

División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Departamento Sistemas Biológicos
Licenciatura: Químico Farmacéutica Biológica

Título: Análisis de las vías de señalización activadas por Erb-B2 en corazón de rata adulta post-tratamiento con el antineoplásico Trastuzumab-Emtansina (T-DM1)

Proyecto genérico: Evaluación de productos relacionados con la salud

Etapas: Evaluación fármaco-toxicológica de compuestos activos

Lugar de realización: Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez y Laboratorio N-109 planta piloto UIDIS

P R E S E N T A

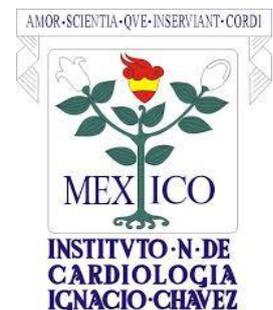
Eber Owen Ali Domínguez García

Aseso interno:

M en C. Francisco López Naranjo

Asesora externa:

Dra. Margarita del Carmen Ramírez Ortega



ÍNDICE

¿Qué es el cáncer?	2
Cáncer de mama	3
Pruebas Diagnósticas	4
Tratamiento.....	4
Quirúrgico.....	4
Tratamiento farmacológico.....	5
Terapia dirigida: Anticuerpos monoclonales	8
Trastuzumab.....	10
Trastuzumab-Emtansina (TDM1)	11
Receptores	12
Función de los receptores erbB en el corazón.....	14
Consecuencias del tratamiento con anticuerpos monoclonales en el corazón.....	15
Justificación del estudio	16
Hipótesis.....	16
Objetivo general.....	16
Objetivos específicos.....	16
Metodología.....	17
Detección de proteínas PI3K, Akt y P-Akt	17
Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS y Western Blot	17
Resultados.....	18
Discusión	20
Conclusión.....	23
Bibliografía	24
Glosario de términos médico-científicos	26

¿Qué es el cáncer?

El cáncer no es una enfermedad, sino un conjunto de enfermedades (Society, 2018). Es un trastorno, en esencia genético, caracterizado por un desequilibrio entre la proliferación celular y los mecanismos normales de muerte celular; normalmente, las células humanas crecen y se dividen para formar nuevas células a medida que el cuerpo las necesita. Cuando las células normales envejecen o se dañan, mueren, y células nuevas las reemplazan (Cáncer, 2018).

Sin embargo, en el cáncer, este proceso ordenado se descontrola. A medida que las células se hacen más y más anormales, las células viejas o dañadas sobreviven cuando deberían morir, y células nuevas se forman cuando no son necesarias, lo que conduce al desarrollo de clonas capaces de invadir, alterar y/o destruir los tejidos adyacentes, así como diseminarse hacia órganos distantes (metástasis) deteriorando su función y conduciendo a la muerte (Martín Granados García, 2016), consecuentemente el cáncer puede originarse en cualquier parte del cuerpo.

Una diferencia importante es que las células cancerosas son menos especializadas que las células normales, es decir, mientras las células normales maduran en tipos celulares con funciones específicas, las células cancerosas no lo hacen. Además, estas células ignoran las señales reguladoras de división o muerte celular programada (apoptosis), mecanismos que utiliza el cuerpo para deshacerse de las células que no son necesarias (Cáncer, 2018).

El cáncer es causado por anomalías en el material genético de las células. Estas anomalías pueden ser provocadas por agentes carcinógenos, como la radiación (ionizante, ultravioleta, etc.), de productos químicos (procedentes de la industria, humo del tabaco y de la contaminación en general, etc.) (Salud, 2018).

Los cambios genéticos que contribuyen al cáncer tienden a afectar tres tipos principales de genes: proto-oncogenes, genes supresores de tumores y genes reparadores del ADN.

Se conocen algo más de 100 proto-oncogenes y 30 genes supresores. Los primeros, estimulan normalmente la división celular, como hecho fundamental para mantener la vida. De ellos depende el desarrollo embrionario, la cicatrización de las heridas y la reposición de las células, que normalmente envejecen y mueren, luego de cumplida su diferenciación. Pero esos mismos proto-oncogenes, pueden sufrir alteraciones en su estructura, por cambios en la secuencia de los ácidos nucleicos (mutaciones), o por pérdida de algunos de sus segmentos del cromosoma (deleciones), o por traslado de un sector cromosómico a otro cromosoma (translocaciones).

Existen oncogenes que se constataron activados en varios tipos de cánceres y su determinación y cuantificación por distintas técnicas moleculares tienen valor pronóstico o como orientadores de la terapéutica a seguir con el paciente portador de ese cáncer.

En general, a estos genes se los clasifica como:

- Genes que estimulan las transcripciones en el ámbito nuclear
- Genes de factores de crecimiento o sus receptores
- Genes de proteínas de señales intra-citoplasmáticas

Algunos oncogenes se sobre-expresan en varios tipos de neoplasias como el K-ras, N-ras; el erbB-2, c-myc, c-fos, entre otros. El oncogen erbB-2, se encuentra sobre-expresado y activado en aproximadamente el 30% de los casos con cáncer mamario y está relacionado con mayor agresividad tumoral, frecuentemente se observa la presencia de nódulos axilares incrementados y su pronóstico es de menor sobrevida.

Otros genes pueden participar en la carcinogénesis codificando proteínas que, en forma indirecta, estimulan la proliferación celular, al interferir con los mecanismos de freno regulatorio, tal es el caso del gen bcl2, cuya proteína bloquea el suicidio celular, que constituye un mecanismo de defensa cuando la célula acumula numerosas mutaciones (Eduardo Lazcano Ponce, 2014)

El plan de tratamiento depende del tipo de tumor, la localización, la edad del paciente, su salud general y el propio estadio de la enfermedad. En general incluye cirugía, quimioterapia y/o radioterapia (Salud, 2018)

Cáncer de glándula mamaria

El cáncer de la glándula mamaria (ca de mama) es la neoplasia más diagnosticada entre las mujeres y la segunda después de cáncer de pulmón como causa de muerte relacionada con neoplasias en mujeres (Bruce A. Chabner, Thomas J. Lynch, & Dan L. Longo, 2009). Para el periodo de 2011 a 2016; el cáncer de mama fue la principal causa de mortalidad por tumores malignos en mujeres de 20 años o más, cabe destacar que no es una enfermedad exclusiva de las mujeres (INEGI, 2018). Al igual que otros tipos de cáncer, empieza con el crecimiento anormal o descontrolado de células, en este caso, de las localizadas en las mamas, principalmente en los conductos que llevan la leche hacia el pezón (cáncer de mama ductal), o en las glándulas que producen la leche (cáncer de mama lobulillar), motivo por el cual es más frecuente su presencia en las mujeres; aunque existen tumores malignos de mama menos comunes, de manera que los hombres aunque con menor frecuencia también tienen riesgo de desarrollarlo.

Existen diferentes factores de riesgo que incrementan la probabilidad de su aparición; entre ellos destacan: la edad (a mayor edad, mayor riesgo), la predisposición genética (presencia de mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 (involucrados en la reparación del ADN), la obesidad, el tabaquismo, la ingesta de alcohol, usar terapia de reemplazo hormonal (para el tratamiento de la menopausia), no tener hijos o tener el primero después de los 35 años de edad, no amamantar y llevar una vida sedentaria (INEGI, 2018)

Se cree que el ca de mama es hormono-dependiente, ya que concentraciones incrementadas y la exposición prolongada a estrógenos se han relacionado con un riesgo

mayor. En las mujeres posmenopáusicas, por ejemplo, las concentraciones séricas elevadas de estrógenos se correlacionan con riesgo aumentado. (Bruce A. Chabner, Thomas J. Lynch, & Dan L. Longo, 2009)

La obesidad afecta el riesgo para padecer ca de mama en forma diferente en mujeres pre y posmenopáusicas. En las premenopáusicas, la obesidad está relacionada con ciclos menstruales más largos e incremento de los ciclos anovulatorios, resultando en menos exposición total a los estrógenos y riesgo más bajo de padecer cáncer de mama. En las posmenopáusicas, en las cuales la fuente principal de los estrógenos es el metabolismo en tejidos periféricos, la obesidad se asocia con concentraciones séricas más altas de estrógenos disponibles, y en consecuencia hay riesgo aumentado.

El alcohol es quizá el factor de riesgo dietético más importante. La ingesta moderada de alcohol aumenta las concentraciones endógenas de estrógenos, que se relacionan con riesgo aumentado de esta neoplasia. (Bruce A. Chabner, Thomas J. Lynch, & Dan L. Longo, 2009)

Es importante destacar que, a nivel mundial, el ca de mama es el más común entre las mujeres y representa 16% de los tumores malignos diagnosticados. Otro dato relevante es que 69% del total de muertes por esta enfermedad se presentan en países en desarrollo donde la mayoría de los casos se diagnostican en fases avanzadas, dificultando su tratamiento exitoso (OMS, 2018)

Pruebas Diagnósticas

Las pruebas diagnósticas son las siguientes:

- Estudios de imagen (mastografía, ultrasonido mamario) y en casos especiales resonancia magnética.
- Biopsias: Con aguja fina, biopsia con aguja de corte, marcaje por estereotaxia con aguja / arpón.
- Estudio histopatológico
- Estudios complementarios (biometría hemática, tiempos de coagulación, química sanguínea, pruebas de funcionamiento hepático, fosfatasa alcalina, en biopsias, niveles de receptores estrogénicos y progestacionales y expresión de Her 2/neu, tomografía o resonancia magnética ósea, estudio radiológico óseo, tomografía toracoabdominopélvica) (SALUD, 2018) (cáncer, 2018)

Tratamiento

Se conocen diferentes tratamientos para el ca de mama, entre los que se encuentran tratamientos quirúrgicos, quimioterapia, farmacológicos, radioterapia, etc.

Quirúrgico

En el carcinoma ductal in situ (CDIS) la opción primaria de tratamiento es la escisión completa del tumor más radioterapia. La segunda opción es la mastectomía unilateral o

en su caso bilateral seguida por reconstrucción (cirugía estética). Como tercera alternativa, escisión solo seguida por la observación clínica.

Existen 2 procedimientos quirúrgicos bien establecidos para el tratamiento del cáncer de mama:

- 1) Cirugía conservadora, que incluye la extirpación tumoral con un margen de tejido normal con la preservación de la mama.
- 2) Mastectomía radical. Todos los casos de carcinoma mamario invasor deben incluir un procedimiento de estadificación axilar.

La diseminación metastásica a los ganglios axilares es criterio para indicar un tratamiento sistémico adyuvante.

Tratamiento farmacológico

Quimioterapia adyuvante

El objetivo de la terapia anticancerosa es la eliminación completa de todas las células cancerosas: las que subsisten cerca del foco tumoral primario mediante cirugía y radioterapia, y las que prosperan en órganos a distancia mediante métodos farmacológicos.

Cuando existe metástasis a distancia, la terapia gravita hacia la quimioterapia antineoplásica, la cual consiste en un conjunto heterogéneo cuyos miembros comparten dos propiedades: capacidad de refrenar la proliferación tumoral y distribución sistémica.

Si bien la quimioterapia es capaz de curar algunos cánceres ampliamente metastásicos (linfomas y cáncer de testículo, entre otros), en la mayoría de los casos persigue un fin paliativo: reducir el volumen tumoral, aliviar los síntomas y, tal vez, prolongar la supervivencia, con la mejor calidad de vida posible. Se distinguen varias formas de administrar la quimioterapia:

a) Quimioterapia exclusiva: ante una enfermedad diseminada, intenta alcanzar la remisión, completa o parcial. La eficacia se evalúa en términos de respuesta objetiva (reducción significativa del volumen tumoral). Por lo general se administra por vía intravenosa u oral.

b) Quimioterapia adyuvante: se realiza después de un tratamiento locorregional, en principio radical y aparentemente curativo. Su objetivo es eliminar la enfermedad residual micrometastásica, por definición indetectable, pero inferida estadísticamente. Su eficacia también se infiere a largo plazo, en términos de prolongación del intervalo libre de enfermedad, y mejora de la supervivencia.

c) Quimioterapia neoadyuvante o preoperatoria: se aplica como tratamiento sistémico primario, con o sin radioterapia, para facilitar una cirugía ulterior. (Flores, 2014).

