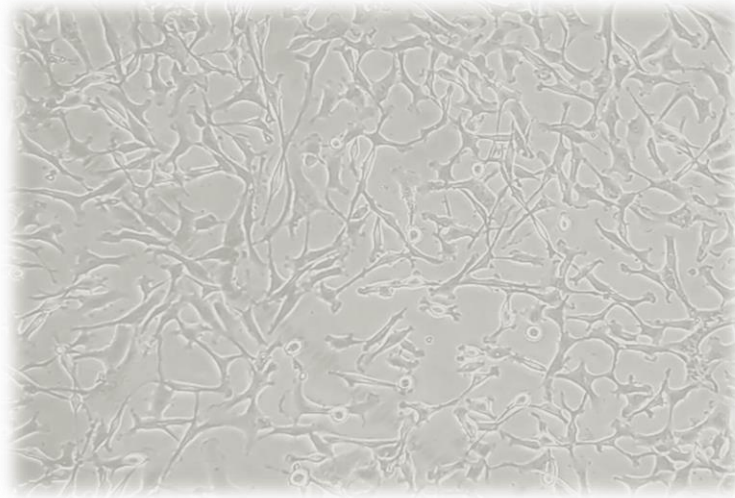


Figura 6 Microfotografía de células MDA MB 231

Las células fueron sembradas en placas de poliestireno, con medio de cultivo Advanced-DMEM (**Gibco®**, **EUA**) suplementado con 4% de suero fetal bovino (**SFB**), 1% de L-glutamina y 1% de una mezcla de antibiótico (10 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ estreptomicina y 10 000 unidades/ mL de penicilina) – antimicótico (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anfotericina); se mantuvieron en una incubadora a 37°C, en una atmosfera húmeda y con una mezcla de 5% de CO₂ y 95% de aire. Cada 7 días se sometió a las células del cultivo madre a un proceso de tripsinización, el cual consistió en los siguientes pasos:

- 1) Primero, se retiró el medio de cultivo y se lavó dos veces con 5 ml de PBS estéril.
- 2) Se adicionó 2ml de una solución de Tripsina - EDTA al 0.25% (**SIGMA-Aldrich**), con el fin de despegar las células, durante 5 minutos.
- 3) Posteriormente de despegarlas mecánicamente, la suspensión celular se transfirió a un tubo cónico y se centrifugó a 1500 rpm por 5 minutos.
- 4) Se eliminó el sobrenadante y la pastilla celular se resuspendió en medio de cultivo fresco, a partir del cual se tomaron alícuotas para regenerar el cultivo madre, y además se sembraron placas de 6 pozos para los diversos ensayos realizados.

▪ **EXPERIMENTOS DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CON TRANSCRIPTASA INVERSA (RT-PCR)**

a) Extracción y cuantificación del ARN total.

Se realizó la extracción de ARN total de las células MDA MB 231 utilizando el kit comercial Cell Total RNA Purification Mini Kit (**Favorgen Biotech**). Antes de proceder a realizar la extracción, se sometió a las células al proceso de tripsinización antes descrito, posterior a esto, se siguió las indicaciones de uso estandarizado del proveedor.

A partir del ARN total extraído se evaluó su calidad y cantidad por espectrofotometría. Para ello se empleó una dilución de 4 μ L de muestra y 196 μ L de agua estéril, para obtener un volumen final de 200 μ L. La concentración fue evaluada a una longitud de onda de 260nm a 280nm (A260nm/A280nm), considerando un cociente obtenido entre 1.6-2.0 como una muestra de buena calidad para proceder a los ensayos.

b) Síntesis de ADNc – Transcripción reversa (RT).

La RT es el proceso mediante el cual el ARN se utiliza como molde para la síntesis de la cadena de Ácido Desoxirribonucleico complementario (**ADNc**); gracias a la acción de la enzima transcriptasa reversa.

Se realizó la síntesis del ADNc a partir del ARN procedente de las células MDA-MB 231 de las diferentes condiciones, llevándose antes a una misma concentración de RNA cada condición y agregando un volumen de 7.5µL de la mezcla de trabajo común a todas las condiciones (**Figura 7a**).

Se utilizó el kit comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription (**Applied Biosystems**) siguiendo las indicaciones del fabricante, se llevó a cabo el protocolo de elongación en un termociclador (**Eppendorf Mastercycler X50s**) bajo las siguientes condiciones: 10 minutos a 25°C, 2 horas a 37°C, 5 minutos a 85°C y finalmente la temperatura de los tubos se llevo a 4°C (**Figura 7b**).

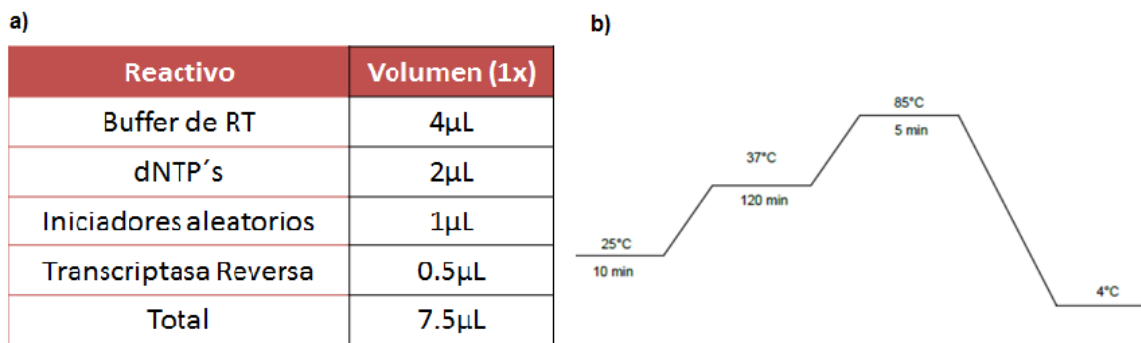


Figura 7: RT-PCR (a) Reactivos de trabajo para la obtención de la mezcla de trabajo común y (b) el protocolo de elongación de la misma.

c) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Al finalizar la RT, se procedió a realizar la PCR, la cual es una técnica empleada para amplificar una secuencia de ADN; mediante una sucesión de 3 fases que son: desnaturalización del ADNc, alineación de oligonucleótidos y finalmente una extensión. La mezcla de la reacción se realizó mediante el kit Dream Taq PCR Master Mix (2X) (**Thermo Scientific**) cuyos componentes son: dNTPs, enzima Taq polimerasa, MgCl₂ y

una solución buffer. A esta mezcla se adicionaron los oligonucleótidos sentido y anti-sentido para la amplificación específica, cuya secuencia se presenta a continuación:

| PRIMER | DIRECCIÓN | SECUENCIA (Sentido 5'-3') | TAMAÑO |
|------------------------------|-----------|------------------------------|--------|
| <i>B Actina</i> | Forward | CAAGAGATGGCCACGGCTGCT | 218 pb |
| | Reverse | TCCTTCTGCATCCTGTCCGCA | |
| <i>ERα</i> | Forward | ATGCCCTTGTGGTTTAAG | 321 pb |
| | Reverse | CTCCAGATTCTCAGTCCTTTG | |
| <i>ERβ</i> | Forward | CCTCTCAAACACTCACCTCATT | 526 pb |
| | Reverse | GAGGATAGGCATCGGCATTT | |
| <i>GPER 30</i> | Forward | CTCTTCCTGCAGGTCAACAT | 432 pb |
| | Reverse | TTAGGCAGCTGTTGGAGAAG | |
| <i>IGF-1</i> | Forward | CTAAGGAGGCTGGAGATGTATTG | 457 pb |
| | Reverse | TTGAGAGGCAGGGACTAAGA | |
| <i>IGF-R1</i> | Forward | CAGAGAGATGACAGCACAAGAG | 583 pb |
| | Reverse | TGAGCAGAGAGGTGAGTTAGT | |
| <i>IGF-2</i> | Forward | CTCTTCTCCCTTGGACTTTGAG | 223 pb |
| | Reverse | CCTCTGACTGCTCTGTGATTT | |
| <i>IGF-R2</i> | Forward | CTCCACAGCCATCTTCTTCTAC | 424 pb |
| | Reverse | CCGAATCCCATCTGGACATAAG | |
| <i>e-Cadherina</i> | Forward | TTCCCTCGACACCCGATTCAAAGT | 877 pb |
| | Reverse | TTCCCTCGACACCCGATTCAAAGT | |
| <i>Zeb1</i> | Forward | TTCAGCATCACCAGGCAGTC | 736 pb |
| | Reverse | GAGTGGAGGAGGCTGAGTAG | |
| <i>Nav 1.5</i> | Forward | CCTTGTGGTCCTGAATCTCTTC | 393 pb |
| | Reverse | GGCTGTTCTCCTCATCTTCTTC | |
| <i>Ki-67</i> | Forward | AGTACCAGGAGGTGAGGATAAA | 415 pb |
| | Reverse | CTGCACTGGAGTTCCCATAAA | |
| <i>INSR</i> | Forward | GGCTGAGGATGATTGAGAAAG | 259 pb |
| | Reverse | GGGACTACAGCACATCCATTTA | |
| <i>MMP 14</i> | Forward | AACAGGCAAAGCTGATGCAGACAC | 314 pb |
| | Reverse | AGAAGATCATGATGTCGGCCTGCT | |

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para ensayos de PCR

d) Separación electroforética de los amplicones y análisis densitométrico.

Concluida la PCR se procedió a la separación de los productos obtenidos (amplicones). Esto, se realizó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa. Las muestras cargadas en el gel se corrieron con DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) (**Thermo Scientific, EUA**), con el fin de separar los amplicones. Se empleó un marcador de peso molecular de ADN para calcular el tamaño aproximado de las bandas obtenidas. La imagen se obtuvo mediante un documentador de geles (**Gel Documentation System – Bc AXYGEN**). Mientras que la densitometría de las bandas se realizó mediante el software Image J (**NIH USA**), que es proporcionado gratuitamente por el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de América.

- **INMUNOCITOQUÍMICA**

La inmunocitoquímica es una técnica usada para la localización de moléculas en los tejidos mediante el empleo de anticuerpos. Se basa en la alta especificidad que tienen los anticuerpos para reconocer a moléculas específicas y unirse a estas. Además, dichos anticuerpos pueden conjugarse con enzimas y/o sustancias que permitan detectar cantidades ínfimas de moléculas presentes en el tejido. Se utilizó el péptido sintético correspondiente a Ki-67 humano conjugado con hemocianina de lapa californiana (**abcam®, LON**), y se siguió las indicaciones del proveedor para la tinción de las células.

- **ELISA**

Para la detección y cuantificación de proteína tanto en el medio de cultivo como en lisado celular, se pidió apoyo a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM para utilizar la plataforma Luminex, esta tecnología de alto rendimiento produce resultados comparables a los ensayos por inmunoabsorción ligados a enzimas (**ELISA**), pero con mayor eficacia, velocidad e intervalo dinámico. Este sistema permite la

detección fluorométrica simultánea de varios analitos por muestra. La muestra es incubada en presencia de varios anticuerpos primarios asociados a microesferas que reconocen de manera específica el analito de interés, posteriormente se agregan un anticuerpo de detección acoplado a ficoeritrina para después ser leída la muestra. Particularmente, la muestra obtenida de medio de cultivo y lisado celular fue incubada en presencia de microesferas asociadas al anticuerpo primario que reconoce IGF-2, en condición control y presencia independiente de estradiol, DPN y PHTTP.

- **ENSAYO DE PROLIFERACIÓN (CONTEO CELULAR)**

Las células MDA MB 231 fueron tripsinizadas y sembradas en placas de 6 pozos utilizando el medio de cultivo Advanced-DMEM (**Gibco®**, **EUA**) suplementado con 4% de SFB, 1% de L-glutamina y 1% de una mezcla de antibiótico–antimicótico. Después de 72 horas de tratamiento con IGF-2 a diferentes concentraciones (13nM y 26nM), las células fueron tripsinizadas y resuspendidas en medio de cultivo. Posteriormente la suspensión celular fue transferida a tubos de microcentrifuga de 1.5 ml y se realizó el recuento con el equipo Scepter 2.0 Handheld Automated Cell Counter (**Merck Millipore, Alemania**), equipado con un sensor de 60µm, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Finalmente se obtuvo el número de células y la distribución del volumen de los histogramas, los datos fueron analizados con el programa Scepter 2.0, versión Pro 2.1.

- **ENSAYOS DE MIGRACIÓN**

- **ÁREA DE HERIDA**

El cultivo celular se mantuvo bajo condiciones estándar hasta que alcanzó una confluencia del 60%, a partir de ese punto, se iniciaron los pre-tratamientos de 72 horas con diferentes concentraciones de IGF-2 (13nM y 26nM). Al finalizar la duración de tratamiento de cada condición experimental, se realizó una herida en la monocapa con una micropipeta P200, con un grosor aproximado de 600µm. Concluida la duración del

tiempo de incubación, y para evaluar el área herida, se retiró el medio de cultivo y se realizaron 3 lavados con PBS 1x. Las células se fijaron con una solución de metanol-acetona para finalmente ser teñidas con cristal violeta al 0.5 %.

Para analizar los cambios en el área de herida se tomaron microfotografías de 5 campos aleatorios de cada condición con un microscopio de campo claro Leica DM1000 utilizando el objetivo 10x, una cámara modelo ProRes10 Jenoplik empleando el programa pro2.1; para ser analizadas con el programa Image J. Los datos fueron normalizados con respecto de los valores obtenidos del control.

MIGRACIÓN EN CÁMARA TRANSWELL

Para evaluar la migración de las células MDA-MB-231 se emplearon Soportes Permeables Transwell® con poros de 8 µm de diámetro (**Corning Incorporated, EUA**). Se sembraron células bajo las condiciones antes descritas; hasta llegar a la confluencia requerida y se pre trataron con IGF-2 a diferentes concentraciones (13nM y 26nM) durante el tiempo establecido (72 horas). Una vez terminado el periodo de incubación se preparó una suspensión celular con un número conocido de células, con ayuda del citómetro de flujo portátil Scepter 2.0. Estas se sembraron en el inserto superior de la cámara en medio DMEM libre de SFB, mientras que en el compartimento inferior de la cámara se colocaron las diferentes condiciones de tratamiento de IGF-2 (anteriormente descritas) disueltas en medio de cultivo DMEM suplementado con SFB, como agente quimio atrayente. Al concluir el periodo de incubación se retiró el medio de cultivo de los dos compartimentos. Las células que lograron migrar hacia la parte inferior, a través de los poros de la membrana, fueron fijadas con metanol - acetona y teñidas con cristal violeta. Se obtuvieron microfotografías de 5 campos aleatorios a 10X para la realización del conteo celular con ayuda del software *ImageJ*. Los datos fueron normalizados con respecto de los valores obtenidos del control.