Las células presentes en un tumor no son homogéneas, aunque se hayan originado de un mismo grupo clonal; por el contrario, en el transcurso de la progresión cancerosa,

desarrollan características divergentes de carácter bioquímico y morfológico debido a mutaciones y cambios epigenéticos.

Además de la heterogeneidad bioquímica, las células tumorales presentan diferencias relativas a la fase del ciclo celular en que se encuentran. Así, mientras unas están en fases de crecimiento o proliferación, otras pueden encontrarse en fase de reposo. Precisamente, gran parte de las neoplasias se diagnostican cuando ya han llegado a una etapa de crecimiento desacelerado; esta desaceleración obedece a problemas de vascularización, competencia entre células para conseguir los elementos nutritivos, problemas de espacio, etc.; contienen una fracción muy elevada de células que apenas se dividen. Puesto que muchos de los fármacos antineoplásicos atacan más a las células en división rápida, gran parte de las células serán resistentes al tratamiento.

Solo las células en período proliferativo añaden masa al tumor. Cada célula proliferativa atraviesa un proceso secuencial de crecimiento y división: fases G_1 , G_2 , S, y M

- **Fase G_1 .** Tiempo que transcurre entre el final de una mitosis y el inicio de la fase S. La célula duplica su tamaño y se sintetizan las proteínas y los sustratos necesarios para la duplicación del ADN. Existe la posibilidad de que la célula permanezca en una fase quiescente, que se denomina fase G_0 . En la fase G_1 existe el denominado punto de restricción (R- G_1), en el cual la célula comprueba que la célula ha duplicado su masa y el material genético necesario para pasar a la siguiente fase.
- **Fase S.** Se lleva a cabo la duplicación del ADN.
- **Fase G_2 .** Se producen todos los sustratos necesarios para la fase de división o mitosis. Existe un punto de restricción R- G_2 - M en el cual la célula confirma la correcta duplicación del ADN
- **Fase M.** Mitosis celular. Se originan dos células iguales con similar material genético. Existe otro punto de restricción, denominado R-M, que evita la formación de dos células independientes con errores en el fenotipo o el genotipo (Velázquez, 2008)

Las células en fase G_0 (etapa donde la célula no se divide, encontrándose en un estado inactivo (reposo)), representan un desafío para la terapia farmacológica: contribuyen a la masa tumoral, a veces en grandes proporciones; son resistentes a la acción de la mayoría de los fármacos actuales, que operan mejor sobre células en actividad reproductiva; no están diferenciadas y con frecuencia perduran en tanto las condiciones nutritivas lo permitan.

Los principales fármacos antineoplásicos se pueden dividir en las siguientes categorías:

- Fármacos citotóxicos, incluyen:

- Alquilantes y compuestos relacionados, que actúan formando enlaces covalentes con el ADN e impiden de esta manera su replicación.
 - Anti metabolitos, que bloquean o interrumpen una o más vías metabólicas que intervienen en la síntesis de ADN.
 - Antibióticos citotóxicos, es decir, sustancias de origen bacteriano que impiden la división de las células de mamíferos.
 - Derivados de plantas (alcaloides de la vinca, taxanos, camptotecinas): la mayoría afecta de manera específica a la función de los microtúbulos y, por tanto, a la formación del huso mitótico.
- Anticuerpos monoclonales: dirigidos contra antígenos asociados al tumor entre los cuales podemos nombrar: antígenos de diferenciación hematopoyética, factores de crecimiento, receptores para factores de crecimiento, antígenos involucrados en la angiogénesis, etc. (Scott, 2012).
 - Inhibidores de las proteínas cinasas: estos fármacos inhiben las proteínas cinasas (habitualmente tirosina cinasas) que actúan como transductores de señales de crecimiento en células de división rápida. Son de uso más bien limitado (HP Rang, 2012).

Como se observa en la imagen 1, los diferentes grupos antineoplásicos pueden actuar sobre las diferentes fases del ciclo celular o sobre los mecanismos de control de la proliferación celular. La respuesta obtenida se relaciona directamente con la capacidad proliferativa de la célula, que está determinada por el tiempo de duplicación del tumor (tiempo en que el tumor es capaz de duplicar el número celular).

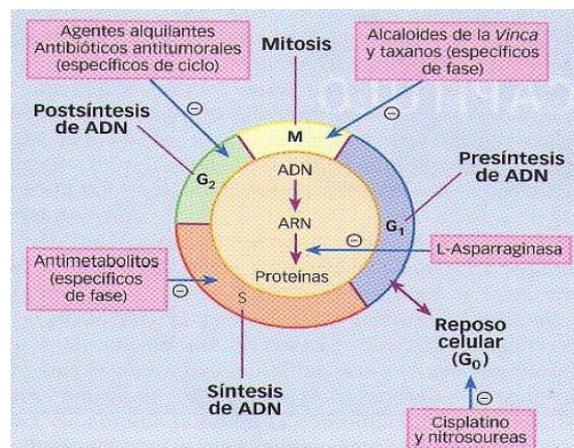


Imagen 1: Ciclo celular y fases donde actúan los antineoplásicos (Velázquez, 2008)

La inactivación de genes supresores de tumores y la transformación de los protooncogenes en oncogenes pueden ocasionar alteraciones en varios sistemas celulares como (ver imagen 2):

- Factores de crecimiento, sus receptores y vías de transmisión de señales.
- Transductores del ciclo celular (ciclina, cinasas dependientes de ciclina [cdc] o inhibidores de cdc).

- Maquinaria apoptótica que normalmente eliminan las células anormales.

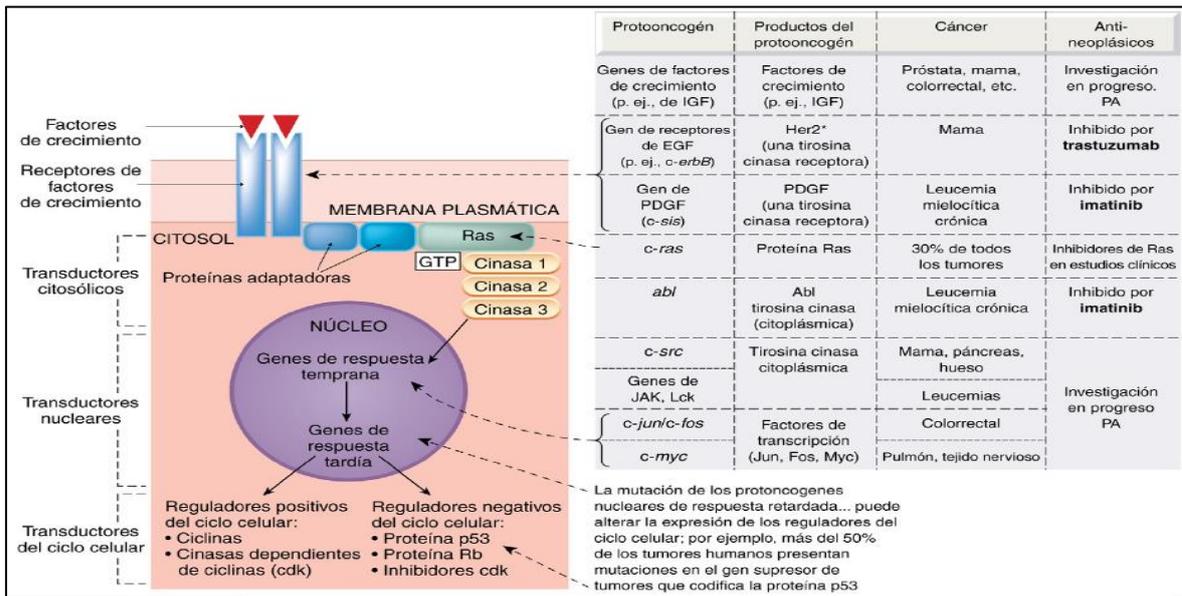


Imagen 2: Vías de transducción de señales iniciadas por los factores de crecimiento y su relación con el desarrollo de cáncer. Se muestra ejemplos de proto-oncogenes y de los productos que codifican. Muchos receptores de factores de crecimiento son receptores asociados a tirosina cinasas. (Imagen tomada de (HP Rang, 2012)).

Terapia dirigida: Anticuerpos monoclonales

La presencia de receptores de membrana, que son de vital importancia en la célula para su proliferación, supervivencia, migración etc.; proporcionan dianas terapéuticas para anticuerpos monoclonales. Idealmente, si el receptor fuera específico de la célula tumoral, el anticuerpo se dirigiría exclusivamente contra ella y carecería de toxicidad, pero no existe esta absoluta especificidad, lo que condiciona la toxicidad inherente de estos productos (Flores, 2014).

Se conocen dos tipos de anticuerpos: los policlonales y los monoclonales. Los primeros son producidos por diferentes poblaciones de linfocitos B en respuesta a un antígeno. Las células de la población de linfocitos B producen anticuerpos que unen específicamente diferentes epítopes dentro del antígeno. Los anticuerpos monoclonales se sintetizan por una población de células B idénticas (un clon) crecidas en cultivo celular. Estos cuerpos son homogéneos, todos reconocen el mismo epítipo. Las técnicas para producir estos anticuerpos fueron desarrolladas por Georges Köhler y Cesar Milstein (David L. Nelson, 2001) (en la imagen 3 se da un ejemplo de anticuerpos monoclonales).

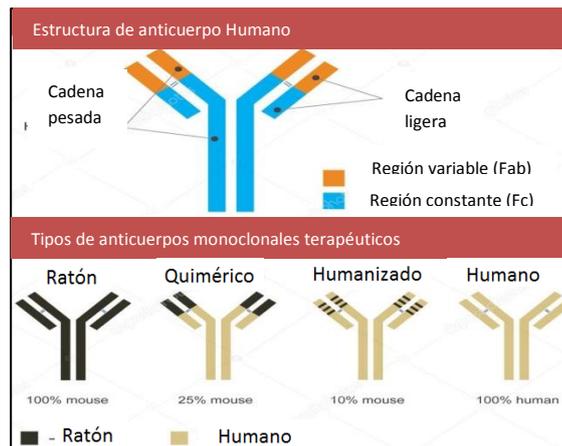


Imagen 3: Ejemplo de un anticuerpo monoclonal

Como se mencionó anteriormente los anticuerpos monoclonales son de un solo tipo molecular; los cuales se han seleccionado para reaccionar con proteínas que se expresan de manera específica en las células cancerosas. Algunos están humanizados, lo que significa que son híbridos de anticuerpos humanos con un esqueleto murino o de primate. Una de las funciones de estos anticuerpos ocurre con la unión entre el anticuerpo y su diana, activando los mecanismos inmunitarios del huésped provocando que la célula cancerosa sea destruida mediante una lisis mediada por el complemento o por el ataque por células T citotóxicas. Otros anticuerpos monoclonales se unen a los receptores de factores de crecimiento de las células cancerosas (ver imagen 4) y los inactivan, inhibiendo de esta manera la vía de supervivencia y estimulando la apoptosis (HP Rang, 2012).

Su incorporación es relativamente reciente; pero a diferencia de los fármacos citotóxicos mencionados arriba, ofrecen una perspectiva de tratamiento altamente focalizado, sin que existan algunos de los efectos adversos propios de la quimioterapia convencional. No obstante, esta ventaja se ve en buena medida contrarrestada cuando se emplean en combinación con otros fármacos tradicionales. Existen varios anticuerpos monoclonales utilizados en la actualidad, por ejemplo: trastuzumab, cetuximab, rituximab, bevacizumab, alemtuzumab, panitumumab y trastuzumab-Emtansina (T-DM1), aunque su elevado costo constituye un problema ciertamente importante, ya que no están disponibles para toda la población que los requiere; de lo cual deben estar conscientes los pacientes y sus familiares, porque lo peor es iniciar un tratamiento fármaco-terapéutico, oncológico, etc.; y abandonarlo porque de esta manera la enfermedad avanza mucho más rápido.

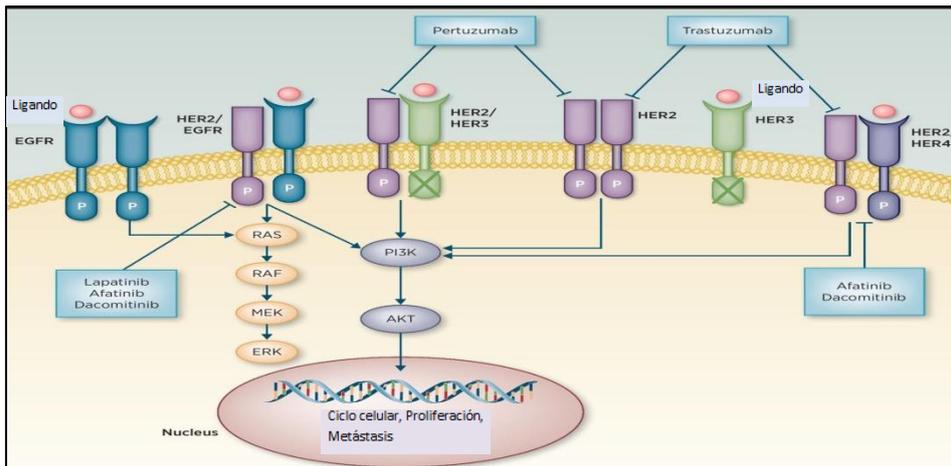


Imagen 4: Mecanismo de acción de anticuerpos monoclonales. Numerosos tumores sobreexpresan los receptores de factores de crecimiento como el EGFR, HER2. Los anticuerpos monoclonales terapéuticos pueden inhibir estos receptores interactuando directamente con el propio receptor (por ejemplo: trastuzumab) o con el ligando (bevacizumab)

Trastuzumab

El trastuzumab (Herceptin) es un anticuerpo monoclonal humanizado IgG1 que reconoce al receptor para el factor de crecimiento epidérmico humano (EGF): el receptor de tipo 2, o HER2 (Human Epidermal growth factor Receptor type 2). La proteína HER2 está sobre expresada en el 15-30% de los ca de mama, lo que le da la característica de subtipo agresivo.

El trastuzumab se fija a un dominio de la porción extracelular de HER2 y allí puede ejercer alguna de estas 2 funciones:

1. Obstaculizar la dimerización de HER2.
2. Aumenta la endocitosis del receptor, impidiendo la activación del dominio tirosin-quinasa.

Además este anticuerpo ejerce otras dos acciones: impide que la proteína (p185 en su forma íntegra) se divida convirtiéndose en una p95 (isoforma truncada) ya sin fracción extracelular accesible al anticuerpo, pero aún con actividad tirosin-quinasa. Asimismo facilita la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) que conduce a la muerte celular (ver imagen 5).

Trastuzumab está indicado en el ca de mama HER2+, tanto en fases avanzadas como adyuvante en estadios tempranos. En el ca de mama se ha demostrado una fuerte sinergia con diversos citostáticos, lo que, por otro lado, es interesante, porque los tumores HER2+ son rápidamente proliferativos.

Administración. Se administra por vía intravenosa. Tiene una $t_{1/2}$ de unos 28 días y se puede administrar cada 1, 2 ó 3 semanas: las dosis respectivas son de 2mg/Kg, 4mg/Kg o 6mg/Kg, en todos los casos precedidas de dosis de carga de 4,6 u 8 mg/Kg. Como no atraviesa la barrera cráneo encefálica, no actúa sobre las metástasis cerebrales.

En monoterapia, apenas origina un leve cuadro de febrícula y artromialgía, la cual se trata con antihistamínicos. Importante resaltar que puede afectar a la contractilidad cardíaca, habitualmente en forma de reducción de la fracción de eyección.

Al administrarlo junto con citotóxicos clásicos, no solo se acentúan ligeramente y por razones desconocidas las típicas toxicidades de aquellos (emesis, mielodepresión, etc.), sino que puede aparecer un cuadro grave de insuficiencia cardíaca. (Flores, 2014).

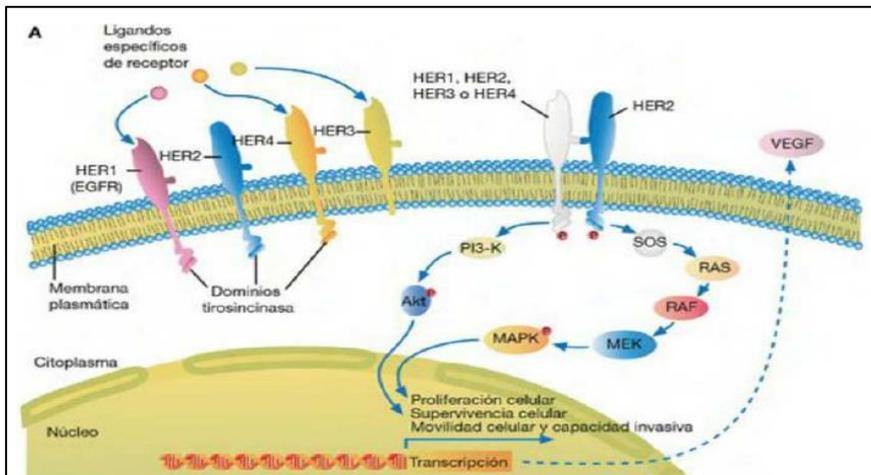


Imagen 5: Mecanismos de Trastuzumab en familia de receptores HER.

Trastuzumab-Emtansina (T-DM1)

Trastuzumab-Emtansina o T-DM1 (Kadcyla) es un nuevo fármaco antineoplásico, innovador, único y selectivo. Se trata de un conjugado anticuerpo-fármaco, compuesto por el anticuerpo anti-HER2, Trastuzumab y el agente DM1, un inhibidor microtubular (derivado de la maitansina), unido a través del enlace tioéter estable MCC (4- [N-maleimidometil] ciclohexano- 1- carboxilato). Este anticuerpo está diseñado de tal forma que una vez que llega a su célula diana libera el citotóxico en el interior de la misma.

Los microtúbulos son polímeros de citoesqueleto vitales y dinámicos, desempeñan una función crítica en la división celular, señalización, transporte y polaridad, lo que los hace blancos atractivos en los esquemas anticáncer y diseño de fármacos. Están compuestos de 13 protofilamentos lineales, cada protofilamento está formado por heterodímeros de tubulina α/β .

DM1, el componente citotóxico, se une a la tubulina. Al inhibir la polimerización de tubulina, tanto DM1 como Trastuzumab, detienen el ciclo celular, lo que finalmente provoca la muerte celular por apoptosis (ver imagen 6). Los resultados de los ensayos de citotoxicidad in vitro muestran que DM1 es entre el 20 y 200 veces más potente que los taxanos y los alcaloides de la vinca. El enlazador MCC está destinado a limitar la liberación sistémica y potenciar el transporte de DM1 hacia dianas específicas.

La conjugación de DM1 a Trastuzumab confiere selectividad al agente citotóxico por las células de tumores que sobre expresan HER-2, lo que potencia el transporte intracelular de DM1 directamente hacia el interior de las células malignas. La unión a HER-2 causa la

internalización de T-DM1 mediada por el receptor y la consiguiente degradación en lisosomas, lo que da lugar a la liberación de catabolitos citotóxicos que contienen DM1 (principalmente lisina- MCC- DM1).

T-DM1, fue aprobado por la FDA para pacientes con ca de mama metastásico positivo para HER-2, con previo tratamiento con trastuzumab y taxanos. Los efectos secundarios después del tratamiento con T-DM1 son trombocitopenia, elevación transitoria de transaminasa, náusea, fatiga, mialgias (general, 2016).

La dosis recomendada es de 3.6 mg/Kg de peso corporal, administrado por vía intravenosa cada tres semanas en ciclos de 21 días.

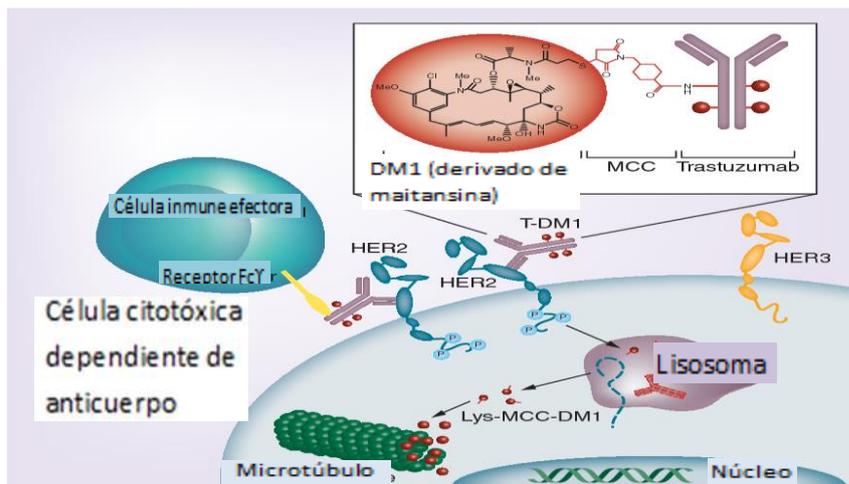


Imagen 6: Mecanismo de TDM1 sobre receptores HER2.

Receptores

Como ya se mencionó anteriormente, la sobre expresión del oncogén erbB-2 o Her/2neu (ambos hacen referencia al mismo oncogén) en ca de mama se relaciona con mayor agresividad, por ello es de gran importancia conocer su función.

La familia de factores de crecimiento epidérmico (EGF, epidermal growth factor) está formada por:

- EGF (epidermal growth factor)
- Factor de crecimiento transformante α (TGF- α , transforming growth factor)
- Factor de crecimiento análogo al EGF de unión a la heparina (HB-EGF, heparin binding-EGF)
- La anfiregulina (AR)
- Betacelulina (BTC)
- Epiregulina (EPR) y el epigén.

Los EGF interactúan con un receptor, denominado EGFR, HER1 o Erb-B1, para llevar a cabo sus funciones biológicas. La familia de receptores para factor de crecimiento epidérmico (EGFR) comparten similar estructura molecular con un dominio de

enlazamiento extracelular para el ligando, un dominio corto transmembrana y por último un dominio intracelular con actividad de tirosin-cinasa (ver imagen 7).

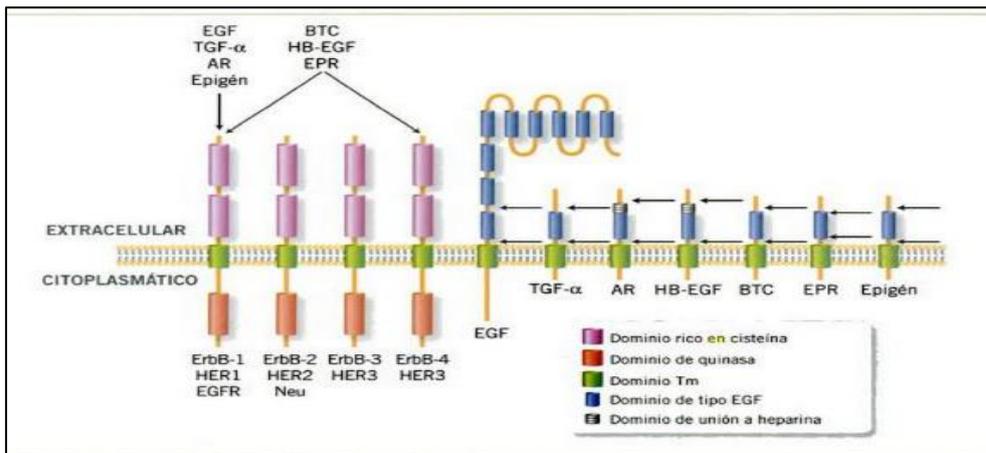


Imagen 7: Estructura de receptores para factores de crecimiento epidérmico (EGFR)

El EGF además de interactuar con HER1, también lo hace con otros 3 receptores homólogos, denominados ErbB2, ErbB3 y ErbB4 (también conocidos como HER2, HER3 y HER4), en una forma que depende del tipo de ligando, para formar heterodímeros. Las diferencias en los dominios intracelulares C-terminales de estos receptores determinan la cascada de señalización intracelular y, por lo tanto, los efectos biológicos (Hernández, 2010).