- **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El análisis estadístico y las gráficas se realizaron con el software SigmaPlot 11.0 (**Jandel Corporation, EUA**). Se utilizó la *prueba t de Student*, para muestras independientes con distribución normal y varianza homogénea, para evaluar la diferencia entre las medias de los datos obtenidos para cada grupo experimental; y se determinó si entre dichos parámetros las diferencias son estadísticamente significativas o no, tomándose como parámetro de significancia, un valor de $p < 0.5$ (*). Las gráficas muestran el valor promedio \pm error estándar

RESULTADOS

Las células MDA-MB 231 expresan de manera diferencial el ARNm que codifican para los tres diferentes receptores a estrógenos (ER α , ER β y GPER30) así como los diferentes elementos del sistema de IGF (IGF-1, IGF-R1, IGF-2 e IGF-2R).

Para determinar si las células MDA-MB 231 expresan el ARNm que codifican para los 3 diferentes receptores a estrógenos: ER α , ER β y GPER30, realizamos ensayos de RT-PCR de punto final. Los resultados indican que las células MDA-MB 231 expresan de manera preferencial el ER β , hay bajos niveles de expresión de GPER y está ausente el ARNm para el ER α , tal y como se esperaba en células de cáncer de mama triple negativo (Figura 8).

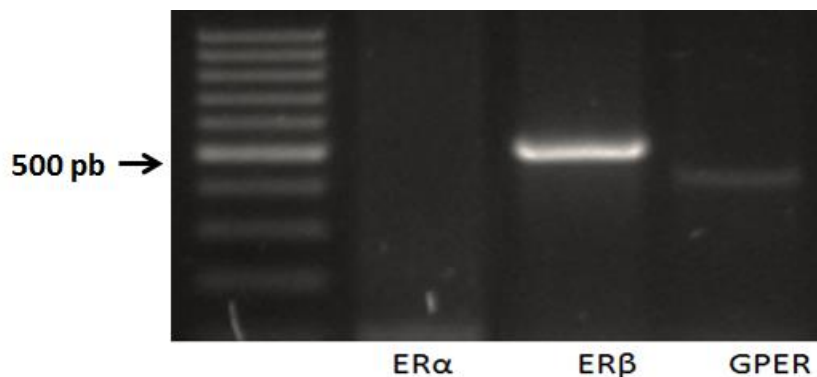


Figura 8. Nivel de expresión del ARNm para ER α (321 pb), ER β (526 pb) y GPER (432 pb)

La siguiente pregunta fue determinar si las células MDA-MB 231 en condiciones basales de cultivo expresan el ARNm que codifica para los diferentes elementos moleculares del sistema IGF/IGFR (IGF-1, IGF-R1, IGF-2 e IGF-2R). De igual manera, realizamos ensayos de RT-PCR punto final para determinar su nivel de expresión. La figura 9

muestra que las células MDA-MB 231 expresan de manera diferencial los 4 elementos del sistema IGF, observándose una mayor cantidad de ARNm que codifica para IGF-2 con respecto al que codifica para IGF-1, y en cuanto a nivel de expresión de los receptores, se observó un mayor nivel de expresión para IGF-R1 que para IGF-2R.

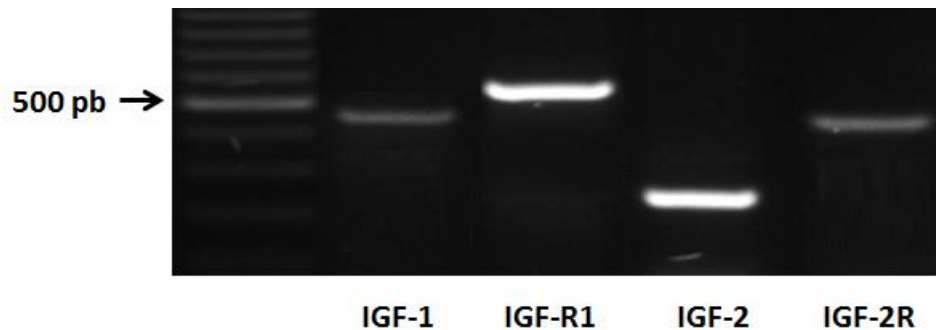


Figura 9. Nivel de expresión del ARNm para IGF-1 (457 pb), IGF-R1 (583 pb), IGF-2 (223 pb) e IGF-R2 (424 pb)

La activación del ER β afecta de manera diferencial la expresión de los distintos elementos del sistema IGF/IGFR en las células MDA-MB 231.

El trabajo previo realizado por Avalos (2017) en el laboratorio de Neuroendocrinología del Instituto de Fisiología BUAP, mostró que la activación del ER β con un agonista específico, DPN, estimula la capacidad proliferativa y la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231, el efecto de DPN es dosis-dependiente, siendo una concentración óptima de 1 μ M. En este momento se desconoce el mecanismo molecular a través del cual, la activación del ER β incide sobre la capacidad proliferativa y migratoria de las células MDA-MB 231. Se ha planteado la expresión de factores de crecimiento relacionados con el potencial metastásico de las células tumorales, tal es el caso del IGF, el cual se ha involucrado en diferentes tipos de cáncer. Para el caso del TNBC se desconoce su probable participación.

Con el fin de elucidar la posible relación entre la activación del ER β y el sistema de IGF, evaluamos en una primera etapa experimental por RT-PCR de punto final, si la presencia de 1 μ M de DPN a diferentes tiempos de tratamiento en un medio reducido de estrógenos, altera el nivel de expresión del ARNm que codifica para los 4 elementos propios del sistema de IGF (IGF-1, IGF-2, IGF-R1 e IGF-R2).

La activación crónica del ER β muestra efectos diferenciales sobre los niveles de expresión de los elementos moleculares del sistema IGF, se observó, por un lado, un aumento a las 72 horas en los niveles de expresión del ARNm que codifica para IGF-2 e IGF-R1, y una reducción para IGF-1 e IGF-R2 a diferentes tiempos de tratamiento (Figura 10).

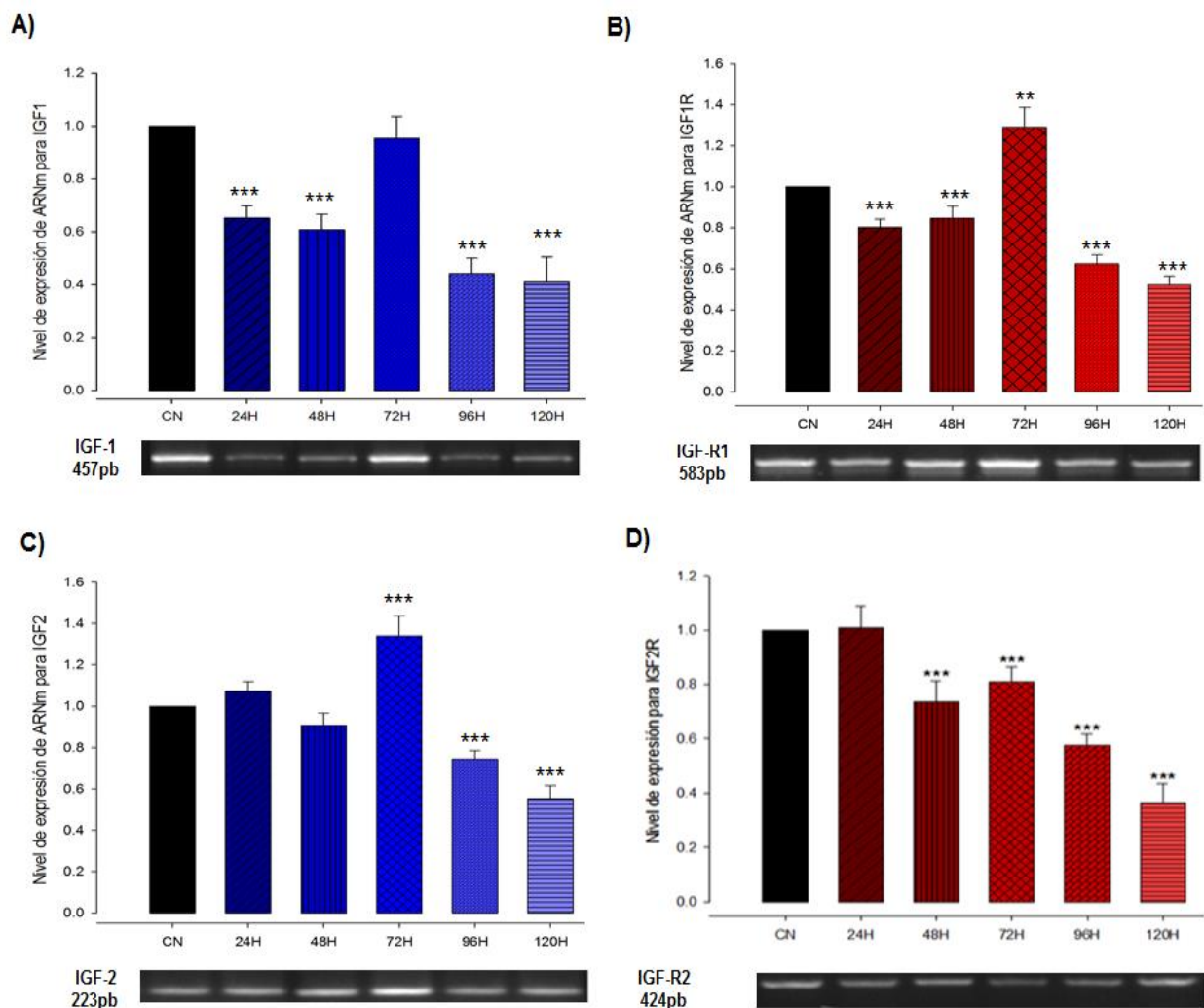


Figura 10. La estimulación del ER β en un medio reducido en estrógenos afecta el nivel de expresión de ARNm de los diferentes elementos del sistema de IGF en células MDA-MB 231. Las células fueron tratadas durante diferentes tiempos (24H, 48H, 72H, 96H, 120H) con DPN a una concentración de 1 μ M. Se aprecia un aumento significativo a las 72 horas en los niveles de expresión del ARNm que codifica para IGF-2 **C)** e IGF-1R **B)**. Además se aprecia una reducción para IGF-1 **A)** e IGF-2R **D)**. Todos los datos fueron normalizados respecto a beta actina. n=4 **p \leq 0.01 y ***p \leq 0.001

Con el fin de comprobar que los efectos observados sobre el nivel de expresión del ARNm que codifica para los elementos moleculares del sistema IGF se deben a la activación específica del ER β , evaluamos el efecto en presencia nuevamente del agonista DPN (1 μ M) y de un antagonista específico, PHTTP (10 μ M), por un periodo de 72 horas de tratamiento. Las células MDA-MB 231 en presencia de DPN muestran un incremento en el nivel de expresión del ARNm que codifica para IGF-2, una reducción en

los niveles de IGF-1 y de IGF-R2, mientras que los niveles de expresión de IGF-R1 no muestra cambio alguno. De manera interesante, la presencia de PHTTP, induce una reducción en la expresión de IGF-2, tal y como se esperaba, pero también disminuye la expresión de IGF-1 e IGF-R2, efecto muy similar al observado en presencia del agonista, careciendo hasta el momento de una explicación al respecto, y en referencia a la expresión de IGF-R1, no se observa algún cambio significativo (Figura 11).

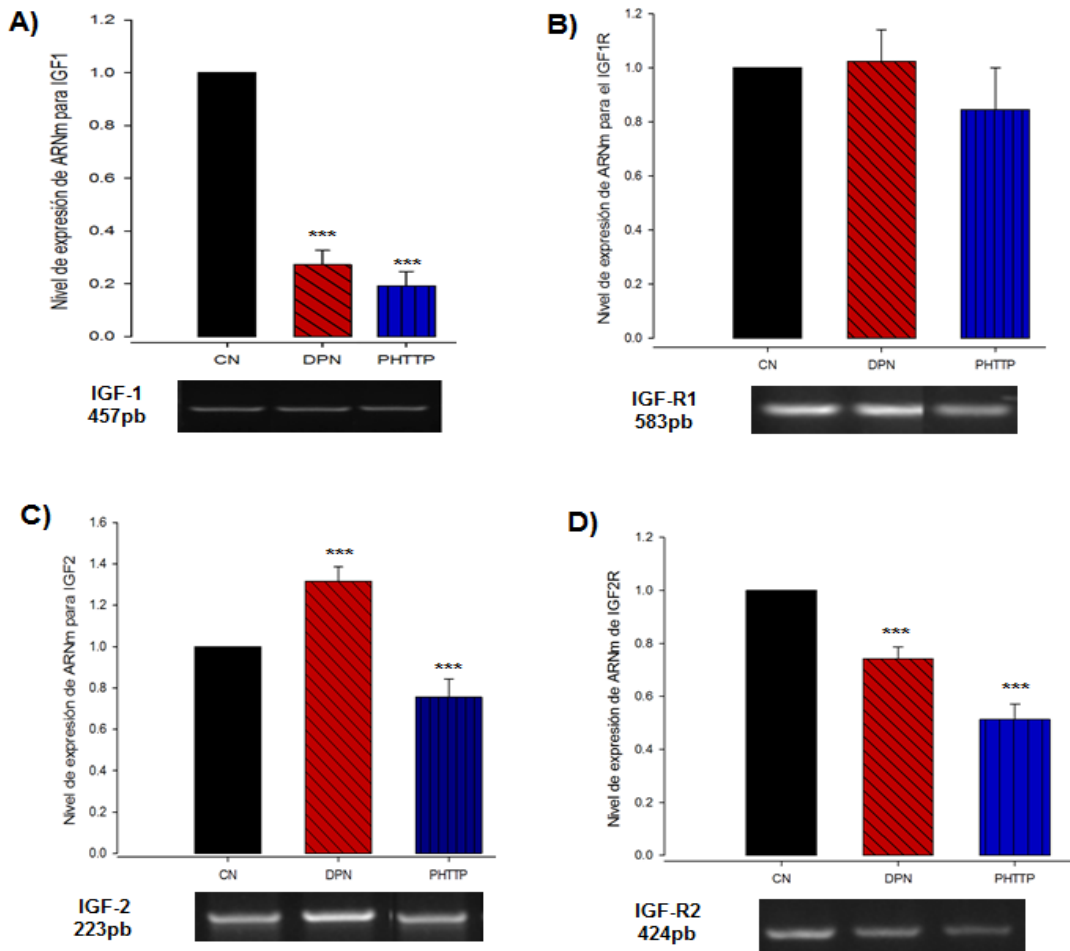


Figura 11. La activación del ER β afecta de manera diferencial la expresión de los distintos elementos del sistema IGF/IGFR en las células MDA-MB 231. Las células fueron tratadas durante 72 horas con DPN 1 μ M o PHTTP 10 μ M. **A)** Se cuantificó la expresión a nivel de ARNm de IGF-1 observando una reducción significativa para ambas condiciones (DPN y PHTTP), mientras que **B)** IGF-R1 no presenta diferencias significativa en ninguna de las condiciones. **C)** IGF-2 muestra un aumento significativo con DPN, pero al ser tratada con PHTTP exhibe una reducción significativa, mientras que **D)** el nivel de expresión de ARNm para IGF-R2 se ve reducido significativamente en ambas condiciones. Todos los datos fueron normalizados respecto a beta actina. n=4. ***p \leq 0.001

Es un hecho, que la activación del ER β induce un aumento en la expresión del ARNm que codifica para IGF-2, por lo que se decidió investigar, si este aumento en los niveles de ARNm se asociaba con un cambio en el mismo sentido en la producción de dicho factor de crecimiento. Para lo cual, se consideraron 3 condiciones de nuestro modelo experimental: condición control, tratamiento con DPN 1 μ M o con PHTTP 10 μ M por 72 horas. Al finalizar el periodo de tratamiento, se recuperó el medio de cultivo y se obtuvo el lisado celular respectivo, para a partir de estas muestras determinar la cantidad de IGF-2 presente, mediante la plataforma Luminex.

Los resultados obtenidos muestran que la activación del ER β por DPN induce un incremento significativo en la síntesis (lisado celular) y secreción de IGF-2 (medio de cultivo recuperado), complementando los resultados obtenidos en la RT-PCR de punto final. Es importante mencionar que gran parte del IGF-2 sintetizado *de novo* es liberado al medio extracelular al ser activado el ER β , alcanzando una concentración máxima de 800 pg/ml con respecto a los 420 pg/ml presentes en la condición control, es decir, casi el doble, ocurre un fenómeno similar en el lisado celular. El bloqueo del ER β por PHTTP no modifica la cantidad de IGF-2 producida de manera basal (Figura 12).

En conclusión y para fines prácticos del presente trabajo de tesis, la activación del ER β por DPN favorece la expresión de uno de los elementos moleculares del sistema IGF, que es el IGF-2. La relevancia funcional de este factor de crecimiento sobre la capacidad proliferativa y la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231 será evaluada posteriormente.

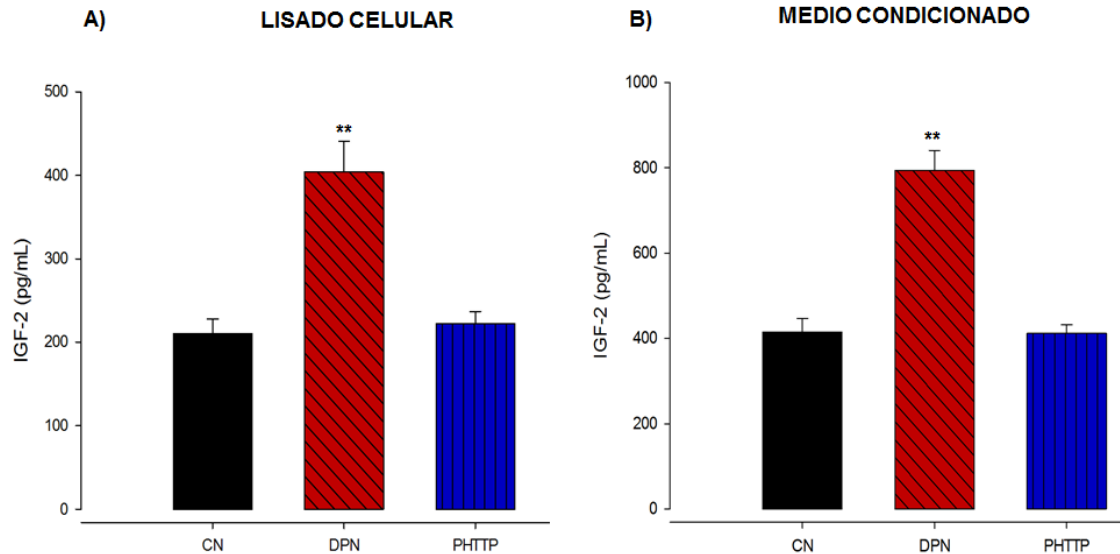


Figura 12. La activación específica del ER β aumenta IGF-2 a nivel de proteína en células MDA-MB 231. Las células fueron tratadas durante 72 horas con DPN a 1 μ M o PHTTP a 10 μ M. La activación del ER β por DPN induce un incremento significativo en la síntesis (lisado celular) **A**) y secreción de IGF-2 (medio de cultivo recuperado) **B**). Mientras que el bloqueo del ER β por PHTTP no modifica la cantidad de IGF-2 producida de manera basal. n=4. **p \leq 0.01

La presencia de IGF-2 estimula la capacidad proliferativa de las células MDA-MB 231.

Inicialmente, para evaluar si la presencia de IGF-2 influye sobre la capacidad proliferativa de las células MDA-MB 231, determinamos por RT-PCR de punto final, el nivel de expresión del ARNm que codifica para Ki-67, marcador nuclear de proliferación celular, en presencia y ausencia de IGF-2 por 72 horas de tratamiento. Reportes en la literatura muestran que el IGF-2 a concentraciones de 13 y 26 nM ejerce efectos significativos sobre la proliferación de células tumorales, por lo que consideramos estas concentraciones para los experimentos. Los resultados obtenidos muestran que el nivel de expresión de ARNm para Ki-67 aumenta significativamente tras la exposición a IGF-2 por 72 horas, y que este efecto es dosis dependiente, 120% para la concentración de 13 nM y de 207% para la concentración de 26 nM, esto con respecto al 100% de la condición control (Figura 13.A). Ensayos de inmunocitoquímica nos ayudaron a detectar

cambios en los niveles de expresión de esta proteína en las tres condiciones experimentales, observando que las células MDA-MB 231 presentan una mayor inmunorreactividad al anticuerpo que reconoce a Ki-67 a una concentración de IGF-2 a 26 nM (Figura 13.B).

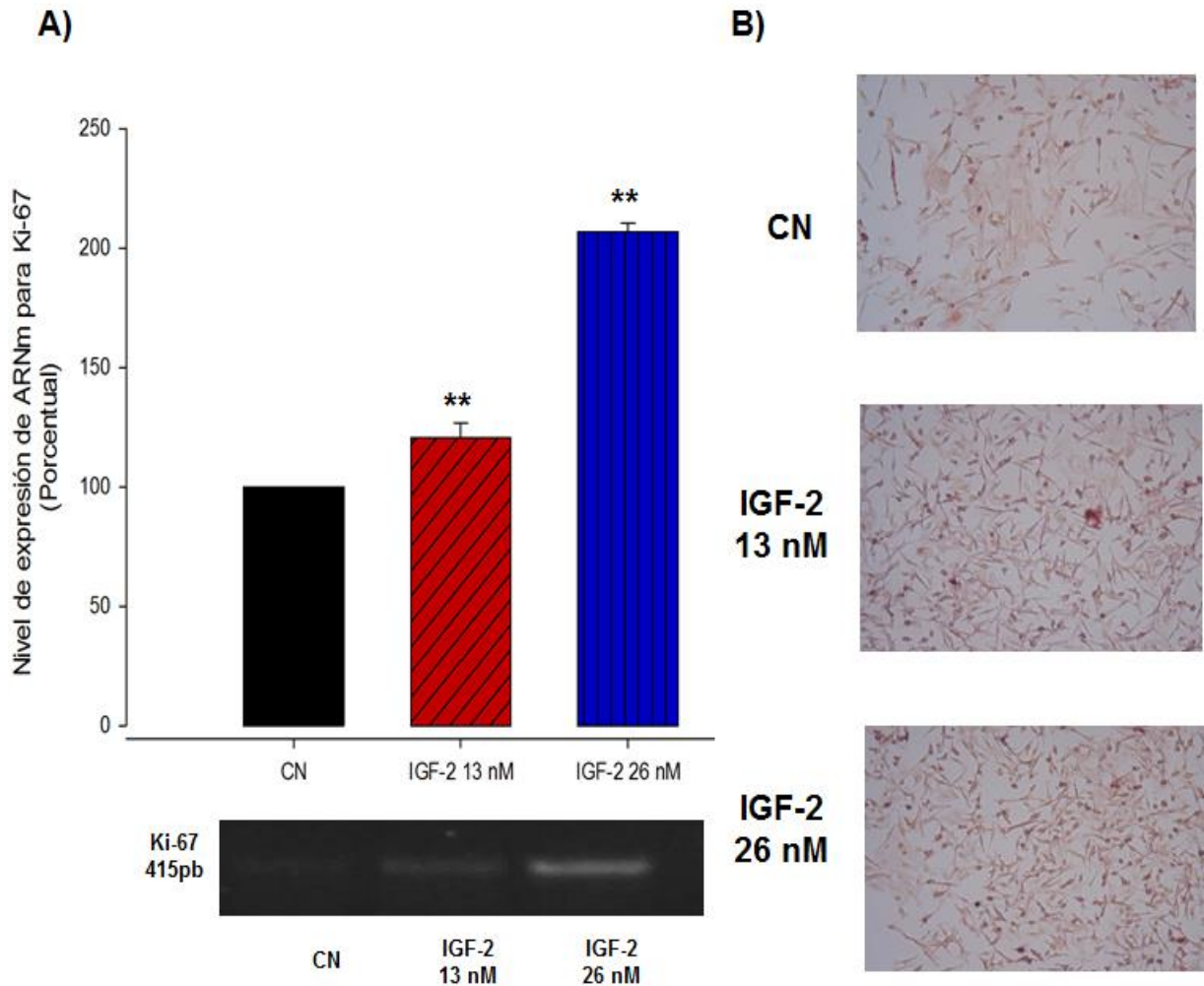


Figura 13. IGF-2 estimula la sobre expresión del marcador nuclear de proliferación Ki-67 de manera dosis dependiente. Las células MDA-MB 231 fueron tratadas con 13nM y 26nM de IGF-2 durante 72 horas. **A)** Se cuantificó el nivel de expresión a nivel de ARNm de Ki-67 observando un aumento significativo dosis-dependiente. Los datos fueron normalizados respecto a beta actina. n=3. **p<0.01 **B)** Así mismo las células MDA-MB 231 presentan una mayor inmunorreactividad al anticuerpo que reconoce a Ki-67 a una concentración de IGF-2 a 26 nM.

De manera general, se considera la existencia de un correlato positivo correlato entre la sobre-expresión de Ki-67 y un aumento en la población celular, por lo que decidimos realizar a continuación, la cuantificación de células en presencia y ausencia de IGF-2. Para lo cual se empleó un citómetro de flujo portátil (Scepter 2.0), que además de proporcionar el número de células por mL de suspensión celular también nos da un histograma de frecuencias con respecto al diámetro de las células. El tratamiento de las células con IGF-2 (13 y 26 nM) no modifica el número total de células (Figura 14A), así como su diámetro (Figura 14B), esto con respecto a la condición control; probablemente si aumentamos la duración del tratamiento con IGF-2 se pudiera observar cambios en el tamaño de la población celular.

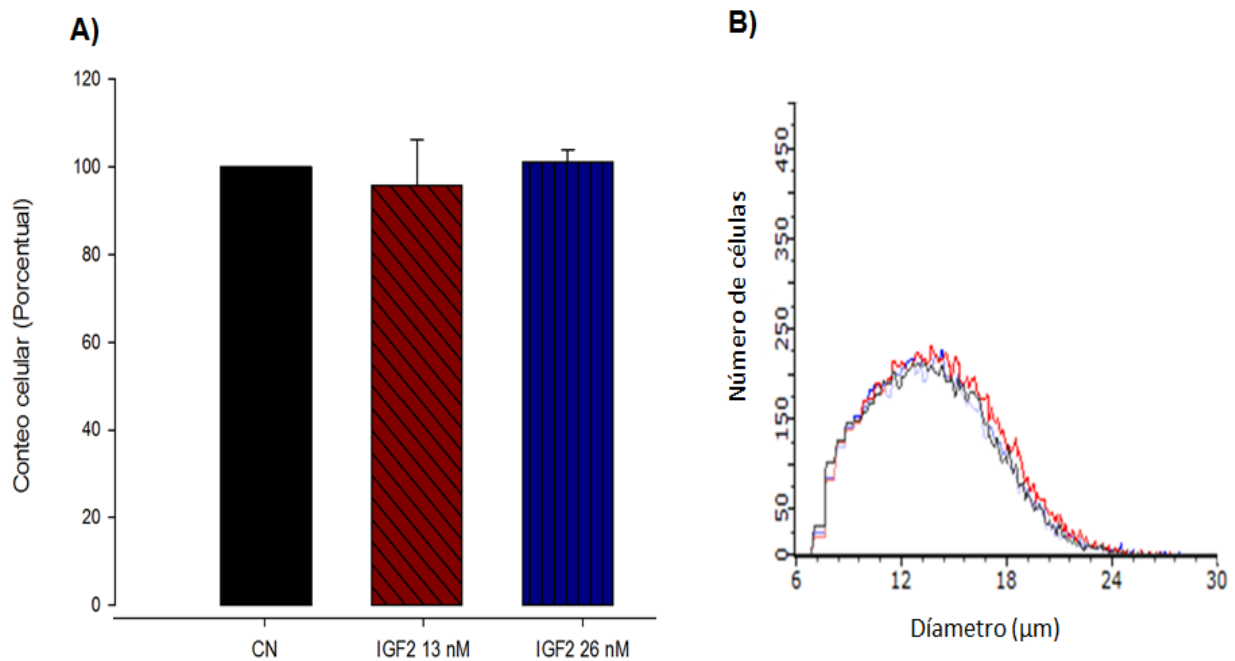


Figura 14. El número de células no se ve afectado por la presencia de IGF-2. Las células MDA-MB 231 fueron tratadas con 13nM y 26nM de IGF-2 durante 72 horas. **A)** No se observan diferencias significativas en el número de células entre las diferentes condiciones con respecto al control. **B)** Histogramas de frecuencias con respecto al diámetro de las células obtenidos por el Scepter 2.0. n=3.

La presencia de IGF-2 influye positivamente sobre la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231.

Corresponde ahora, evaluar si la presencia de IGF-2 influye sobre la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231, para lo cual realizamos dos tipos de ensayo: a) ensayo de área de herida y b) ensayo en cámara Transwell, el primero de ellos es un ensayo cualitativo, mientras que el segundo es semi-cuantitativo. Las células MDA-MB 231 se mantuvieron en presencia de IGF-2 (13 y 26 nM) por 72 horas. Para el ensayo de área de herida no se observó una diferencia significativa en las tres condiciones experimentales (Figura 15).