Esta familia de receptores transmembrana (HER1 A HER4), regula funciones celulares como el crecimiento, supervivencia, adherencia, migración, diferenciación y la vascularización. Todos poseen un dominio intracelular donde reside la actividad tirosin-cinasa (salvo HER3, que no posee esa actividad) (ver imagen 8). El ligando endógeno, al unirse al receptor, cambia su conformación y promueve su dimerización como homodímeros (por ejemplo HER1/HER1) o heterodímeros (por ejemplo HER2/HER3 (ver imagen 5). A diferencia de los demás, HER2 adopta una conformación fija semejante a la del estado activado por el ligando. Una elevada riqueza en HER2, originada por una amplificación del gen *erbB-2* tiene como resultado continuas señales en dos cascadas de señalización: las vía ras-MAPK, implicada en la proliferación celular, y la ruta PI3K-AKT-mTOR, que inhibe la apoptosis (Flores, 2014).

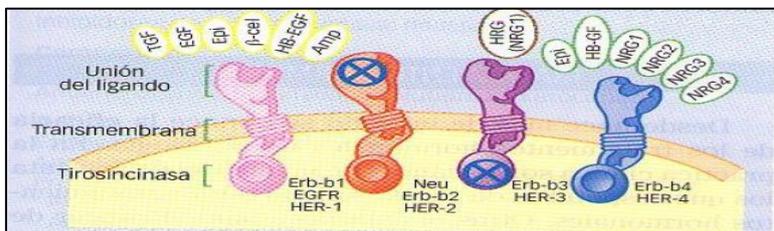


Imagen 8: HER3 no posee actividad tirosin-cinasa, mientras que HER2 no tiene sitio de unión a ligando

El EGF es esencial para el desarrollo del embrión, estando relacionado con la génesis de varios órganos derivados del ectodermo y el mesodermo, como el cerebro, el corazón y el pulmón. No obstante, parece que el EGFR interviene en el desarrollo y progresión del cáncer, ya que la expresión aberrante de EGFR o de sus ligandos es frecuente en numerosos tipos de tumores y se correlaciona con un peor pronóstico y con una enfermedad tumoral más agresiva, contribuyendo a la proliferación celular, la supervivencia de las células tumorales, la angiogénesis y la metástasis.

Función de los receptores erbB en el corazón

La familia de receptores para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR, ErbB) se encuentra localizada en la membrana plasmática de cardiomiocitos. La señalización a través del EGFR es crucial en el desarrollo embrionario, su papel en el desarrollo epitelial, la proliferación y la organogénesis, ha quedado claramente demostrado (Tania Lahera Sánchez, 2010).

En ausencia de ligandos, los EGFR residen en la membrana de la célula de forma inactiva, distribuidos uniformemente en su superficie. Al encontrarse en la superficie celular, por azar tienen la capacidad de trans-fosforilarse, actividad que se ve rápidamente inhibida por la actividad fosfatasa basal de la célula.

Su actividad es esencial en el desarrollo del embrión, que como se mencionó está implicado en la organogénesis de muchos órganos derivados del mesodermo y el ectodermo, tales como cerebro, corazón y pulmón. Además se sabe que los receptores ErbB están involucrados en el desarrollo de los ductos mamarios en la pubertad, la proliferación del lóbulo alveolar en el embarazo y la producción de leche en el postparto (Tania Lahera Sánchez, 2010).

La función de estos receptores depende de los ligandos, los cuales han sido identificados para cada uno de ellos, siendo los siguientes:

- HER1: Factor de crecimiento epidérmico (EGF), Factor de crecimiento tumoral alfa (TGF α), Anfiregulina (AR), Betacelulina (BTC), Epiregulina (EPR), Factor de crecimiento ligado a heparina (HB-EGF).
- HER2: Sin ligando conocido.
- HER3: Neuregulinas 1 y 2
- HER4: Betacelulina (BTC), Epiregulina (EPR), Factor de crecimiento ligado a heparina (HB-EGF), Neuregulinas 3 y 4

Las neuregulinas son un grupo de proteínas que promueven selectivamente la heterodimerización entre HER2 y HER3, o HER4, y que son importantes en la función cardiovascular normal. Éstas son liberadas de la superficie del endocardio y de las células endoteliales, con un efecto parácrino en los cardiomiocitos, con importancia en el desarrollo y mantenimiento de la integridad funcional y estructural del corazón adulto (Solange Moraes Sanches, 2010)

La neuregulina, mediante la activación de ErbB2 y ErbB4, promueve la hipertrofia de cardiomiocitos adultos y la proliferación de cardiomiocitos embrionarios, protegiéndolos de la apoptosis. La señalización intracelular de ErbB2 y ErbB4 implica la activación de Akt, que fosforila e inactiva proteínas importantes en la mediación de la apoptosis, impidiendo su ocurrencia. En cardiomiocitos adultos, la neuregulina promueve la organización de los sarcómeros, protege del desarreglo miofibrilar e inhibe la apoptosis (Solange Moraes Sanches, 2010)

Consecuencias del tratamiento con anticuerpos monoclonales en el corazón

Si bien los nuevos tratamientos antineoplásicos (como el trastuzumab) han mejorado la supervivencia de las pacientes con cáncer de mama, estos también tienen efectos secundarios principalmente sobre el sistema cardiovascular, que en ocasiones no son diagnosticadas a tiempo. De esta forma, los logros conseguidos por este tipo de tratamiento antineoplásico se contrarrestan con el impacto en la salud cardiovascular. Las complicaciones incluyen disfunción miocárdica, complicaciones pericárdicas, isquemia miocárdica, etc. Por increíble que parezca estas complicaciones cardiovasculares son ahora la segunda causa de morbilidad y mortalidad de los pacientes que han sobrevivido al cáncer; así que en realidad están en mayor riesgo de muerte por causas cardiovasculares que por el cáncer; además, la cardiotoxicidad temprana puede limitar el completar un tratamiento antineoplásico efectivo (Navarrete, 2017).

El Trastuzumab, se utiliza en cáncer de mama HER2 positivo, con pronósticos favorables pero también conlleva a un compromiso de la función cardíaca. El anticuerpo actúa bloqueando a los receptores HER-2 de la superficie de los cardiomiocitos, inhibiendo así su actividad de tirosín-cinasa, lo que ocasiona la interrupción de vías de señalamiento importantes para la supervivencia celular. Puede causar una disfunción contráctil del corazón; generalmente se produce una reducción de la función ventricular izquierda (reducción > 10% de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo) (Enrique Ruiz-Mori, 2017).

Existen 2 tipos de disfunción ventricular:

Tipo 1: Este tipo de lesión miocárdica con daño celular típicamente irreversible lleva a la muerte celular, mediado por los radicales libres. La antraciclina, es el representante de este grupo de medicamentos causantes de cardiotoxicidad.

Tipo II: Este tipo de toxicidad generalmente no es dosis dependiente, reversible y sin daños ultraestructurales. El trastuzumab es la droga representativa de este tipo de efecto.

El mecanismo por el cual los inhibidores HER-2 producen cardiotoxicidad, subyace en los cambios funcionales y estructurales en las proteínas contráctiles y la mitocondria, que raramente producen la muerte celular, lo que explica su potencial reversibilidad. (Navarrete, 2017).

Justificación del estudio

T-DM1 ha mostrado su efectividad tanto en modelos *in vivo* (ratones) como *in vitro* (cultivos celulares de cáncer mamario) para destruir células de ca de mama resistentes al Tz. Así mismo ha demostrado una gran capacidad de inducir apoptosis en células de ca de mama. Recientemente, se ha reportado que T-DM1 tiene una gran actividad en estudios fase I y II en los cuales se administró a pacientes con tumores de ca de mama sobre expresando HER2 con resistencia a Trastuzumab. Por lo tanto, dadas las características del compuesto T-DM1, éste tiene la habilidad de ocasionar tanto apoptosis como catástrofe mitótica sobre las células que expresan el receptor HER2. Existe controversia en los reportes que señalan que el tratamiento con T-DM1 no ocasiona cardiotoxicidad y los que señalan que las pacientes sometidas a este tratamiento llegan a presentar insuficiencia cardiaca.

La mayoría de los estudios experimentales para probar la toxicidad de los anticuerpos monoclonales como el T-DM1 se han realizado *in vitro* (en cultivos de células tumorales) lo que no permite ver los efectos secundarios a otros órganos, por lo que es necesario estudiar *in vivo* el efecto adverso del nuevo conjugado Anticuerpo-droga T-DM1 sobre tejido cardiaco. Y de gran importancia sería detectar marcadores tempranos de daño al miocardio ya que se aportarían datos para prevenir el desarrollo de insuficiencia cardiaca en las pacientes bajo tratamiento. Los resultados del estudio propuesto serían de gran beneficio aportando conocimientos de la seguridad de este compuesto empleado en el tratamiento del cáncer de la glándula mamaria. En el campo de la ciencia básica de la cardiología por medio de estos compuestos se ampliarían los conocimientos acerca de la función del receptor HER2 en el corazón adulto y su papel en la cardioprotección. En el área de la Oncología médica los conocimientos aportados serían de gran beneficio para establecer en conjunto con los cardiólogos un tratamiento que evite el daño del tejido cardiaco.

Hipótesis

El tratamiento con el antineoplásico Trastuzumab-emtansina, modifica la vía de señalización PI3K/Akt (fosfoinositósido 3-cinasa/proteín cinasa B) en corazón de rata adulta.

Objetivo general

Investigar *in vivo* (ratas adultas) si el tratamiento con T-DM1 en su papel inhibidor de la actividad fisiológica de ErbB2 en el corazón, modifica la expresión y activación de las moléculas de la vía de señalización PI3K/Akt (fosfoinositósido 3-cinasa/proteín cinasa B) involucradas en los mecanismos de respuesta de la célula cardiaca ante un daño o en el proceso de reparación.

Objetivos específicos

- Determinar en ratas hembra adulta si el tratamiento con cuatro dosis de T-DM1 (2mg/kg) modifica la expresión de la proteína PI3K en tejido cardiaco.

- Determinar en ratas hembra adulta si el tratamiento con cuatro dosis de T-DM1 (2mg/kg modifica la expresión y activación de la proteína Akt en tejido cardiaco.

Metodología

El estudio se realizó empleando un grupo de 12 ratas Wistar (peso 300-350g) hembras adultas a las cuales previo al tratamiento se les extirpó quirúrgicamente los ovarios. Los animales se sub-agruparon al azar en dos grupos, siendo n=6 para cada grupo: I. control (inyectado con vehículo); II. Tratadas con 4 dosis de T-DM1 (2 mg/kg de peso cada cuarto día), por vía de administración intravenosa (vena caudal). Dos días después de la 4ª dosis los animales se sacrificaron bajo anestesia obteniendo el corazón, separando el ventrículo izquierdo (VI); éste se almacenó inmediatamente a -80°C hasta su uso.

Detección de proteínas PI3K, Akt y P-Akt

Obtención de fracciones sub-celulares de ventrículo izquierdo.

El VI de las ratas control y tratadas con T-DM1 se colocaron en una solución amortiguadora de homogenización (Solución H) fría (4°C) conteniendo: Sacarosa 250 mM, Tris-HCl 10mM y EDTA 1mM a pH 7.4 y además se le adicionó una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete, Roche) se cortó finamente y se homogenizaron en homogenizador Polytrón. Los homogenados se centrifugaron a 3000 RPM (4°C). Los sobrenadantes se separaron y se ultracentrifugaron (45,000 RPM/4°C) por 30 min, los botones se resuspendieron en la solución H y se etiquetaron como fracción membranal y los sobrenadantes como fracción citosólica. La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry. (OLIVER H. LOWRY, 1951).

Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS y Western Blot

Alícuotas conteniendo 30 µg de proteínas de la fracción citosólica se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) al 10% con SDS durante una hora a 100 V. Concluida la electroforesis las proteínas se electro-transfirieron a membranas de fluoruro de polivinildieno (PVDF) por un tiempo de 1 H a 100 mA; terminada la electrotransferencia las membranas se bloquearon por 2H con una solución de PBS 1X conteniendo 5% de leche descremada (Svelty), una vez bloqueadas las membranas se lavaron tres veces con PBS 1X (NaCl 171 mM, KCl 3.35 mM, Na₂HPO₄ 10.14 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM) y enseguida se incubaron con el anticuerpo primario específico por 18 H a 4°C y enseguida 1H a temperatura ambiente bajo agitación orbital constante a velocidad baja; a continuación las membranas se lavaron por 5 veces con PBS1X con Tween 20 al 0.1%, después se adicionó el anticuerpo secundario marcado con peroxidasa por 1H a temperatura ambiente; finalmente las membranas se lavaron con PBS1X 5 veces. Las proteínas se detectaron empleando anticuerpos primarios específicos contra: PI3K, Akt y P-Akt. Los inmunoblots se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes conjugados con peroxidasa y la reacción se visualizó por medio de quimioluminiscencia-facilitada (Millipore), empleando un sistema de detección de imágenes: Chemi Doc Imaging System Bio-Rad. Posteriormente la evaluación densitométrica de las bandas

observadas para cada proteína bajo estudio se realizó empleando el programa MyImage Analysis, versión 2.0. Las diferencias entre los grupos se calcularon estadísticamente empleando el programa Graphpad Prism v5. Se consideró una diferencia significativa cuando la $p \leq 0.05$

Resultados

Los niveles de expresión de PI3K disminuyen por efecto del tratamiento con 4 dosis de T-DM1

Para investigar el efecto de T-DM1 sobre la vía de salvamento PI3K/Akt después del tratamiento con 4 dosis de T-DM1 (2mg/Kg de peso), primero analizamos los niveles de expresión de PI3K (Figura 1). Los resultados obtenidos muestran un cambio significativo a la baja en los niveles de expresión de la proteína PI3K en el grupo de ratas tratadas de aproximadamente el 80% respecto al grupo control. Este hallazgo es importante, ya que la proteína PI3K es la iniciadora de esta cascada de señalización. En la figura 1 se muestran los 2 grupos: 1.- control (barra blanca) y 2.- tratados con T-DM1 (barra con relleno); en el eje de las "y" se grafican las unidades relativas de proteína con respecto al control de carga. En la parte inferior de la gráfica se presenta un Western blot representativo del estudio.

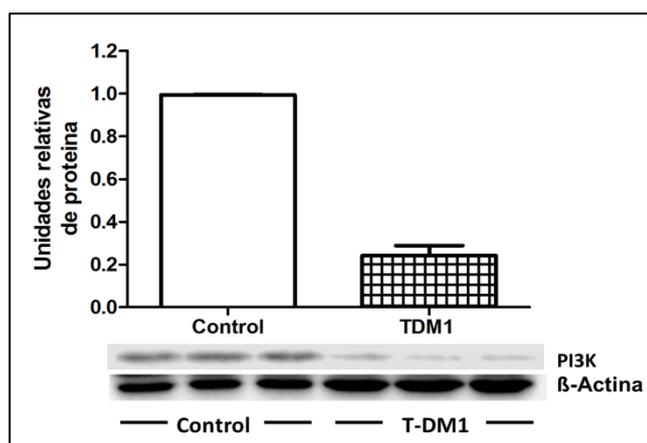


Fig. 1. El tratamiento con cuatro dosis de T-DM1 (2mg/Kg de peso) ocasionan disminución en los niveles de expresión de PI3K. La electroforesis en geles de poliacrilamida y posterior Western blot se hicieron como se describe en la sección de métodos. Los grupos tratados y no tratados fueron de $n=6$; control de carga: β -Actina; la inyección de las proteínas se realizó por triplicado. Las diferencias observadas fueron significativas, $p < 0.0001$.

El tratamiento con 4 dosis de T-DM1 no provoca cambios en los niveles de expresión de Akt total.

Enseguida examinamos el efecto ejercido por el T-DM1 sobre la expresión de la proteína Akt total (Figura 2) en la fracción citosólica, mediante Western-blot. Como se puede observar los niveles de expresión no sufrieron cambios significativos entre ratas del grupo control (no tratadas) y el grupo de ratas tratadas con T-DM1; 4 dosis (2mg/Kg de peso). En la figura 2 se muestran los 2 grupos: 1.- control (barra blanca) y 2.- tratados con T-DM1 (barra negra); en el eje de las "y" se representan las unidades relativas de proteína Akt en relación a la proteína utilizada como control de carga (densidad de la proteína

Akt/densidad de la proteína β -Actina). En la parte inferior de la fig 2 se muestra una imagen representativa de un Western blot obtenido para Akt total. Para cada grupo la n fue de 6 y como control de carga se utilizó β -Actina; la inyección se realizó por triplicado.

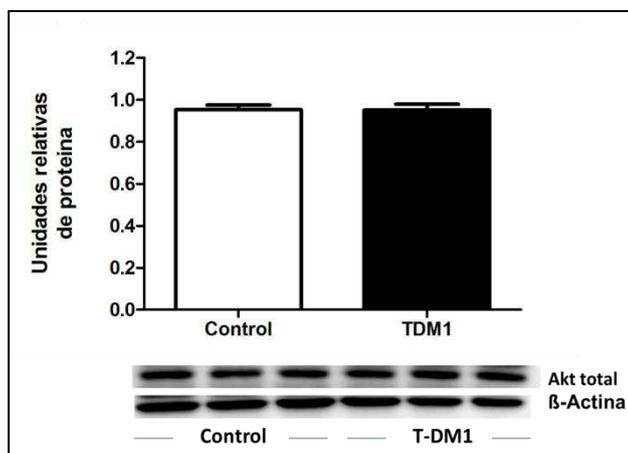


Fig. 2. Efecto del tratamiento con T-DM1 sobre la expresión de Akt. En la sección de métodos se describen las condiciones para la realización de la electroforesis en geles de poliacrilamida y posterior Western blot. Control=ratas hembra no tratadas; T-DM1=ratas hembra tratadas con 4 dosis de T-DM1 (2mg/Kg de peso). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas, $p=0.45$.

El efecto de 4 dosis de T-DM1 sobre los niveles de expresión de Akt -P, ocasiona cambios significativos.

Después de obtener los resultados de Akt total, decidimos investigar si el tratamiento con T-DM1 afectaba la activación (fosforilación) de esta proteína; para ello estudiamos los niveles de expresión de la proteína Akt-fosforilada (Akt-P) (Figura 3) después del tratamiento con el antineoplásico T-DM1, en la fracción citosólica. Los resultados obtenidos arrojaron una disminución significativa de aproximadamente el 60% en la cantidad el nivel de expresión de Akt-P en el VI de ratas después del tratamiento con 4 dosis de T-DM1 con respecto al grupo control (no tratadas). En la figura 3 se muestran los 2 grupos: 1.- control (barra en blanco) y 2.- tratados con T-DM1 (barra con relleno); graficando en el eje de las "y" las unidades relativas de proteína. En la parte inferior se muestra una imagen representativa de un Western-blot realizado para detectar Akt-P.

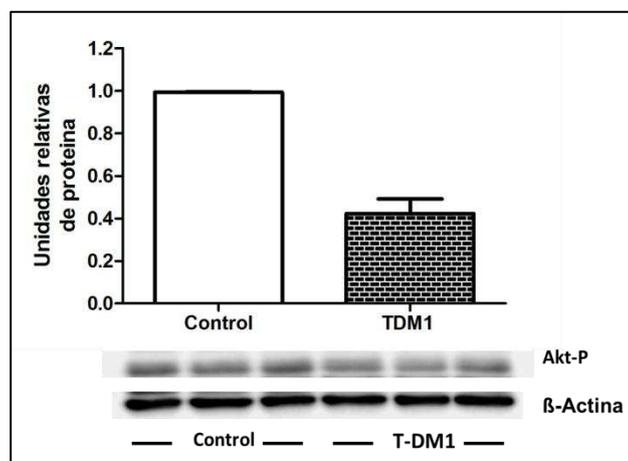


Fig. 3. El tratamiento con 4 dosis de T-DM1 (2mg/Kg de peso) ocasiona disminución en los niveles de expresión de Akt-P. Las muestras se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida y posterior Western Blot siguiendo lo descrito en la sección de métodos. Para cada grupo la n=6 y como control de carga se utilizó β -Actina; la inyección de las proteínas se realizó por triplicado. Las diferencias entre los dos grupos fueron significativas, $p < 0.0001$.

Discusión

El ca de mama es un gran problema de salud tanto a nivel nacional, como mundial. Se sabe que en el periodo de 2011-2016 el ca de mama fue la principal causa de muerte por tumores malignos en mujeres mexicanas de 20 años o más. Existen diversos tratamientos para este tipo de padecimiento maligno, que pueden ser a criterio del médico oncólogo tratante: quirúrgicos, farmacológicos, quimioterapia, radioterapia o la combinación de ellos. Sin embargo en la última década se le ha dado auge a la terapia dirigida; la cual se basa en anticuerpos monoclonales, contra antígenos específicos de las células tumorales, tal es el caso del Trastuzumab y T-DM1, empleados en el tratamiento de pacientes con tumores mamarios que sobre-expresan el oncogén ErbB-2, que codifica para un receptor conocido como HER2 (en humanos) o ErbB2 (en roedores).

La vía de señalización de la fosfatidilinositol-3-kinasa (PI3K/Akt) es de vital importancia en gran variedad de aspectos del crecimiento y la supervivencia celular. Esta vía es estimulada fisiológicamente por factores de crecimiento mediante la unión con receptores de la familia HER; además puede ser activada por factores reguladores de sobrevida y muerte celular. Varias alteraciones genéticas como amplificación, mutación, delección y re-arreglos cromosómicos pueden comprometer la vía PI3K, generando su activación permanente. Tal es el caso del ca de mama, donde el oncogén ErbB-2 se encuentra sobre-expresado y activado; generando la activación continua de esta vía. Dicha activación anormal de la vía PI3K/Akt resulta en alteración de los mecanismos de control del crecimiento y la supervivencia celular (anti apoptótica), lo que favorece el crecimiento competitivo, la capacidad metastásica y, frecuentemente, una mayor resistencia a los tratamientos (Carlos Eduardo Pinzón, 2009).

Como se ha descrito, la función del anticuerpo monoclonal Tz y el conjugado T-DM1, es inhibir la proliferación y sobrevida de las células cancerosas, lo cual es deseable; sin embargo este mecanismo de los antineoplásicos lo pueden ejercer en células sanas que expresen en su membrana los receptores HER-2 entre ellas las células cardíacas; por tal motivo, tanto Tz como T-DM1 pueden afectar vías importantes para la sobrevida de la célula cardíaca como es la vía PI3K/Akt.

De hecho, en los tejidos cardíacos, HER2 funciona como un correceptor para HER4, y su ligando, la neuregulina 1 (NRG1), que promueve la heterodimerización de HER4 / HER2, que a su vez desencadena la activación de las vías ERK-MAPK y PI3K-Akt, promoviendo así la supervivencia de los cardiomiocitos y la función contráctil. El bloqueo de HER2 podría provocar disfunción cardíaca o muerte de cardiomiocitos (Claudia De Lorenzo, 2018).