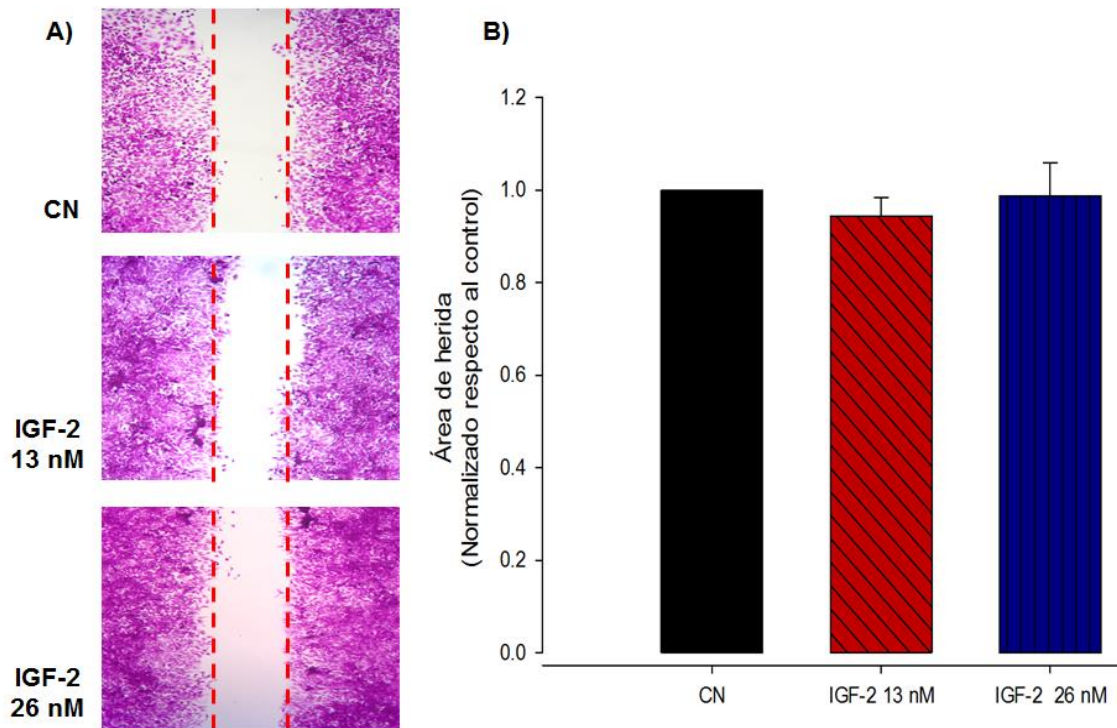


Figura 15. El área de herida de las células MDA- MB 231 no se ve afecto por la presencia de IGF-2 a 13nM y 26nM durante 72 horas. **A)** Microfotografías del ensayo de área de herida **B)** donde no se observan diferencias significativas, al realizar el análisis pertinente, en las células tratadas con IGF2 respecto al control. n=3.

De manera complementario, realizamos el ensayo de migración en cámara Transwell, y a diferencia de lo observado en el ensayo de cierre de herida, en este ensayo se observó un incremento de más del 30% en la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231 cuando son mantenidas en presencia de 13 nM de IGF-2, sin embargo, el efecto de IGF-2 no puede considerarse como dosis-dependiente, ya que a una concentración de 26 nM, se ve reducida la migración celular, 75% con respecto a la condición control, probablemente a esa concentración se haya sobresaturado el sistema, aunque será necesario realizar otros experimentos (Figura 16).

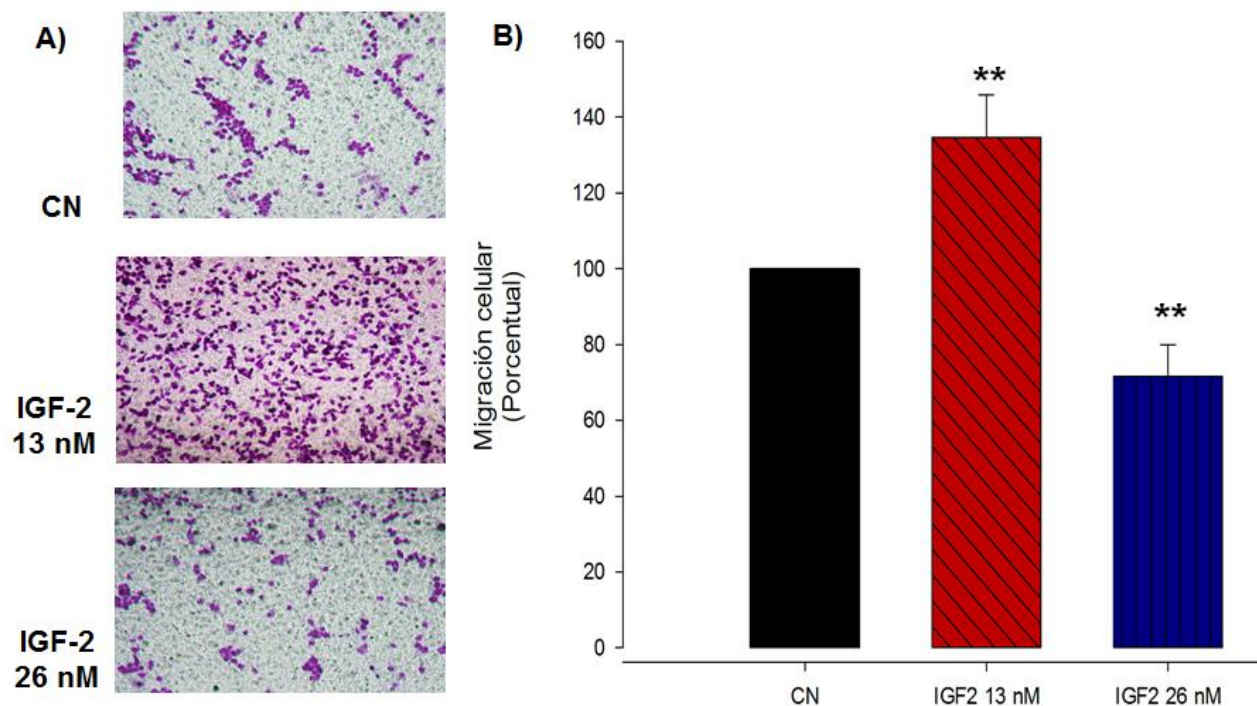


Figura 16. IGF-2 incide sobre la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231. Ensayo de migración en cámara Transwell, las células MDA-MB 231 fueron tratadas con IGF-2 a 13nM y 26nM durante 72 horas. **A)** Microfotografías del número de células que migro **B)** donde se observa un aumento de hasta el 30% del número de células que migro con IGF2 13 nM, mientras que IGF-2 a 26 nM, reduce la migración celular hasta un 75% respecto al control. n=3 **p<0.01

IGF2 favorece la expresión de elementos moleculares MDA-MB 231, que participan en la migración.

Es un hecho que la capacidad migratoria de las células tumorales de origen epitelial se asocia positivamente con varios factores: a) el mantenimiento de su fenotipo mesénquimal; b) expresión de canales de sodio dependientes de voltaje Nav 1.5; y c) expresión de metaloproteinasas. El aumento observado en la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231 por la presencia de IGF-2 pudiera ser explicado por cualquiera de los tres factores anteriormente mencionados. Se decidió evaluar a continuación cada uno de ellos.

Para el primer factor, que es el mantenimiento del fenotipo mesénquimal, evaluamos el nivel de expresión del ARNm que codifica para un marcador de fenotipo mesénquimal (Zeb1) y un marcador de fenotipo epitelial (E-Cadherina). La Figura 17 muestra que la presencia de 26 nM de IGF-2 incrementa el nivel de expresión de Zeb1 más de un 40% con respecto a la condición control (**Figura 17A**), y reduce la expresión de E-Cadherina desde un 40 hasta un 70% con respecto a la condición control (**Figura 17B**). Se puede concluir que la exposición a IGF-2 acentúa el fenotipo mesenquimal de las células MDA-MB 231, favoreciendo su capacidad migratoria.

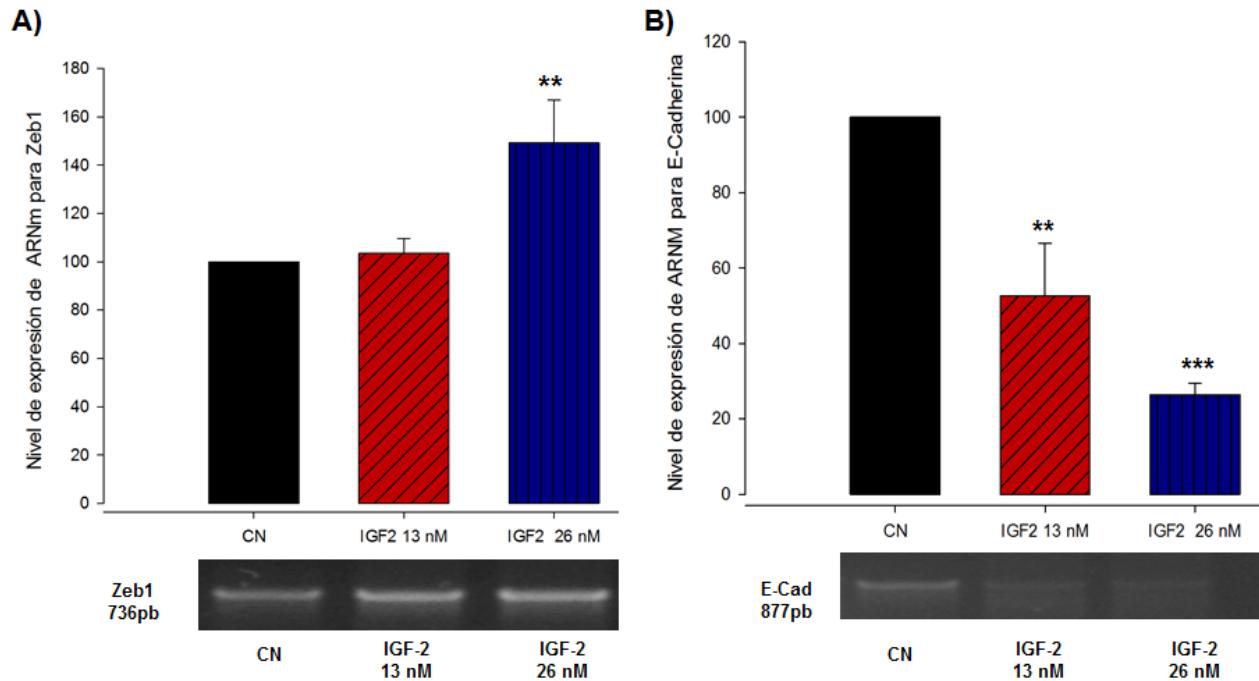


Figura 17. IGF-2 favorece el mantenimiento del fenotipo mesénquimal. Las células MDA-MB 231 fueron tratadas con IGF-2 a 13 nM y 26 nM durante 72 horas. **A)** Se cuantificó el nivel de expresión del ARNm para Zeb1 encontrándose una diferencia significativa en el grupo tratado con 26 nM. **B)** Mientras que E-Cadherina presenta una reducción significativa en ambas condiciones (13nM y 26nM). Todos los datos fueron normalizados respecto a beta actina. n=3. **p≤0.01 ***p≤0.001

El segundo factor a considerar en la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231 es la expresión del canal de sodio dependiente de voltaje Nav 1.5, un trabajo previo realizado por González en el año 2013 mostró que la presencia de EGF estimula la capacidad migratoria de la línea celular MDA-MB 231, y que este efecto se debía al menos en parte, a un incremento en la expresión funcional del Nav 1.5, ya que en presencia de TTX, bloqueador de este canal de sodio, se prevenía el efecto estimulador de EGF sobre la capacidad migratoria de estas células tumorales. Se evaluó por RT-PCR el nivel de expresión del ARNm que codifica para Nav 1.5 en presencia y ausencia de IGF-2 por 72 horas. Se observó que el tratamiento con IGF-2 (13 nM y 26 nM) induce un incremento significativo en el nivel de expresión del Nav 1.5 (3.5 y 2.8 veces respectivamente, en comparación con el valor de la condición control) (Figura 18).

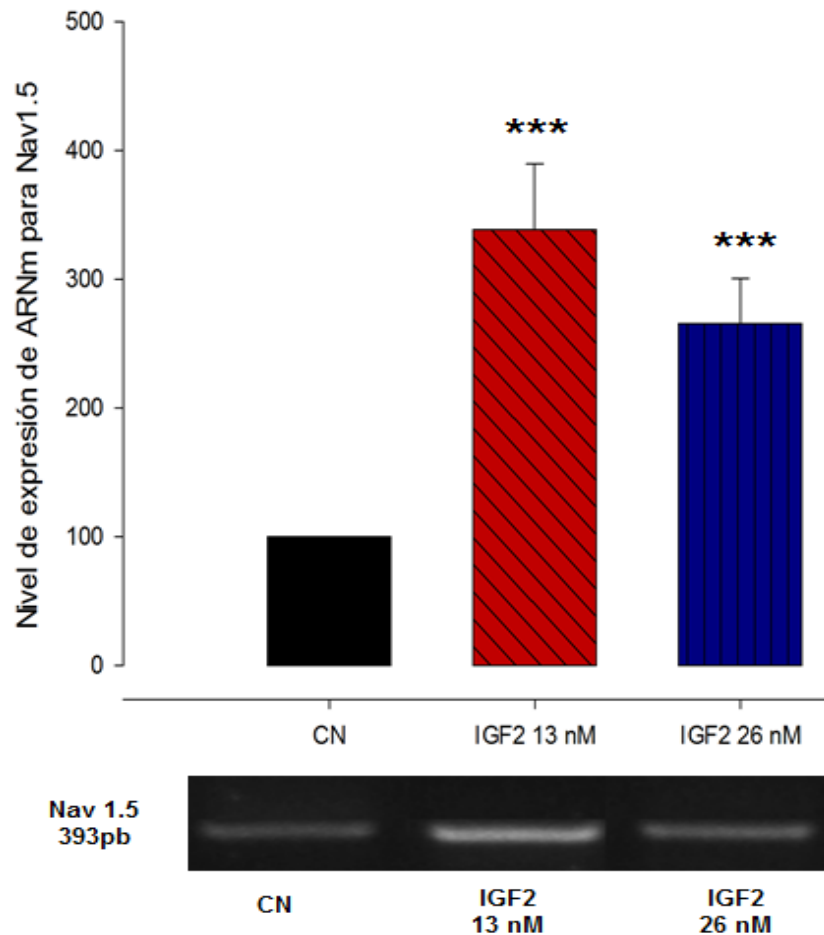


Figura 18. IGF2 afecta la expresión de canales de sodio dependientes de voltaje Nav 1.5. Las células MDA-MB 231 fueron tratadas con 13 nM y 26 nM de IGF-2 durante 72 horas. Se observa un aumento significativo de 3.5 (IGF-2 13 nM) y 2.8 veces (IGF-2 26 nM) respecto al control. Todos los datos fueron normalizados respecto a beta actina. n=3 ***p≤0.001

El tercer factor a considerar fue la expresión de metaloproteinas. Estudios previos mostraron una amplia participación de las metaloproteinasas -3, -7, -9 y 14 sobre la capacidad migratoria en células tumorales. En esta ocasión, solamente decidimos evaluar el nivel de expresión del ARNm que codifica para la metaloproteinas 14 (MMP-14) en presencia y ausencia de IGF-2 por 72 horas de tratamiento. La Figura 19 muestra claramente que la presencia de IGF-2, independientemente de la concentración empleada, induce un incremento de aproximadamente 4 veces sobre el nivel de expresión de la MMP-14 con respecto a la condición control.