Existen reportes en la literatura que han generado la controversia sobre la posible o no carditoxicidad del conjugado T-DM1; en este estudio presentamos resultados de gran importancia, ya que mostramos que la vía PI3K/Akt se ve afectada en células cardíacas por la administración de 4 dosis (2mg/Kg de peso) con el antineoplásico utilizado en el tratamiento de ca de mama. Al ser una vía que regula el crecimiento y la supervivencia celular, una afección a ella compromete la correcta función de la células, lo que podría explicar el efecto cardiotóxico secundario al tratamiento con T-DM1. Los resultados obtenidos en el presente trabajo pueden ser importantes para el oncólogo-médico para que cuando el tratamiento de elección sea T-DM1 simultáneamente se administre al paciente un tratamiento cardioprotector.

Como ya se mencionó el oncogén erbB-2, se encuentra sobre-expresado en el cáncer mamario; los niveles del EGFR usualmente se encuentran entre 40,000 a 100,000 receptores por célula, mientras que en carcinoma de mama se han reportado alrededor de 2 millones de receptores por célula (Octavio Zerecero Carreón, 2012).

En cuanto a la activación continua de la vía PI3K/Akt relacionada con alteraciones genéticas, se han identificado deleciones en las porciones extracelulares, las cuales son las siguientes:

- Variante I (EGFRvI) se caracteriza por la deleción de todo el dominio extracelular. El receptor es constitutivamente activo y no puede ser regulado por el ligando.
- Variante II (EGFRvII), ocurre la deleción de 83 aminoácidos de la porción extracelular del receptor. Este receptor mantiene la capacidad de unir el ligando, pero presenta un aumento de su actividad tirosín-cinasa.
- Variante III (EGFRvIII) es la mutación más común e implica la deleción de los exones 2 al 7 en el dominio extracelular, lo cual conduce a un receptor constitutivamente activo, que no se regula negativamente por endocitosis. (Tania Lahera Sánchez, 2010).

Otro problema de gran importancia que se ha observado después de la administración de Trastuzumab; es que un número significativo de pacientes con ca de mama, será eventualmente resistente a la terapia con este anticuerpo monoclonal. Una desventaja en el uso de estos antineoplásicos como ya se mencionó, es que se dirigen a células cancerosas en fase proliferativa, sin embargo muchas de estas se encuentran en fase de reposo, por lo cual gran parte de las células serán resistentes al tratamiento (Velázquez, 2008).

Algunos autores han propuesto mecanismos por el cual la célula cancerosa puede generar la resistencia a Trastuzumab, uno de ellos es la heterodimerización de HER2 con HER1, la cual reduce la tasa de endocitosis y degradación, lo que promueve su reciclaje hacia la superficie celular. (Tania Lahera Sánchez, 2010).

Se han descrito en estudios, otros procesos por los cuales se puede generar resistencia a Trastuzumab; uno de ellos describe que la mayoría de los agentes anticancerosos inducen la apoptosis a través de la activación de diferentes genes que activan especies

reactivas de oxígeno (ROS) en las células cancerosas. La generación de ROS afecta a varias vías de señalización sensibles a redox que conducen a la muerte celular. El tratamiento prolongado con el mismo medicamento estimula las enzimas antioxidantes protectoras celulares para hacer frente al estrés oxidativo. Estos procesos de adaptación y la disminución de los niveles de ROS celular implican la activación de proteínas de supervivencia sensibles a redox a través de la activación de enzimas antioxidantes que conducen a un aumento celular y la capacidad de supervivencia que convierte las células cancerosas sensibles al fármaco en células resistentes (Zahra Mohammadi Abgarmi, 2018).

Asimismo la hiperactivación de la vía PI3K / Akt por mutaciones o la pérdida de la expresión de PTEN (fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa) se ha asociado con la resistencia a Trastuzumab, por lo tanto la pérdida de PTEN podría utilizarse como un marcador para adelantarse a dicha resistencia.

PTEN es una proteína que regula la señal de supervivencia celular, dependiente e independiente de la vía PI3K/Akt. Esta proteína supresora de tumor se expresa cuando existen señalizaciones de daño celular, bloqueando la supervivencia de la célula mediante p53. La p53 se mantiene activa para inhibir la proliferación celular y promover los procesos de reparación o apoptosis (Carlos Eduardo Pinzón, 2009).

Este par de inconvenientes que tiene el uso de Tz como lo es el efecto cardiotoxico y la reciente resistencia mostrada por células cancerosas, la FDA ha aprobado un nuevo anticuerpo monoclonal, Trastuzumab–Emtansina (T-DM1) para pacientes con ca de mama metastásico HER2 positivo, con previo tratamiento con Trastuzumab y taxanos. (Luis Manso, 2018) (general, 2016).

El suministro dirigido de medicamentos está diseñado para minimizar la toxicidad periférica. El enlace tioéter del T-DM1 y el componente del anticuerpo sufren una degradación lisosomal cuando la vesícula del endosoma y el lisosoma se fusionan, lo que permite la liberación del componente DM1 en la célula. Mientras tanto, el componente Trastuzumab continúa ejerciendo efectos antitumorales mediante la inhibición de la señalización celular y la citotoxicidad celular dirigida por anticuerpos. T-DM1 ha demostrado éxito en varios ensayos clínicos. Es importante destacar que T-DM1 ha demostrado su eficacia en el ajuste de la resistencia a Trastuzumab (Heidi Egloff, 2018)

Las toxicidades asociadas con T-DM1 son diarrea, estreñimiento, náuseas, vómitos, fatiga, cefalea, epistaxis, neuropatía periférica, artralgia, pirexia, trombocitopenia, anemia. La información actual de prescripción de la FDA recomienda la interrupción de T-DM1 en casos de neumopatía intersticial o neumonitis (Heidi Egloff, 2018)

Actualmente T-DM1 se está probando en ensayos clínicos. Uno de los mecanismos de acción del Trastuzumab incluye la inhibición de la vía de señales PI3K/Akt, por medio de la inactivación fisiológica tirosín-cinasa del receptor HER2, efecto que puede extenderse a los receptores HER2 del tejido cardiaco. Hasta el momento se desconocía si T-DM1 retiene la capacidad inhibitoria de la vía PI3K/Akt, pero nuestros resultados demuestran

que al igual que Trastuzumab, el anticuerpo T-DM1, afecta la vía de salvamento en células cardiacas sanas, ya que encontramos una disminución en los niveles de expresión de la proteína PI3K con la consecuente inhibición de la activación de la proteína Akt (Akt-fosforilada) después del tratamiento con 4 dosis de T-DM1 (2mg/Kg de peso); no así para los niveles de expresión de Akt total, los cuales no sufrieron cambios respecto al grupo control.

Estos resultados podrían explicar parte del mecanismo por el cual Trastuzumab-Emtansina (T-DM1) puede afectar a células cardiacas y posiblemente, como consecuencia una falla cardiaca. Es importante mencionar que es la primera vez que se realiza este estudio en un sistema experimental *in vivo*, por lo que estos resultados serán de gran utilidad en el diseño de estrategias de tratamiento que confieran cardioprotección a la paciente que sea sometida a un tratamiento con el conjugado Trastuzumab-emtansina.

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación puede complementar lo reportado en un estudio realizado por Claudia De Lorenzo, 2018, en el cual se informa del efecto cardiotoxico generado por el uso de T-DM1; dicho estudio se realizó en tres líneas celulares cardiacas diferentes: cardiomioblastos de rata (H9C2), cardiomiocitos fetales humanos (HFC) y cardiomiocitos derivados de células madre pluripotentes inducidas de tipo adulto (Cor.4U). Los autores describen que la viabilidad de todas las líneas celulares cardíacas tratadas se vieron afectadas significativamente. T-DM1 mostró efectos inhibitorios (de la viabilidad) superiores en las células cardíacas con respecto a trastuzumab y pertuzumab (los cuales también fueron evaluados) (Claudia De Lorenzo, 2018).

El efecto cardiotoxico de T-DM1 puede explicarse, ya que podría deberse a la capacidad biológica del Trastuzumab para bloquear a HER2, además de los efectos del agente tóxico DM1, que como inhibidor de los microtúbulos probablemente modifique la morfología de las células cardiacas.

Cabe mencionar que nuestros resultados además de brindar una gran información sobre el efecto regulador negativo que tiene T-DM1 sobre la vía PI3K/Akt en células cardiacas, puede ser la base para futuros estudios y así poder entender y comprender los efectos secundarios sobre el corazón de los anticuerpos monoclonales utilizados en el tratamiento de cáncer. Por otra parte se ha generado información para el equipo médico (oncólogos y cardiólogos), en su decisión por la mejor opción en el tratamiento de personas con cáncer. Perspectivas a futuro: conocer los niveles de expresión de la proteína m-TOR, lo cual complementaría el estudio de esta importante vía.

Conclusión

El tratamiento con 4 dosis de trastuzumab-emtansina (2mg/kg de peso) en ratas adultas, afecta la vía de señalización PI3K/Akt (fosfoinositósido 3-cinasa/proteín cinasa B) involucrada en los mecanismos de respuesta de la célula cardiaca ante un daño o en el

proceso de reparación, disminuyendo los niveles de expresión de PI3K y la activación de Akt. Cumpliendo así los objetivos de este trabajo de investigación.

Esto es de gran relevancia para futuros estudios, en los cuales se pueda utilizar algún marcador para identificar daño en células cardiacas, así como estudiar el efecto en células sanas que expresen el receptor HER. Por otra parte, investigar los niveles de expresión de la proteína m-TOR será de gran importancia para extender y complementar la información sobre la vía PI3K/Akt (de salvamento).

Bibliografía

- Brown D, e. a. (2018). Neuregulin-1 is essential for nerve plexus formation during cardiac maturation. *journal of cellular and molecular medicine*.
- Bruce A. Chabner, M., Thomas J. Lynch, J. M., & Dan L. Longo, A. M. (2009). *Harrison Manual de Oncología*. Ciudad de México: INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C.V.
- cáncer, C. M. (2018, 10 22). *INCAN*. Retrieved from INCAN: <http://incan-mexico.org/incan/docs/docencia/cmama.pdf>
- Cáncer, I. N. (2018, 10 05). *National Cancer Institute at the National Institutes of Health*. Retrieved from National Cancer Institute at the National Institutes of Health: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
- Carlos Eduardo Pinzón, M. M. (2009). Role of phosphatidylinositol 3-kinase pathway (PI3K/Akt) in humans. *Rev. Cienc. Salud*, 47-66.
- Cemil Ozelik, e. (2002). Conditional mutation of the ErbB2 (HER2) receptor in cardiomyocytes leads to dilated cardiomyopathy. 8880-8885.
- Claudia De Lorenzo, e. a. (2018). Cardiotoxic effects of the novel approved anti-ErbB2 agents and reverse cardioprotective effects of ranolazine. *OncoTargets and Therapy*, 2241–2250.
- David L. Nelson, M. M. (2001). *Lehninger Principios de Bioquímica*. Barcelona : Omega.
- Eduardo Lazcano Ponce, P. E. (2014). *CÁNCER DE MAMA: DIAGNÓSTICO, TRATAMIENTO, PREVENCIÓN Y CONTROL*. México: SPM ediciones.
- Enrique Ruiz-Mori, e. a. (2017). Chemotherapy-induced cardiotoxicity at the Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas 2012-2016. *Horiz. Med.*, 24-28.
- Flores, J. (2014). *Farmacología Humana*. Barcelona: Elsevier.
- general, A. m. (2016). *Tratado de cirugía general*. México: El Manual Moderno.
- Heidi Egloff, e. a. (2018). Ado-Trastuzumab Emtansine-Induced Pulmonary Toxicity: A Single-Institution Retrospective Review. *Case Reports in oncology*, 527–533.