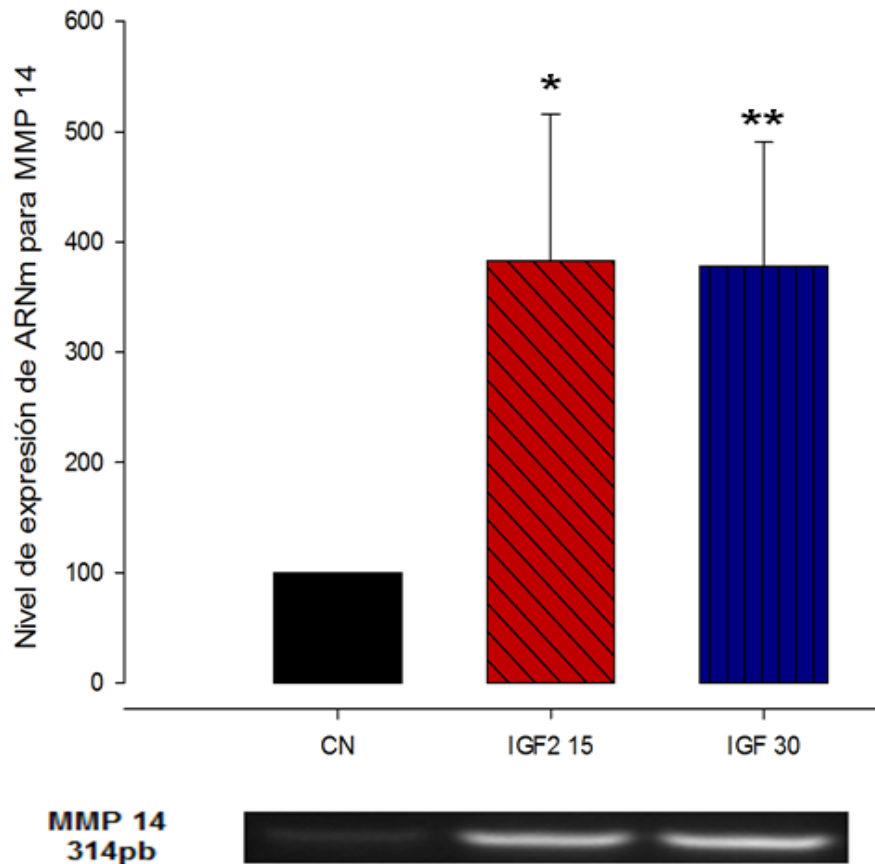


Figura 19. IGF2 afecta el nivel de expresión de ARNm para la MMP14. Las células MDA-MB 231 fueron tratadas con 13nM y 26nM de IGF-2 durante 72 horas. Se observa un aumento significativo de aproximadamente 4 veces para ambas condiciones. Todos los datos fueron normalizados respecto a beta actina. n=3 * $p \leq 0.05$ ** $p \leq 0.01$

Como conclusión de este apartado, se puede decir, que la presencia de IGF-2 exacerba la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231, y que este incremento se debe al menos parcialmente, a un aumento en la expresión del ARNm que codifica para un marcador de fenotipo mesenquimal (Zeb1), para el canal Nav 1.5 y la MMP-14.

La vía PI3K/AKT está involucrada en el efecto estimulador que ejerce el IGF-2 sobre la capacidad proliferativa y la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231.

El IGF-2 se une de manera específica al IGF-R1, receptor con actividad intrínseca de tirosina cinasa, que al autofosforilarse los dominios intracelulares, es capaz de activar dos principales vías de señalización: PI3K/AKT y la MAPK's.

Inicialmente decidimos evaluar la probable participación de la vía PI3K/AKT sobre el efecto estimulador que ejerce el IGF-2 en la capacidad proliferativa de las células MDA-MB 231, para lo cual empleamos un inhibidor específico de dicha vía, wortmanina (10 μ M), en presencia y ausencia de 13 nM de IGF-2 por 72 horas de tratamiento. Al finalizar el periodo de tratamiento, se realizó el conteo celular mediante un citómetro de flujo. Se observó en presencia de IGF-2 no hay diferencias respecto al control, mientras que tras la exposición a wortmanina, hay una reducción del 40% en la población celular, finalmente que en la condición combinada de IGF-2 con wortmanina, el inhibidor de la vía PI3K/AKT, previene el efecto de esta sobre la proliferación celular (**Figura 20**).

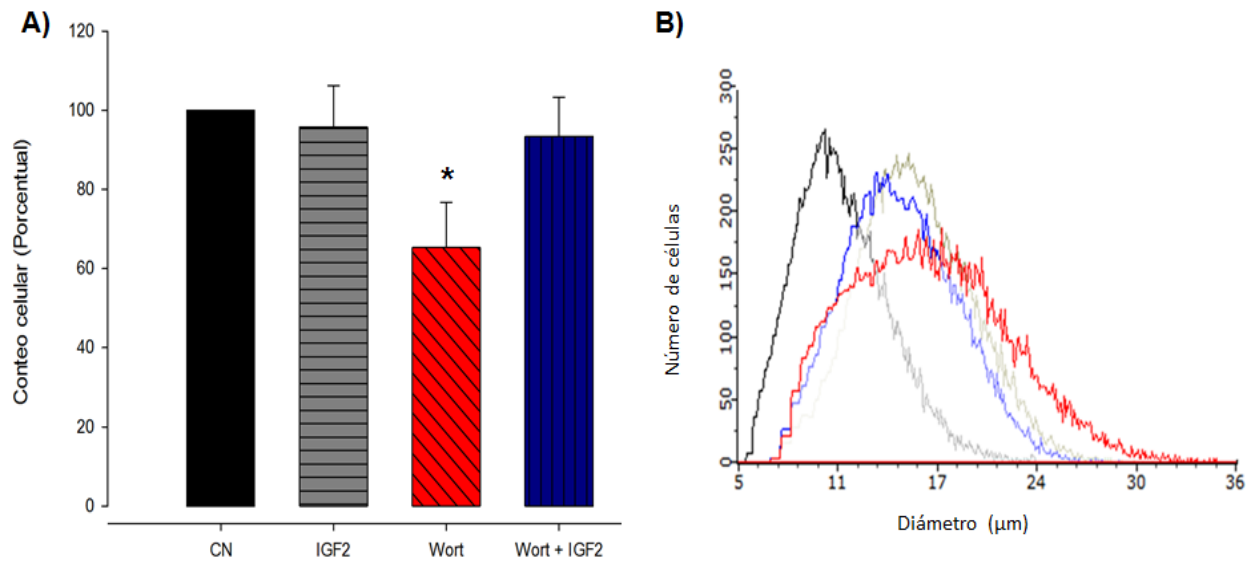


Figura 20. La vía PI3K/AKT está involucrada en el efecto estimulador que ejerce el IGF-2 sobre la capacidad proliferativa de las células MDA-MB 231. Las células fueron tratadas con IGF-2 13 nM, Wort 10µM y con Wort 10µM + IGF-2 13 nM durante 72 horas. **A)** Se observa una reducción significativa en el número de células tras la exposición a Wort con respecto al control. **B)** Histogramas de frecuencias con respecto al diámetro de las células obtenidos por el Scepter 2.0. n=3. *p<0.05

Posteriormente, analizamos la participación de la vía PI3K/AKT en la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231, para lo cual realizamos ensayos de migración en cámaras Transwell. Se trabajaron las mismas condiciones experimentales que para el ensayo de proliferación, referido anteriormente. De manera similar, se observa en la Figura 21, que la presencia de wortmanina reduce significativamente la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231, aproximadamente un 60% con respecto al grupo control; la presencia de IGF-2, tal como se había reportado previamente, induce un incremento aproximado del 30% en la capacidad migratoria, y que la presencia conjunta del inhibidor con el IGF-2, abate su efecto estimulador.

Estos resultados sugieren la participación de la vía PI3K/AKT sobre la capacidad migratoria estimulada de las células MDA-MB 231 por la presencia de IGF-2.

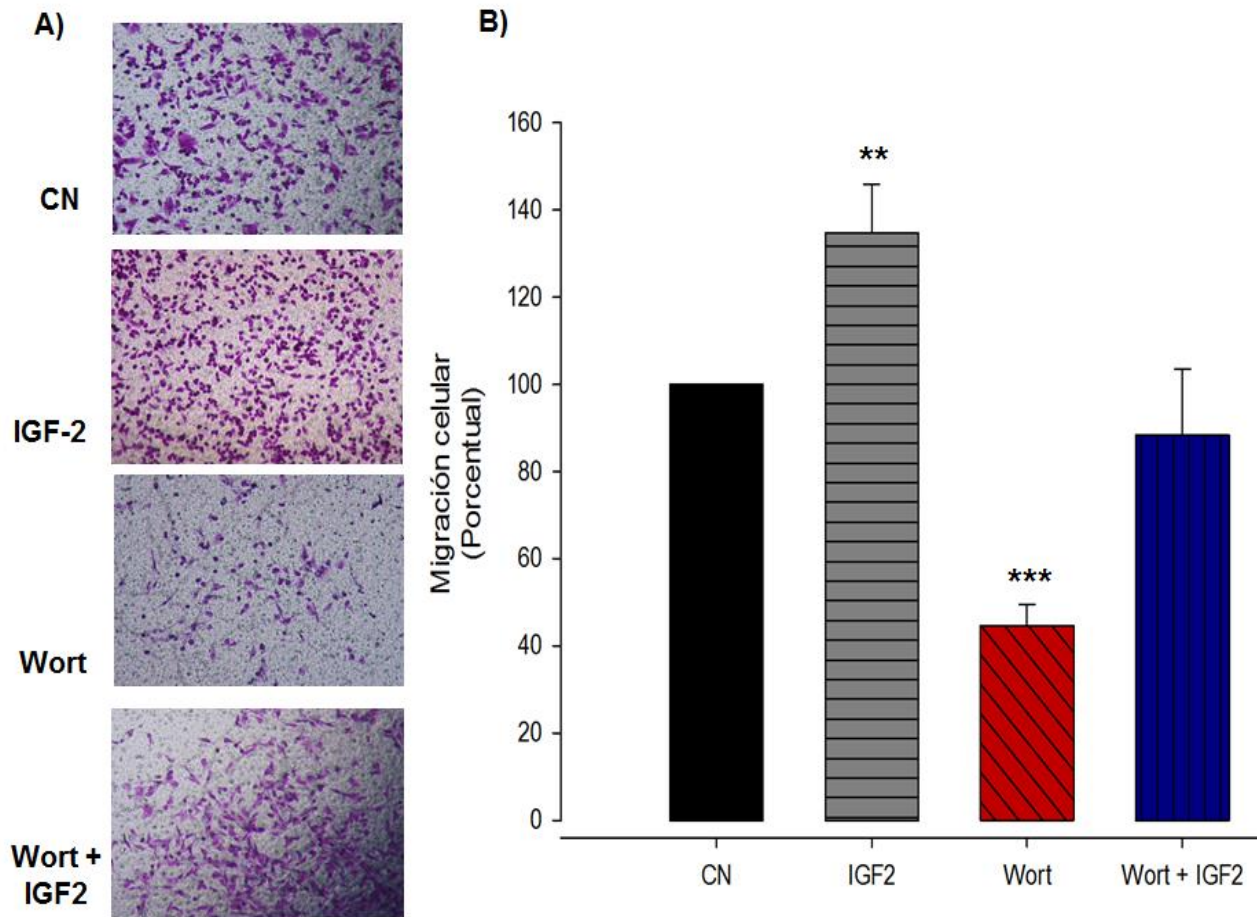


Figura 21. La vía PI3K/AKT está involucrada en el efecto estimulador que ejerce el IGF-2 sobre la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231. Las células fueron tratadas con IGF-2 13 nM, Wort 10 μ M y con Wort 10 μ M + IGF-2 13 nM durante 72 horas **A)** Microfotografías del número de células que migro **B)** donde se observa un aumento significativo tras la exposición a IGF-2, mientras que al tratar a las células MDA-MB 231 con Wort 10 μ M respecto al control. Todos los datos fueron normalizados respecto al control. n=3 ** p \leq 0.01 *** p \leq 0.001

La vía de las MAPK's está involucrada en el efecto estimulador que ejerce el IGF-2 sobre la capacidad proliferativa y la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231.

A continuación, procedimos a evaluar la probable participación de la vía de las MAPK's sobre el efecto estimulador que ejerce el IGF-2 en la capacidad proliferativa de las células MDA-MB 231, ya que esta vía también resulta activada cuando el IGF-2 se une a su receptor específico, IGF-R1. Para esta serie experimental empleamos un inhibidor específico de dicha vía, PD 98059 (25 μ M), en presencia y ausencia de 13 nM de IGF-2 por 72 horas de tratamiento. Al finalizar el periodo de tratamiento, se realizó el conteo celular mediante un citómetro de flujo. Se observó que no hay cambios en el número de células en presencia IGF-2, que tras la exposición a PD 98059 hay una reducción del 45% en el tamaño de la población celular, mientras que en la condición combinada de IGF-2 con PD 98059, se previene el efecto inhibitorio que ejerce el PD 98059 sobre la proliferación celular (**Figura 22**).