- Hernández, Á. G. (2010). *Tratado de Nutrición Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición*. Madrid: Panamericana.
- HP Rang, M. D. (2012). *Farmacología*. España: Elsevier.
- INEGI. (2018, 10 15). *INEGI*. Retrieved from INEGI:
http://www.beta.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2018/cancer2018_Na l.pdf
- Lei Wang, e. a. (2018). STAT3 activation confers trastuzumab-emtansine (T-DM1) resistance in HER2-positive breast cancer. *Cancer science*, 3305–3315.
- Luis Manso, e. a. (2018). Late Administration of Trastuzumab Emtansine Might Lead to Loss of Chance for Better Outcome in Patients with HER2-Positive Metastatic Breast Cancer. *Breast Care*, 277–283.
- Martín Granados García, O. A. (2016). *Tratamiento del cáncer: oncología médica, quirúrgica y radioterapia*. México, D.F.: El manual moderno.
- Navarrete, S. (2017). Cáncer y cardiotoxicidad en la mujer. *Revista colombiana de cardiología*, 144-153.
- Octavio Zerecero Carreón, e. a. (2012). El receptor para el factor de crecimiento epidérmico y su relación con el cáncer. *Revista especializada en ciencias de la salud*, 15-25.
- OLIVER H. LOWRY, N. J. (1951). PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. *Department of Pharmacology, Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri* , 265-275.
- OMS. (2018, 10 17). *OMS*. Retrieved from OMS:
<http://www.who.int/topics/cancer/breastcancer/es/index1.html>
- Salud, M. d. (2018, 10 05). *Ministerio de la Salud* . Retrieved from Ministerio de la Salud :
<http://www.msal.gob.ar/ent/index.php/informacion-para-ciudadanos/cancer>
- SALUD, S. D. (2018, 10 24). *IMSS*. Retrieved from IMSS:
http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/232_IMSS_09_Ca_M ama_2oN/GRR_IMSS_232_09.pdf
- SergeyRyzhov, e. a. (2018). ErbB2 promotes endothelial phenotype of human left ventricular epicardial highly proliferative cells (eHiPC). *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 39-50.
- Society, A. C. (2018, 10 05). *American Cancer Society*. Retrieved from American Cancer Society:
<https://www.cancer.org/es/cancer/aspectos-basicos-sobre-el-cancer/que-es-el-cancer.html>

- Solange Moraes Sanches, J. M. (2010). Interacción entre Especialidades: Miocardiopatía Dilatada y Neoplasia de mama HER2 positiva. *Sociedad brasileña de cardiología*, e11-e15.
- Tania Lahera Sánchez, O. J. (2010). Epidermal growth factor receptor and its role in tumor development. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 172-180 .
- Velázquez, e. (2008). *Farmacología Básica y Clínica* . Madrid: Médica Panamericana.
- Yukinori Endo, e. a. (2018). T-DM1-resistant cells gain high invasive activity via EGFR and integrin cooperated pathways. *mAbs*, 1003-1017.
- Zahra Mohammadi Abgarmi, e. a. (2018). Inhibition of Erbb2 by Trastuzumab Induces Oxidative Stress Markers in HER2 Positive Breast Cancer Cell Lines. *Journal of Research in Medical and Dental Sciences*, 158-165.

Glosario de términos médico-científicos

- **ADCC**: citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.
- **Akt**: proteín cinasa B.
- **Akt-P**: proteín cinasa B fosforilada.
- **Antineoplásica**: son sustancias que impiden el desarrollo, crecimiento, o proliferación de células tumorales malignas. Estas sustancias pueden ser de origen natural, sintético o semisintético.
- **AR**: anfiregulina.
- **Artromialgia**: presencia de dolor a nivel muscular y articular de carácter inespecífico, son de carácter intermitente, cambiantes, no asociadas a ningún esfuerzo físico o traumatismo.
- **Bcl2**: gen que codifica para una proteína, cuya función es bloquear el suicidio celular.
- **BRCA1**: gen involucrado en la reparación del ADN.
- **BRCA2**: gen involucrado en la reparación del ADN.
- **BTC**: Betacelulina.
- **Ca de mama**: cáncer de mama
- **Carcinoma ductal in situ (CDIS)**: Cáncer en células que revisten a los conductos galactóforos del seno (por donde circula la leche), pero no se han propagado al tejido mamario circundante. El DCIS se considera un cáncer de seno no invasivo o preinvasivo.
- **c-fos**: proto-oncogén celular perteneciente a la familia de factores de transcripción de genes de expresión rápida.
- **Cinasas dependientes de ciclinas [cdc]**: enzimas que regulan el correcto desarrollo del ciclo celular.
- **c-myc**: gen regulador que codifican factores de transcripción.
- **Cor.4U**: cardiomiocitos derivados de células madre pluripotentes de tipo adulto.
- **EGF**: Factor de crecimiento epidérmico (epidermal growth factor).
- **EGFR**: receptores de factores de crecimiento epidérmico.

- **Emesis:** aparición de vómitos relacionados con el tratamiento de la quimioterapia, también las arcadas y las náuseas, que son la sensación del deseo de vomitar, de malestar digestivo y de incapacidad para retener el vómito; aunque este no se produzca.
- **EPR:** Epiregulina.
- **Erb-B2:** Proto-oncogén que codifica para el receptor HER.
- **ERK-MAPK:** vía MAPK/ERK o vía MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases, o proteína quinasas activadas por mitógenos).ERK: extracellular-signal-regulated kinase.
- **FDA:** Food and Drug Administration (Administración de Medicamentos y Alimentos).
- **H9C2:** cardiomioblastos de rata.
- **HB-EGF:** Factor de crecimiento análogo al EGF de unión a la heparina (heparin binding-EGF).
- **Her 2/neu:** Receptor para factor de crecimiento epidérmico (Human Epidermal growth factor Receptor type 2). También conocido como ErbB2.
- **HFC:** cardiomiocitos fetales humanos.
- **K-ras:** gen que actúa como un interruptor de encendido / apagado en la señalización celular. Controla la proliferación celular.
- **Mastectomía:** Operación quirúrgica que consiste en la extirpación de la glándula mamaria o de una parte de ella.
- **Mielodepresión:** La mielodepresión es una afección en la que disminuye la actividad de la médula ósea, lo que hace que haya menos glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas.
- **N-ras:** El gen NRAS proporciona instrucciones para producir una proteína llamada N-Ras que participa principalmente en la regulación de la división celular.
- **Oncogén:** Gen que por su gran capacidad de mutación o transformación induce a la formación de cáncer en una célula.
- **PI3K:** fosfoinositósido 3-cinasa.
- **Proto-oncogén:** gen que regula el crecimiento y la diferenciación celular.
- **PTEN:** (fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa).
- **p53:** proteína supresora de tumores. También llamado el "guardián del genoma".
- **ROS:** especies reactivas de oxígeno.
- **TGF- α :** Factor de crecimiento transformante α (transforming growth factor).
- **VI:** ventrículo izquierdo.

Vo.Bo Asesor Interno
M. en C. Francisco López Naranjo

Vo.Bo Asesor Externo
Dra. Margarita del Carmen Ramírez Ortega



División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Departamento Sistemas Biológicos
Licenciatura: Químico Farmacéutica Biológica

Título: Análisis de las vías de señalización activadas por Erb-B2 en corazón de rata adulta post-tratamiento con el antineoplásico Trastuzumab-Emtansina (T-DM1)

Proyecto genérico: Evaluación de productos relacionados con la salud

Etaapa: Evaluación fármaco-toxicológica de compuestos activos

Lugar de realización: Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez y Laboratorio N-109 planta piloto UIDIS

P R E S E N T A

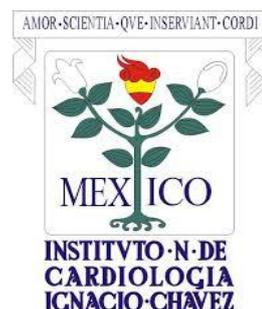
Eber Owen Ali Domínguez García

Dirección: Vicente Suárez #31, Xochimilco, CDMX

Tel: 58434404

Cel: 5532031298

Email: eberdominguez1@gmail.com



Aseso interno:

M en C. Francisco López Naranjo

Asesora externa:

Dra. Margarita del Carmen Ramírez Ortega

CDMX SEPTIEMBRE 2019

Antecedentes

El cáncer de la glándula mamaria (ca de mama) es la neoplasia más diagnosticada entre las mujeres y la segunda después de cáncer de pulmón como causa de muerte relacionada con neoplasias en mujeres (Bruce A. Chabner, Thomas J. Lynch, & Dan L. Longo, 2009). Para el periodo de 2011 a 2016; el cáncer de mama fue la principal causa de mortalidad por tumores malignos en mujeres de 20 años o más, cabe destacar que no es una enfermedad exclusiva de las mujeres (INEGI, 2018).

El oncogen erbB-2, se encuentra sobre-expresado y activado en aproximadamente el 30% de los casos con cáncer mamario y está relacionado con mayor agresividad tumoral, frecuentemente se observa la presencia de nódulos axilares incrementados y su pronóstico es de menor sobrevivencia.

Tratamiento

Se conocen diferentes tratamientos para el ca de mama, entre los que se encuentran tratamientos quirúrgicos, quimioterapia, farmacológicos, radioterapia, etc.

Los principales fármacos antineoplásicos se pueden dividir en las siguientes categorías:

- Fármacos citotóxicos, incluyen:
 - Alquilantes y compuestos relacionados, que actúan formando enlaces covalentes con el ADN e impiden de esta manera su replicación.
 - Anti metabolitos, que bloquean o interrumpen una o más vías metabólicas que intervienen en la síntesis de ADN.
 - Antibióticos citotóxicos, es decir, sustancias de origen bacteriano que impiden la división de las células de mamíferos.
 - Derivados de plantas (alcaloides de la vinca, taxanos, camptotecinas): la mayoría afecta de manera específica a la función de los microtúbulos y, por tanto, a la formación del huso mitótico.
- Anticuerpos monoclonales: dirigidos contra antígenos asociados al tumor entre los cuales podemos nombrar: antígenos de diferenciación hematopoyética, factores de crecimiento, receptores para factores de crecimiento, antígenos involucrados en la angiogénesis, etc (Scott, 2012).
- Inhibidores de las proteínas cinasas: estos fármacos inhiben las proteínas cinasas (habitualmente tirosina cinasas) que actúan como transductores de señales de crecimiento en células de división rápida. Son de uso más bien limitado (HP Rang, 2012).

Terapia dirigida: Anticuerpos monoclonales

Su incorporación es relativamente reciente; pero a diferencia de los fármacos citotóxicos mencionados, ofrecen una perspectiva de tratamiento altamente focalizado, sin que

existan algunos de los efectos adversos propios de la quimioterapia convencional. No obstante, esta ventaja se ve en buena medida contrarrestada cuando se emplean en combinación con otros fármacos tradicionales. Existen varios anticuerpos monoclonales utilizados en la actualidad, por ejemplo: trastuzumab, cetuximab, rituximab, bevacizumab, alemtuzumab, panitumumab y trastuzumab-Emtansina (T-DM1), aunque su elevado costo constituye un problema ciertamente importante, ya que no están disponibles para toda la población que los requiere; de lo cual deben estar conscientes los pacientes y sus familiares, porque lo peor es iniciar un tratamiento fármaco-terapéutico, oncológico, etc; y abandonarlo porque de esta manera la enfermedad avanza mucho más rápido.

Trastuzumab

El trastuzumab (Herceptin) es un anticuerpo monoclonal humanizado IgG1 que reconoce al receptor para el factor de crecimiento epidérmico humano (EGF): el receptor de tipo 2, o HER2 (Human Epidermal growth factor Receptor type 2) (imagen 5). La proteína HER2 está sobre expresada en el 15-30% de los ca de mama, lo que le da la característica de subtipo agresivo.

El trastuzumab se fija a un dominio de la porción extracelular de HER2 y allí puede ejercer alguna de estas 2 funciones:

1. Obstaculizar la dimerización de HER2.
2. Aumenta la endocitosis del receptor, impidiendo la activación del dominio tirosinasa.

Trastuzumab está indicado en el ca de mama HER2+, tanto en fases avanzadas como adyuvante en estadios tempranos. En el ca de mama se ha demostrado una fuerte sinergia con diversos citostáticos, lo que, por otro lado, es interesante, porque los tumores HER2+ son rápidamente proliferativos.