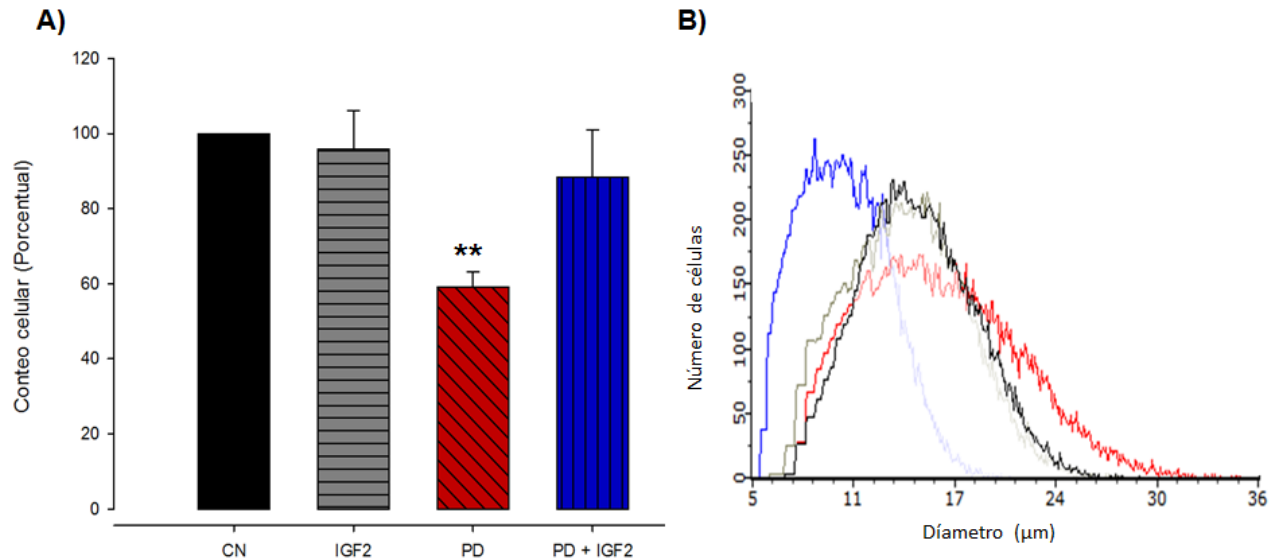


Figura 22. Inhibir la vía MAPK's afecta la capacidad proliferativa de las células MDA-MB 231. Las células fueron tratadas con IGF-2 13 nM, PD 25 μM y con PD 25 μM + IGF-2 13 nM durante 72 horas. **A)** Se observa una reducción significativa en el número de células tras la exposición a PD con respecto al control. Además podemos apreciar que la exposición a PD 25 μM + IGF-2 13 nM genera una tendencia no significativa a la reducción. **B)** Histogramas obtenidos por el Scepter 2.0. Todos los datos fueron normalizados respecto al control. n=3. **p≤0.01

Posteriormente, analizamos la participación de la vía de las MAPK's en la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231, para lo cual realizamos ensayos de migración en cámaras transwell. Se trabajaron las mismas condiciones experimentales que para el ensayo de proliferación, referido anteriormente. De manera similar, se observa en la Figura 23, que la presencia de IGF-2, tal como se había reportado previamente, induce un incremento del 30% en la capacidad migratoria, además la presencia de PD 98059 reduce significativamente la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231, aproximadamente un 56% con respecto al grupo control; y que la presencia conjunta del inhibidor con el IGF-2, previene su efecto estimulador.

Estos resultados sugieren la participación de la vía de las MAPK's sobre la capacidad proliferativa estimulada de las células MDA-MB 231 por la presencia de IGF-2.

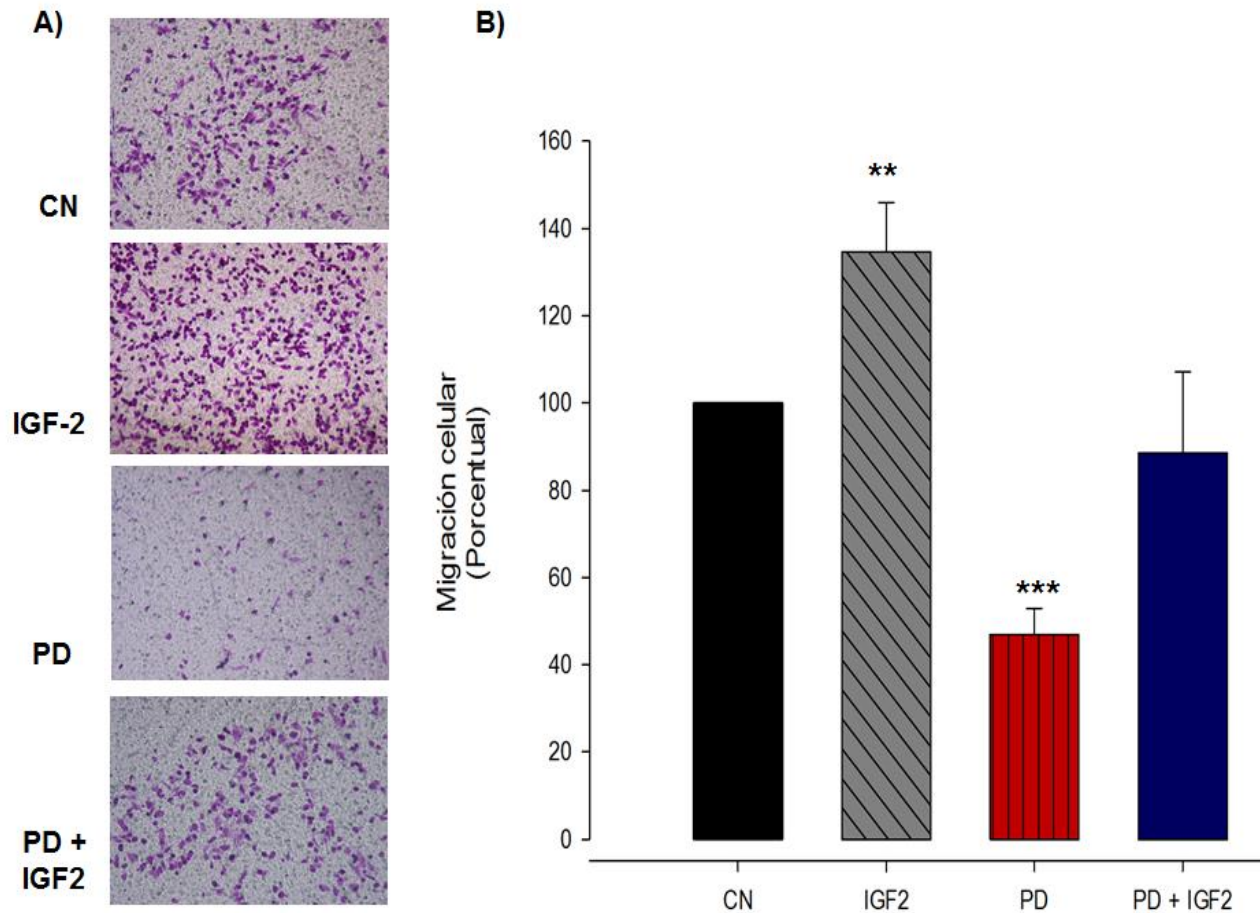


Figura 23. Inhibir la vía MAPK afecta la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231. Las células fueron tratadas con IGF-2 13 nM, PD 25 μ M y con PD 25 μ M + IGF-2 13 nM durante 72 horas **A)** Microfotografías del número de células que migro **B)** donde se observa un aumento significativo tras la exposición a IGF2; una reducción significativa al tratar con PD 25 μ M a las células MDA-MB 231 respecto al control. Todos los datos fueron normalizados respecto al control. n=3 ***p \leq 0.001

DISCUSIÓN

La incidencia del cáncer de mama en el mundo ha incrementado en los últimos 50 años. A pesar de que las razones de esto aún no son del todo claras, la evidencia sugiere un posible papel de factores tales como la dieta o las hormonas en dicho aumento, también se puede considerar que este aumento se debe a la presencia de mutaciones en el material genético. El cáncer de mama, por ende, se considera resultado de la acumulación de cambios genéticos y epigenéticos a lo largo de la vida.

El receptor a estrógenos β es un elemento molecular crucial para el entendimiento de los mecanismos que subyacen al potencial metastásico del cáncer de mama triple negativo. La amplia expresión del ER β en el TNBC (**Haldosén et al., 2014. Hamilton et al., 2014. Fuqua et al., 2003. Janice et al., 2000**), A pesar de que los avances científicos recientes han proporcionado un gran número de candidatos terapéuticos para TNBC, tales blancos terapéuticos aún no se comprenden del todo, haciendo que los verdaderos desafíos de esta enfermedad aún no se hayan cumplido (**Podoa et al., 2010**). Por lo que el entendimiento de las vías de señalización celular que inciden en la capacidad proliferativa y migratoria de este subtipo de cáncer de mama sea de vital importancia.

La información emergente sugiere que existe una intersección entre las vías de señalización para los factores de crecimiento y las hormonas esteroideas (**Hamilton et al., 2017**). Se calcula que existen alrededor de un 45% a un 70% de alteraciones en el sistema de IGF en el cáncer de mama. (**Motallebnezhad et al., 2016. Elumalai et al., 2014**). Para nosotros, resulto interesante investigar si la activación del ER β presente en las células MDA-MB 231, induce cambios en los niveles de expresión de factores de crecimiento relacionados con el potencial metastásico de las células de cáncer de mama triple negativo, pues se ha demostrado una relación existente entre la expresión del ER β y los factores de crecimiento similar a insulina y su rol en el potencial metastásico de otros tipos tumorales. Para ilustrar mejor esta relación, podemos tomar estudio

realizado en un modelo de endometriosis, que mostró que estimular a las células con IGF1 se observa un aumento en la expresión del ARNm de ESR2 y CYP19A1 (genes para ER β y la aromatasa humana respectivamente), regulando su crecimiento y desarrollo; sugiriendo así un entrecruzamiento de estas vías. (**Zhou et al., 2016**). De manera más puntual, se ha demostrado que células tumorales de mama hormono dependiente, donde la administración conjunta de IGF-1 y E₂ muestran efectos sinérgicos en el crecimiento celular. Donde la activación IGF-R1 induce la fosforilación de ER α , a través de la cinasa ribosomal S6, una molécula activada río a bajo de la vía PI3K (**Christopoulos et al., 2015**). Finalmente, existe evidencia de que el ER activo es capaz de unirse a secuencias de ADN específicas, denominadas ERE, activando genes diana que regulan la supervivencia, proliferación y crecimiento celular (**Hamilton et al., 2014**); una de estas regiones promotoras es la perteneciente a IGF-R1 (**Fagan et al., 2008**).

Dichos antecedentes respaldan la posible relación entre el ER β y los elementos propios del sistema de IGF en el cáncer de mama triple negativo. Nuestros experimentos indican primeramente que las células MDA MB 231 expresan el ARNm tanto para IGF así como para sus receptores, aunque no en la misma medida. Estos datos son similares a los reportados por Davison y colaboradores en 2011, quienes hallaron que elementos del sistema de IGF se expresa en diferentes líneas celulares de cáncer de mama.

Antecedentes previos del laboratorio de Neuroendocrinología del Instituto de Fisiología BUAP, mostraron que al estimular de manera específica el ER β con DPN, en células MDA-MB 231, este influye de manera significativa y positiva en su capacidad proliferativa y migratoria (**Avalos R., 2017**). Aunado a los antecedentes descritos previamente, se decidió evaluar si la estimulación del ER β con DPN, en un medio reducido en estrógenos, genera cambios en la expresión del ARNm que codifica para los elementos propios del sistema de IGF, encontrando diversos cambios, siendo de particular interés que a las 72 horas se observó un aumento de IGF2 e IGF1R.

Como mencionamos anteriormente, el estrógeno es un elemento presente en el microambiente tumoral de mama, *per se*. Con el fin de evaluar el rol que ejerce el ER β , sobre los elementos del sistema de IGF, en un microambiente enriquecido en estrógenos, evaluamos el efecto que tiene el estimular o bloquear al ER β (Con DPN o PHTTP respectivamente) sobre los elementos propios del sistema de IGF.

Existe evidencia de que niveles elevados de IGF-1 están asociados con cáncer de mama en mujeres premenopáusicas (**Shanmugalingam et al., 2016**), así como con la transformación celular y la carcinogénesis mamaria (**Ekyalongo et al., 2017. Al-Delaimy et al., 2011**), sin embargo, estos datos provienen de estudios realizados en cáncer de mama hormono-dependiente. Nuestros resultados, por el contrario, sugieren que IGF-1 no interviene en gran medida en la fisiopatología de nuestro modelo de TNBC.

Al mismo tiempo al revisar el nivel de expresión de ARNm para IGF-R1 encontramos que el tratamiento con DPN o PHTTP no inciden en el nivel expresión de ARNm para IGF-R1. Respecto a esto, se ha reportado que los niveles de IGF-R1 son altamente adaptables durante la progresión tumoral (**Cox et al., 2015**). Cabe resaltar que al ser IGF-R1 un receptor con actividad TK, su activación inciden sobre las vías de señalización río abajo de MAPK, que culmina en la estimulación de la proliferación celular; por otro lado, está la vía PI3K la cual inhibe la apoptosis y estimula la síntesis proteica así como acelera el ciclo celular (**Hamilton et al., 2017**), por lo que su presencia es importante para el entendimiento del potencial metastásico en células de cáncer de mama. Cabe subrayar que, existe información de que IGF-R1 refuerza y amplifica los efectos biológicos de la aromatasa así como del ER β (**Zhou et al., 2016. Fagan et al., 2008**), y posiblemente algo similar ocurra en nuestro modelo.

Es interesante observar que el nivel de expresión de ARNm para IGF-2, con el tratamiento con DPN 1 μ M produce un aumento significativo. Pero al bloquear el ER β el nivel de expresión de ARNm para IGF-2, exhibe una reducción significativa. Estos datos son semejantes a los detallados en un ensayo clínico donde se encontró niveles significativamente elevados de IGF-2 provenientes de biopsias de pacientes con TNBC (**Hamilton et al., 2014**), y lo reportado por el mismo grupo años posteriores, donde se

detalla que DPN aumenta la secreción de IGF-2 mientras que PHTTP redujo la misma. Adicionalmente, se ha observado la participación autocrina y paracrina de IGF-2 en la estimulación de la proliferación celular, resistencia a apoptosis, así como en la progresión del cáncer, además, en modelos *in vivo* con sobreexpresión de IGF-2 en glándula mamaria, donde se observó un aumento en la agresividad e incidencia de metástasis de tumores mamarios (**Harris et al., 2012**), posiblemente asociado al rol de IGF-2 en la inhibición de la actividad del supresor de tumores p53 (**Livingstone C. 2013.**).

Finalmente IGF-R2 es una proteína de superficie celular que no tiene capacidad de señalización intracelular, pero promueve la endocitosis y la degradación lisosomal de IGF-2, actuando como un supresor de tumores debido a la falta de unión de la misma a IGF-R1 (**Motalebnezhad et al., 2016. Livingstone C., 2013**). Existe un estudio que ilustra mejor el rol de IGF-R2 en la progresión tumoral, donde células epiteliales normales de mama fueron sometidas a un silenciamiento de dicho receptor, resultando en un aumento de la proliferación celular (**Caixeiro et al., 2013**). Por lo que nuestros resultados sugieren que su ausencia refuerza el potencial metastásico de las células MDA-MB 231.

Hasta el momento la evidencia que he mostrado sugiere a IGF-2 como un elemento clave en el potencial metastásico del TNBC. En el trayecto del entendimiento del rol de IGF2 en el cáncer de mama se han estudiado diversas dosis y los efectos que generan sobre la proliferación y migración de diferentes líneas celulares usadas para su estudio, siendo 13nM y 26nM las que presentan mayor eficiencia (**Hamilton et al., 2017. Motalebnezhad et al., 2016. Hamilton et al., 2014, Livingstone C. 2013. Harris et al., 2012**), por lo que decidimos usar dichas concentraciones para evaluar el efecto que ejerce IGF-2 sobre el potencial metastásico de las células MDA-MB 231.

Ahora bien, hasta la fecha, sólo hay un reporte que relaciona niveles elevados séricos de IGF-2 y TNBC; es un estudio realizado en mujeres vietnamitas con diagnóstico de cáncer de mama triple negativo, sin embargo dicho reporte únicamente correlaciona, en la mayoría de los casos estudiados, niveles elevados del precursor de IGF2 (proIGF2)

en pacientes diagnosticadas con cáncer de mama en comparación del grupo de pacientes control (**Radhakrishnan et al., 2015**). Teniendo en consideración que las células tumorales tienen la capacidad de expresar IGF-2 a nivel de proteína de manera autocrina (**Ekyalongo et al., 2017**), es que decidimos evaluar el nivel de proteína de IGF-2 en nuestro modelo celular, tanto en lisado celular como del medio condicionado. Los resultados indican que al tratar a las células MDA-MB 231 con DPN durante 72 horas se observa un aumento significativo en el nivel de IGF-2 producido, interesantemente los resultados indican que es mayor la proporción de IGF-2 secretado por las células al medio extracelular, que el producido y mantenido en el medio intracelular, sin embargo esto coincide con lo reportado por Skandalis y colaboradores en 2014, donde señalan que DPN aumenta la secreción de IGF2.

La proliferación y la muerte celular están bajo un control estricto a nivel molecular. Estos eventos están intrincadamente equilibrados por estímulos de diferente naturaleza y controlados por múltiples mecanismos de control. La acumulación de defectos en los mecanismos que regulan el ciclo celular es la causa subyacente de la heterogeneidad de los diversos tipos de cáncer; y sus diferentes respuestas al tratamiento (**Podoa et al., 2010**). Nuestros resultados indican que IGF-2 aumenta de manera dosis dependiente el nivel de expresión de ARNm para Ki-67, un marcador nuclear de proliferación. Se ha propuesto que la fosforilación de la subunidad β de IGF-R1, mediada por IGF-2, permite la activación de la ruta MAPK que transmite las señales proliferativas generadas en la superficie celular al núcleo, provocando el cambio en la expresión de los elementos moleculares necesarios para la proliferación celular (**Livingstone C. 2013.**). Sin embargo, al investigar si el tratamiento con IGF2 (a 13nM y 26nM) afecta el número de células, no observamos diferencias significativas entre los grupos tratados con respecto al grupo control, podríamos especular que esto posiblemente se deba a la duración del tratamiento, y que para observar más detalladamente un cambio en el número de células, requeriríamos aumentar la duración de exposición de las células MDA-MB 231 a IGF-2.

Otra propiedad del potencial metastásico de un tumor es su capacidad migratoria, la cual fue evaluada, primeramente, de manera cualitativa mediante el ensayo de herida,

en nuestro modelo celular de TNBC, donde no observamos diferencias entre grupos tratados respecto al grupo control. Sospechamos que la falta de migración en este ensayo se debe a la ausencia de un elemento quimio-atrayente, por lo que optamos por evaluarla de manera cuantitativa mediante ensayos de migración en cámaras Transwell. Encontramos que el tratamiento con IGF-2 a una dosis de 13nM aumenta significativamente la migración. Es concuerda con la información aportada por otro grupo de investigadores, quienes al sobre-expresar IGF-2, observaron un aumento en su capacidad migratoria así como un aumento en la expresión de elementos propios del fenotipo mesénquimal y **(Ma et al., 2019)**.

Respecto a la EMT, sabemos desempeña un papel crucial en la agresividad tumoral, capacidad migratoria y subsecuente metástasis tumoral **(Ma et al., 2019)**. Nuestros resultados indican que al tratar a las células MDA-MB 231 con IGF-2 a 23nM el nivel de expresión de ARNm para Zeb1, un marcador mesénquimal, presenta un aumento significativo. Además la expresión de Zeb1 a su vez reprime genes determinantes de la unión y polaridad epitelial, como lo es E-Cadherina, **(Piperigkou et al., 2016. Xu et al., 2009)**. Por lo que no es de sorprender que nuestros resultados, al evaluar el nivel de expresión de ARNm para E-Cadherina, muestren una reducción significativa al ser tratada con IGF-2 (13nM y 26nM), estos resultados están en consonancia con lo reportado previamente por Avalos en 2017, quien detalla un aumento de Zeb1 correlacionado con la reducción de E-Cadherina, favoreciendo el fenotipo mesénquimal.

Otro elemento molecular asociado a la capacidad migratoria de las células tumorales es la sobreexpresión del ARNm que codifica para el canal Nav1.5, y cuya función puede ser modulada por proteínas extracelulares **(Gao et al., 2010)**. Para el caso específico de las células MDA-MB 231, se ha demostrado que al tratar estas con 10 μ M de TTX, su capacidad migratoria se reduce de manera significativa **(Fernández-Gallardo et al., 2016)**. Dada su relevancia en la capacidad migratoria de nuestro modelo de TNBC, evaluamos el nivel de expresión de ARNm que codifica para el canal Nav1.5 en presencia de IGF-2, encontrando que este induce un aumento significativo en el nivel de expresión de ARNm para el canal de Nav1.5, al compararlos con la condición control.

Otro aspecto importante de la migración celular son las MMP, elementos que afectan directamente los componentes de la matriz extracelular. Evidencia sugiere que MMP1, MMP7 y MMP14 activan señales que activan la adhesión, migración y re-organización del citoesqueleto **(Piperigkou et al., 2016)**. Por lo que nuestros resultados refuerzan el papel de la MMP14, pues tras la estimulación con IGF-2 observamos un aumento significativo de esta.

Los efectos anti-apoptóticos y mitógenos de IGF, en el cáncer, son mediados por la unión del ligando de IGF a su receptor transmembrana con actividad tirosin-cinasa desencadenando 2 vías de señalización importante, la vía AKT y la vía MAPK **(Christopoulos et al., 2018. Christopoulos et al., 2015)**.

IGF-2 se ha descrito como factor promotor la activación de la vía PI3K y la expresión del propio IGF-2 **(Hamilton et al., 2017)**. PI3K al ser activado, conduce a una reducción de la apoptosis y una mayor supervivencia celular, mediante la intervención de IRS (IRS₁-IRS₄). Existe evidencia que indica que IRS₄ induce una hiper activación de la vía PI3K en el cáncer de mama **(De-Freitas et al., 2017)**. De manera fisiológica, el supresor de tumores homólogo de la fosfatasa y tensina **(PTEN)** inhibe a PI3K y por lo tanto, inhibe las vías mitogénicas activadas **(Austin et al., 2018)**. Al poseer PI3K un rol primordial en la fisiopatología del cáncer, resultado lógico pensar en desarrollar fármacos que bloqueen dicha vía. Wortmanina es un potente inhibidor de la vía PI3K.

Al estimular a IGF-R1 mediante IGF-2, se contribuye en mejorar la capacidad migratoria e invasiva del TNBC, asociado a la activación de PI3K, promoviendo la autosuficiencia del crecimiento tumoral. **(De-Freitas et al., 2017)**. Nuestros resultados indican que al mantener a las células en la presencia de 10 µM de Wortmanina hay una disminución significativa en el número de células así como en la capacidad migratoria de las células, sin embargo al agregar IGF-2 13 nM, este efecto se ve revertido. Esto coincide con lo reportado por Christopoulos y colaboradores en 2018, quienes señalan que la inhibición farmacológica de AKT, en líneas celulares de cáncer de mama resistente.

La principal función de la vía MAPK consiste en transducir estímulos extracelulares reconocidos por receptores específicos a un gran número de moléculas blanco que integran respuestas intracelulares altamente específicas, como por ejemplo la producción de proteínas necesarias para la proliferación celular. (**Livingstone C. 2013. Bergman et al., 2012**). Algunos investigadores han propuesto a la activación de la vía de señalización de MAPK, así como su interacción con genes regulados por ER, en la progresión del crecimiento tumoral de mama (**Skandalis et al., 2014**). Al inhibir la vía MAPK mediante PD98059, nuestros resultados indican una reducción significativa en el número de células coincidiendo con lo reportado por Zhou y colaboradores en 2016 reportaron que al bloquear la señalización de MAPK mediante PD98059 se inhibe el crecimiento de muestras tumorales de pacientes mantenidas en cultivo.

Elementos de la vía de señalización de MAPK, pueden se estimulados transitoriamente tras la activación de IGF-R1, repercutiendo en movilidad celular (**Cox et al., 2015**). Al evaluar la vía MAPK y su participación en la capacidad migratoria de nuestro modelo, observamos que al tratar a las células por 72 horas en presencia de PD98059, esta se ve reducida significativamente en comparación al grupo control, con esta evidencia reforzamos el rol de esta vía sobre la capacidad migratoria. Además, un estudio reveló que tanto al inhibir como silenciar al ER β , se observa una regulación negativa de las vías MAPK. (**Austin et al., 2018**).

Muchos estudios han subrayado la relevancia clínica y terapéutica del sistema de IGF en diferentes tipos de tumores. Nuestros resultados, así como la literatura, indican una fuerte conexión entre los elementos del sistema de IGF y el ER β . Además hemos generado, por vez primera evidencia, de que IGF-2 contribuye al mantenimiento del potencial metastásico, mediante IGF-R1, induciendo migración y preparando a las células para proliferar. Además apreciamos que la estimulación de IGF-R1 desencadena la activación de vías de señalización, PI3K y MAPK, mediante la intervención de diversos elementos moleculares río abajo. La creciente necesidad de identificar objetivos terapéuticos que no generen resistencia ha despertado el interés de los elementos activados por IGF como un potencial candidato terapéutico.

CONCLUSIONES

1. Las células MDA-MB 231 expresan de manera diferencial el ARNm que codifica para los tres tipos de receptores a estrógenos, en mayor proporción el ER β , posteriormente el GPER30, mientras que el ER α está ausente.
2. El ARNm que codifica para los 4 elementos moleculares del sistema IGF (IGF-1, IGF-2, IGF-R1 e IGF-R2) está presente en las células MDA-MB 231.
3. La activación específica del ER β con DPN, aumenta los niveles de expresión de IGF-2, tanto a nivel de ARNm como de proteína.
4. La presencia de IGF-2 exagera la capacidad migratoria y la capacidad proliferativa en las células MDA-MB 231.
5. El efecto estimulador que ejerce el IGF-2 sobre la capacidad migratoria y la supervivencia en las células MDA-MB 231 requiere de la activación de la vía PI3K/AKT y de la vía de las MAPK's.

BIBLIOGRAFIA

- 1 American Society of Clinical Oncology (ASCO). (2017) De <https://am.asco.org>
- 2 Anderson E. (2002) The role of oestrogen and progesterone receptors in human mammary development and tumorigenesis. *Breast Cancer Res.* (4) 197-201.
- 3 Al-Delaimy W.K., Flatt S.W., Natarajan L., Laughlin G.A., Rock C.L., Gold E.B., Caan B.J., Parker B.A. y Pierce J.P. (2011) IGF1 and risk of additional breast cancer in the WHEL study. *Endocr Relat Cancer.* 18(2): pp 235-244.
- 4 Avalos López R. (2017) Relevancia fisiológica del receptor a estrógenos β (ER β) sobre el potencial metastásico en la línea celular MDA-MB 231, proveniente de cáncer de mama (Tesis de Maestría) Benemérita Universidad Autónoma De Puebla. Facultad De Medicina. Instituto De Fisiología. Puebla.
- 5 Bergman D., Halje M., Nordin M. y Engström W. (2012) Insulin-Like Growth Factor 2 in Development and Disease: A mini-review *Gerontology.* pp. 240-249.
- 6 Burrow S., Andrulis I.L., Pollak M. y Bell R.S. (1998) Expression of insulin-like growth factor receptor, IGF-1, and IGF-2 in primary and metastatic osteosarcoma. *J Surg Oncol.* 69(1): pp.21-7.
- 7 Caixeiro N., Martin J. y Scott D. (2013). Silencing the mannose 6-phosphate/IGF-II receptor differentially affects tumorigenic properties of normal breast epithelial cells. *Cancer Cell Biology* (17) .
- 8 Chan J. M., Stampfer M. J. y Giovannucci E. (1998) Plasma insulin-like growth factor-I and prostate cancer risk: a prospective study. *Science.* 279 (5350) pp. 563-566.
- 9 Christopoulos P.F., Msaouel P. y Koutsilieris M. (2015) The role of the insulin-like growth factor-1 system on breast cancer. *Molecular Cancer* 382 pp: 1-14.
- 10 Christopoulos P.F., Corthay A. Koutsilieris M. (2018) Aiming for the Insulin-like Growth Factor-1 system in breast cancer therapeutics. *Cancer Treatment Reviews.* Vol 63. pp 79-95.
- 11 Cobaleda C., Pérez-Losada, J. y Sánchez-García, I. (1998). Chromosomal abnormalities and tumor development: from genes to therapeutic mechanisms. *Bioessays*, 20(11), pp. 922-930.
- 12 Cox A., O'Shea S., Tresse E., Bustamante-Garrido M., Kiran-Deevi R. y

- O'Connor R. (2015) IGF1 stimulates ER β and aromatasa expression via IGF1R/PI3K/AKT – mediated transcriptional activation in endometriosis. *Frontiers in Endocrinology*. Vol. 6 pp. 1-7.
- 13 Davison Z., Gail E. de B., Bruce R.W. y Felicity E.B.M. (2011) Insulin-like Growth Factor–Dependent Proliferation and Survival of Triple-Negative Breast Cancer Cells: Implications for Therapy. *13(06)* pp 504-515.
 - 14 De-Freitas C. M., Andrade-da-Costa J., Costa-Silva M. y Pinho S. S. (2017) Glycans as Regulatory Elements of the Insulin/IGF System: Impact in Cancer Progression *International Journal of Molecular Sciences*. Vol. 18 pp. 1-15.
 - 15 De Sevilla L., McCune S. A. y White M. E.(1994) Insulin-like growth factor mRNA expression in tissue of lean and obese male SHFF/Mcc-fa(cp) rats. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 2-3(109). pp. 371–382.
 - 16 Donohoe C. L., Doyle S. L. y McGarrigle S. (2012) Role of the insulin-like growth factor 1 axis and visceral adiposity in oesophageal adenocarcinoma. *British Journal of Surgery*. 99(3) pp. 387–396.
 - 17 Ekyalongo R.-C. y Yee D. (2017) Revisiting the IGF-1R as a breast cancer target. *Precision Oncology*. pp. 1-14
 - 18 Fagan D.H. y Yee D. (2008) Crosstalk Between IGF1R and Estrogen Receptor Signaling in Breast Cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. Vol 13. pp. 423–429.
 - 19 Freier S., Weiss O., Eran M., Flyvbjerg A., Dahan R., Nephesh R., Safra T., Shiloni E. y Raz I. (199) Expression of the insulin-like growth factors and their receptors in adenocarcinoma of the colon. *Gut*. 44. pp: 704–708.
 - 20 Fung J. y Berger A. (2016) Hyperinsulinemia and Insulin Resistance: Scope of the Problem. *Journal of Insulin Resistance*, 1(1), pp. 18.
 - 21 Fuqua S. A., Schiff R., Parra I., Moore J. T., Mohsin S. K., Osborne C. K., y Allred D. C. (2003). Estrogen Receptor β Protein in Human Breast Cancer Correlation with Clinical Tumor Parameters. *Cancer research*, 63(10), pp 2434-2439.
 - 22 Gao R., Shen Y., Cai J., Lei M., Wang Z. (2010). Expression of voltage-gated sodium channel alpha subunit in human ovarian cancer. *Oncol Rep* (23). pp 1293–1299.
 - 23 Gorrinia C., Ganga B., Bassib C., Wakehama A., Baniasadia S.P., Haoa Z., Lia W. Y. Cescona D., Lia Y.-T., Molyneuxc S., Penrodd N., Lupiend M., Schmidte E., Stambolicb V., Gauthiera M. L., y Maka T. W. (2014) Estrogen controls the survival of BRCA1-deficient cells via a PI3K–NRF2-regulated pathway. *PNAS*. Vol. 11 pp. 4472-4477.

- 24 Gonzalez-Gonzalez L. (2013) EGF estimula la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231: Efecto diferencial sobre la expresión funcional de la subunidad Nav 1.5 y la subunidad β del canal de sodio dependiente de voltaje. (Tesis de licenciatura). Benemérita Universidad Autónoma De Puebla. Facultad De Medicina. Instituto De Fisiología. Puebla.
- 25 Green S., Walter P., Kumar V., Krust A., Bornet J. M. y Argos P. (1997) Human estrogen receptor cDNA sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature*; 320 (134) pp 9.
- 26 Guillette T.C., Jackson T.W., y Belcher S.M. (2018) Duality of estrogen receptor β action in cancer (Review) *Current opinion in Pharmacology*. Vol. 41 pp. 66-73.
- 27 Haldosén L. A., Koehler K. F., Helguero L. A., Warner M. y Gustafsson J. A. (2005). Reflections on the discovery and significance of estrogen receptor β . *Endocrine Reviews*, 26(3), pp 465-478.
- 28 Haldosén L.A., Zhao C. y Dahlam-Wright K. (2014) Estrogen receptor beta in breast cancer. *Elsevier Molecular and Cellular Endocrinology* 382 pp: 665-672.
- 29 Hamilton N., Austin D., Márquez-Garbán D., Sanchez R., Chau B., Foos K., Wu Y. y Pietras R. (2017) Receptor for IGF2 and androgens as a therapeutic target in TNBC. *International Journal of Molecular Sciences*. Vol. 18, pp 1-15.
- 30 Hamilton N., Márquez-Garbán D., Mah V., Gowry F., Elshimali Y., Garbán H., Elashoff D., Vadgama J., Goodglick L., y Pietras R. (2014) Biologic Roles of Estrogen Receptor- β and Insulin-Like Growth Factor-2 in TNBC. *BioMed Research International*. Vol 2015 pp: 001-015 .
- 31 Hanahan D, Weinberg R. A. (2011) The hallmarks of cancer: The Next Generation. *Cell* 144: pp.646-679.
- 32 Harris L K., Westwood H. y Westwood M. (2012) Biology and significance of signalling pathways activated by IGF2. *Informa Healthcare*. 30 (1) pp: 1-12.
- 33 Hartman J., Strom A. y Gustafsson J.-A. (2009) Estrogen receptor beta in breast cancer: Diagnostic and therapeutic implications. *J Steroids* Vol 74. pp. 635-641.
- 34 Hernandez-Ortiz J.A. (2016) Efecto del Factor de Crecimiento Fibroblástico Básico (FGF2) sobre la capacidad proliferativa y migratoria de la línea tumoral MDA-MB-231, proveniente de cáncer de mama (Tesis de licenciatura). Benemérita Universidad Autónoma De Puebla. Facultad De Medicina. Instituto De Fisiología. Puebla.
- 35 Hajdu S.I. (2004) A note from history: the first tumor pathologist. *Ann Clin Lab Sci*, 34. pp: 355-356.

- 36 International Agency for Research on Cancer (IARC) (2018) De <https://www.iarc.fr/index.php>
- 37 Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) (2018) De: <https://www.inegi.org.mx/programas/mortalidad/>
- 38 Janice M., Julia M.W.G., Robertson F.R., Ian O.E. y Robert I.N. (2000) A possible divergent role for the estrogen receptor alpha and beta subtypes in clinical breast cancer. *Int J Cancer*. (89) pp 209-212.
- 39 Kalluri, R., & Weinberg, R. A. (2010). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation*. 120(5), 1786.
- 40 Komisaruk. B. (2006) *Un estrógeno neurotransmisor en Mente y cerebro*. *The Science of Orgasm* (22) pp 20-27.
- 41 Labrie F., Tremblay G.B., Trembaly A., Copeland N.G., Gilbert D.K. y Jekins N.A. (1997) Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor (beta). *Mol Endocrinol*. 11(353). pp65.
- 42 Leal-Guadarrama L., Ochoa-Rojas M. del C. y Méndez J. (2002) Importancia clínica de los factores de crecimiento parecidos a insulina (Revisión). *Gac Méd Méx*. Vol. 139, no. 6 pp 589–597.
- 43 Ma J., Pollak M. N. y Giovannucci E. (1999) Prospective study of colorectal cancer risk in men and plasma levels of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein-3. *Journal of the National Cancer Institute*, 91(7) pp. 620–625.
- 44 Maccario M., Tassone F., y Grottoli S. (2010). Neuroendocrine and metabolic determinants of the adaptation of GH/IGF-I axis to obesity. *Ann. Endocrinol* 63 (21): 140-144.
- 45 Martini M., De Santis M.C., Braccini L., Gulluni F. y Hirsch E. (2014) PI3K/AKT signaling pathway and cancer: an updated review. *Annals of Medicine*. pp 1-12.
- 46 Myers MG Jr, Sun XJ, and White MF (1994). The IRS-1 signaling system. *Trends Biochem Sci* (19). pp 289–293.
- 47 Motallebnezhad M., Aghebati-Maleki L., Jadidi-Niaragh F., Nickho H., Samadi-Kafil H., Shamsasenjan K. y Yousefi M. (2016) The insulin-like growth factor-I receptor (IGF-IR) in breast cancer: biology and treatment strategies. *Tumour Biol*. 37(9). pp: 11711-11721.
- 48 Nilsson S., Mäkelä S., Treuter E., Tjuange M., Thomsen J. y Anderson G.

- (2001) Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev* (81) pp 1535-1565.
- 49 National Cancer Institute (NCI) (2016) De <http://www.cancer.gov/espanol>
- 50 Organización Mundial de la Salud (OMS). (2018) De <http://www.who.int/topics/cancer/breastcancer/es>
- 51 Ose J., Fortner R.T., Schock H., Peeters P.H., Onland-Moret N.C., Bueno-de-Mesquita H.B., Weiderpass E., Gram I.T., Overvad K., Tjonneland A., Dossus L., Fournier A., Baglietto L9, Trichopoulou A10, Benetou V11, Trichopoulos D12, Boeing H13, Masala G., Krogh V., Matiello A., Tumino R., Popovic M., Obón-Santacana M., Larrañaga N., Ardanaz E., Sánchez M., Menéndez V., Chirlaque M.D., Travis R.C., Khaw K., Brändstedt J., Idahl A., Lundin E., Rinaldi S., Kuhn E., Romieu I., Gunter M., Merritt M., Riboli E. y Kaaks R. (2015). Insulin-like growth factor I and risk of epithelial invasive ovarian cancer by tumour characteristics: results from the EPIC cohort. *Br J Cancer*. 112(1). pp:162-166.
- 52 Peinado, H., Olmeda, D., & Cano, A. (2007). Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?. *Nature reviews. Cancer*, 7(6), 415.
- 53 Petrone A. B., Simpkins J. W., y Barr T. L. (2014). 17 β -estradiol and inflammation: implications for ischemic stroke. *Aging and disease*, 5(5), pp 340.
- 54 Perry J.K., Zheng-Sheng W., Mertani H. C., Zhu T., y Lobie P.E. (2017) Tumour-Derived Human Growth Hormone As a Therapeutic Target in Oncology *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 28 (8) pp. 587-596
- 55 Peyrat J.P., Bonneterre J., Hecquet B., Vennin P., Louchez M. M., Fournier C., Lefebvre J. y Demaille A. (1993) Plasma Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) Concentrations in Human Breast Cancer. *Eur J Cancer*, 29A(4). pp: 492-497.
- 56 Pinzón C. E., Serrano M. L. y Sanabria M. C. (2009). Papel de la vía fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K/Akt) en humanos. *Rev. Cienc. Salud. Bogotá (Colombia)* (2). pp: 47-66.
- 57 Piperigkoua Z., Bourisa P., Onisto M., Franchi M., Kletsa D., Theocharisa A.D. y Karamanosa N.K. (2016) Estrogen receptor beta modulates breast cancer cells functional properties, signaling and expression of matrix molecules . *Elsevier Matrix Biol.* (4C) 1257, pp.20
- 58 Podoa F., Buydensb L., Deganic H., Hilhorstd R., Klippe E., Gribbestadf I., Van Huffelg S., van Laarhovenh H., Lutsg J., Monleoni D., Postmab G., Schneiderhan-Marraj N., Santoroa F., Woutersb H., Russnesk H., Sørliet T. y Tagliabuen E., Børresen-Dale A.-L. (2010) Triple-negative breast cancer:

Present challenges and new perspectives *Molecular oncoly* Vol 4 pp: 209-229.

- 59 Polyak K. (2007) Breast cancer: origins and evolution. *J Clin Invest.* 117(11). pp: 3155-63.
- 60 Queiroga F.L., Pérez-Alenza D., Silvan G., Peña L., Lopes C. y Illera J.C. (2010) Serum and intratumoural GH and IGF-I concentrations: Prognostic factors in the outcome of canine mammary. cancer *Research in Veterinary Science.* Vol. 89, pp 396–403.
- 61 Radhakrishnan V. K., Hernandez L. C., Anderson K., Tan Q., De León M. y De León D. (2015) Expression of Intratumoral IGF-II Is Regulated by the Gene Imprinting Status in Triple Negative Breast Cancer from Vietnamese Patients. *International Journal of Endocrinology* (2015). pp 1 – 13.
- 62 Renehan A. G., Soerjomataram I. y Tyson M. (2010) Incident cancer burden attributable to excess body mass index in 30 European countries. *International Journal of Cancer,* 126(3) pp. 692–702.
- 63 Rosalyne L. W. y Felicity E. B. (2013) A Twenty-First Century Cancer Epidemic Caused by Obesity: The Involvement of Insulin, Diabetes, and Insulin-Like Growth Factors. *International Journal of Endocrinology.* 2013 pp. 1-37.
- 64 Sánchez-Suárez P. (2003) Receptores estrogénicos alfa y beta en el cáncer de mama. *Acta Medica* 1(3).
- 65 Sánchez C. (2013) Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: Fisiopatología del cancer. *Rev Med Clin CONDES.* 24(4). pp:553-562.
- 66 Sato N., Wakabayashi M., Nakatsuji M., Kashiwagura H., Shimoji N., Sakamoto S., Ishida A., Lee J., Lim B., Ueno T., Ishihara H. y Inui T. (2017) MEK and PI3K catalytic activity as predictor of the response to molecularly targeted agents in triple-negative breast cancer *Biochemical and Biophysical Research Communications* (89). pp 484 – 489.
- 67 Shanmugalingam T., Bosco C., Ridley A. J. y Van Hemelrijck M. (2016) Is there a role for IGF-1 in the development of second primary cancers?, *Cancer Medicine* Vol 5(11) pp: 3353–3367.
- 68 Speirs V. y Kerin M.J., (2002) Prognostic significance of oestrogen receptor beta in breast cancer. *Br J Surg.* 87: pp 405-409.
- 69 Steller M.A., Delgado C.H., Bartels C.J., Woodworth C.D. y Zou Z. (1996) Overexpression of the insulin-like growth factor-1 receptor and autocrine stimulation in human cervical cancer cells. *Cancer Res.* 56(8). pp. 1761–1765.

- 70 Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud (SSPS). (2015) De <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/nuestra-subsecretaria-de-prevencion-y-promocion-de-la-salud>.
- 71 Thiery, J. P., & Sleeman, J. P. (2006). Complex networks orchestrate epithelial–mesenchymal transitions. *Nature reviews Molecular cell biology*. 7(2), 131-142.
- 72 Wolverton C. K., Azain M. J., Duffy J. Y., White M. E. y Ramsay T. G. (1992) Influence of somatotropin on lipid metabolism and IGF gene expression in porcine adipose tissue. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*. 263(4). pp. E637–E645.
- 73 Xu, J., Lamouille, S., & Derynck, R. (2009). TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell research*. 19(2)156.
- 74 Yu H., Spitz M. R., Mistry J., Gu J., Hong W. K., y Wu X., (1999) Plasma levels of insulin-like growth factor-I and lung cancer risk: a case-control analysis, *Journal of the National Cancer Institute*, 91(2). pp. 151–156.
- 75 Zaharia M. y Gómez H. (2013) Cáncer de mama triple negativo: una enfermedad de difícil diagnóstico y tratamiento. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 30(4) pp.649-56.
- 76 Zhou Y., Zeng C., Li X., Wu P.-L., Yin L., Zhou Y.-F. y Xue Q. (2016) IGF1 stimulates ER β and aromatasa expression via IGF1R/PI3K/AKT – mediated transcriptional activation in endometriosis *J Mol Med*. Vol. 94 pp. 887-897