Administración. Se administra por vía intravenosa. Tiene una $t_{1/2}$ de unos 28 días y se puede administrar cada 1, 2 ó 3 semanas: las dosis respectivas son de 2mg/Kg, 4mg/Kg o 6mg/Kg, en todos los casos precedidas de dosis de carga de 4,6 u 8 mg/Kg. Como no atraviesa la barrera cráneo encefálica, no actúa sobre las metástasis cerebrales.

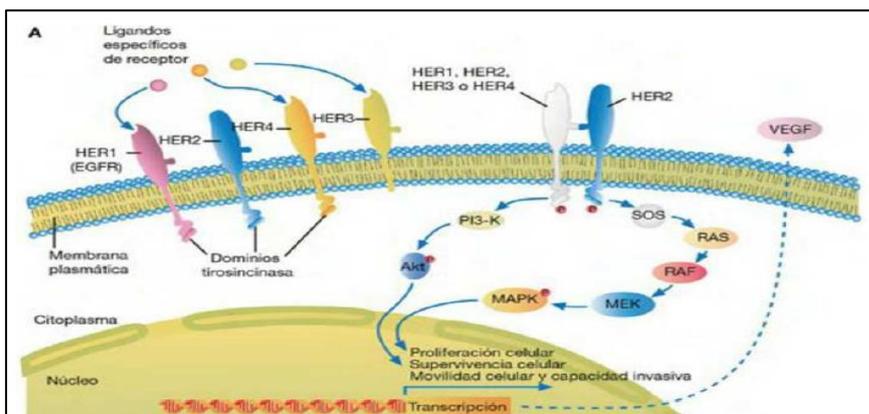


Imagen 5: Mecanismos de Trastuzumab en familia de receptores HER.

Trastuzumab- Emtansina (TDM-1)

Trastuzumab-Emtansina o T-DM1 (Kadcyla) es un nuevo fármaco antineoplásico, innovador, único y selectivo. Se trata de un conjugado anticuerpo-fármaco, compuesto por el anticuerpo anti-HER2, Trastuzumab y el agente DM1, un inhibidor microtubular (derivado de la maitansina), unido a través del enlace tioéter estable MCC (4- [N-maleimidometil] ciclohexano- 1- carboxilato). Este anticuerpo está diseñado de tal forma que una vez que llega a su célula diana libera el citotóxico en el interior de la misma.

Los microtúbulos son polímeros de citoesqueleto vitales y dinámicos, desempeñan una función crítica en la división celular, señalización, transporte y polaridad, lo que los hace blancos atractivos en los esquemas anticáncer y diseño de fármacos. Están compuestos de 13 protofilamentos lineales, cada protofilamento está formado por heterodímeros de tubulina α/β .

DM1, el componente citotóxico, se une a la tubulina. Al inhibir la polimerización de tubulina, tanto DM1 como Trastuzumab, detienen el ciclo celular, lo que finalmente provoca la muerte celular por apoptosis (ver imagen 6). Los resultados de los ensayos de citotoxicidad in vitro muestran que DM1 es entre el 20 y 200 veces más potente que los taxanos y los alcaloides de la vinca. El enlazador MCC está destinado a limitar la liberación sistémica y potenciar el transporte de DM1 hacia dianas específicas.

La conjugación de DM1 a Trastuzumab confiere selectividad al agente citotóxico por las células de tumores que sobre expresan HER-2, lo que potencia el transporte intracelular de DM1 directamente hacia el interior de las células malignas. La unión a HER-2 causa la internalización de T-DM1 mediada por el receptor y la consiguiente degradación en lisosomas, lo que da lugar a la liberación de catabolitos citotóxicos que contienen DM1 (principalmente lisina- MCC- DM1) (imagen 6).

T-DM1, fue aprobado por la FDA para pacientes con ca de mama metastásico positivo para HER-2, con previo tratamiento con trastuzumab y taxanos. Los efectos secundarios después del tratamiento con T-DM1 son trombocitopenia, elevación transitoria de transaminasa, náusea, fatiga, mialgias (general, 2016). La dosis recomendada es de 3.6 mg/Kg de peso corporal, administrado por vía intravenosa cada tres semanas en ciclos de 21 días.

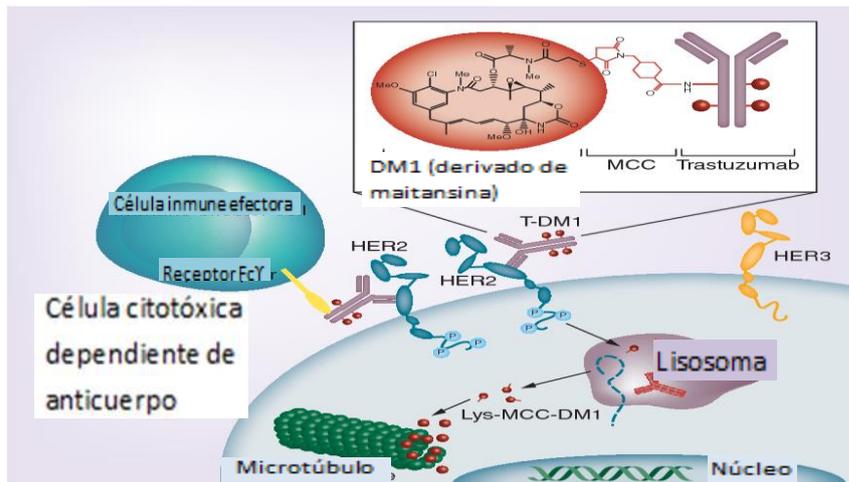


Imagen 6: Mecanismo de TDM1 sobre receptores HER2.

Receptores HER

La familia de receptores transmembrana (HER1 a HER4), regula funciones celulares como el crecimiento, supervivencia, adherencia, migración, diferenciación y la vascularización. Todos poseen un dominio intracelular donde reside la actividad tirosín-cinasa (salvo HER3, que no posee esa actividad). El ligando endógeno, al unirse al receptor, cambia su conformación y promueve su dimerización como homodímeros (por ejemplo HER1/HER1) o heterodímeros (por ejemplo HER2/HER3 (imagen 5)). A diferencia de los demás, HER2 adopta una conformación fija semejante a la del estado activado por el ligando. Una elevada riqueza en HER2, originada por una amplificación del gen *erbB-2* tiene como resultado continuas señales en dos cascadas de señalización: las vía *ras-MAPK*, implicada en la proliferación celular, y la ruta *PI3K-AKT-mTOR*, que inhibe la apoptosis (Flores, 2014).

Esta familia de receptores (EGFR, ErbB), se encuentra localizada en la membrana plasmática de cardiomiocitos. La señalización a través del EGFR es crucial en el desarrollo embrionario, su papel en el desarrollo epitelial, la proliferación y la organogénesis, ha quedado claramente demostrado (Tania Lahera Sánchez, 2010).

En ausencia de ligandos, los EGFR residen en la membrana de la célula de forma inactiva, distribuidos uniformemente en su superficie. Al encontrarse en la superficie celular, por azar tienen la capacidad de trans-fosforilarse, actividad que se ve rápidamente inhibida por la actividad fosfatasa basal de la célula.

Su actividad es esencial en el desarrollo del embrión, que como se mencionó está implicado en la organogénesis de muchos órganos derivados del mesodermo y el ectodermo, tales como cerebro, corazón y pulmón. Además se sabe que los receptores ErbB están involucrados en el desarrollo de los ductos mamarios en la pubertad, la proliferación del lóbulo alveolar en el embarazo y la producción de leche en el postparto (Tania Lahera Sánchez, 2010).

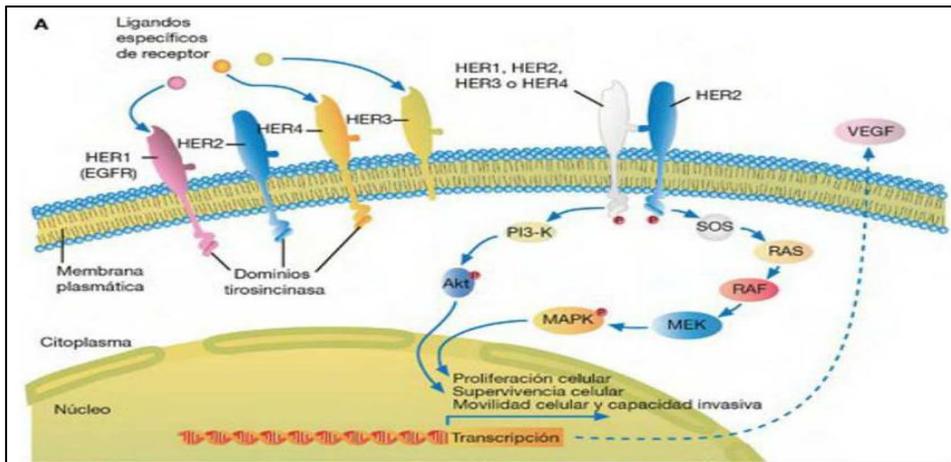


Imagen 5: Familia de EGFR. Se muestra homodimerización y heterodimerización entre receptores. Así como las vías de señalización que se activan

Consecuencias del tratamiento con anticuerpos monoclonales

Si bien los nuevos tratamientos antineoplásicos (como el trastuzumab) han mejorado la supervivencia de las pacientes con cáncer de mama, estos también tienen efectos secundarios principalmente sobre el sistema cardiovascular, que en ocasiones no son diagnosticados a tiempo. De esta forma, los logros conseguidos por este tipo de tratamiento antineoplásico se contrarrestan con el impacto en la salud cardiovascular. Las complicaciones incluyen disfunción miocárdica, complicaciones pericárdicas, isquemia miocárdica, etc. Por increíble que parezca estas complicaciones cardiovasculares son ahora la segunda causa de morbilidad y mortalidad de los pacientes que han sobrevivido al cáncer; así que en realidad están en mayor riesgo de muerte por causas cardiovasculares que por el cáncer; además, la cardiotoxicidad temprana puede limitar el completar un tratamiento antineoplásico efectivo (Navarrete, 2017).

El Trastuzumab, se utiliza en cáncer de mama HER2 positivo, con pronósticos favorables pero también conlleva a un compromiso de la función cardíaca. Puede causar una disfunción contráctil del corazón; generalmente se produce una reducción de la función ventricular izquierda (reducción > 10% de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo) (Enrique Ruiz-Mori, 2017).

Justificación

T-DM1 ha mostrado su efectividad tanto en modelos in vivo (ratones) como in vitro (cultivos celulares de cáncer mamario) para destruir células de cáncer de mama resistentes al Tz. Así mismo ha demostrado una gran capacidad de inducir apoptosis en células de cáncer de mama. Recientemente, se ha reportado que T-DM1 tiene una gran actividad en estudios fase I y II en los cuales se administró a pacientes con tumores de cáncer de mama sobreexpresando HER2 con resistencia a Trastuzumab. Por lo tanto, dadas las características del compuesto T-DM1, éste tiene la habilidad de ocasionar tanto apoptosis como catástrofe mitótica sobre las células que expresan el receptor HER2. Existe

controversia en los reportes que señalan que el tratamiento con T-DM1 no ocasiona cardiotoxicidad y los que señalan que las pacientes sometidas a este tratamiento llegan a presentar insuficiencia cardiaca.

La mayoría de los estudios experimentales para probar la toxicidad de los anticuerpos monoclonales como el T-DM1 se han realizado *in vitro* (en cultivos de células tumorales) lo que no permite ver los efectos secundarios a otros órganos, por lo que es necesario estudiar *in vivo* el efecto adverso del nuevo conjugado Anticuerpo-droga T-DM1 sobre tejido cardiaco. Y de gran importancia sería detectar marcadores tempranos de daño al miocardio ya que se aportarían datos para prevenir el desarrollo de insuficiencia cardiaca en las pacientes bajo tratamiento.

Hipótesis

El tratamiento con el antineoplásico Trastuzumab-emtansina, modifica la vía de señalización PI3K/Akt (fosfoinositósido 3-cinasa/proteín cinasa B) en corazón de rata adulta.

Objetivo general

Investigar *in vivo* (ratas adultas) si el tratamiento con T-DM1 en su papel inhibidor de la actividad fisiológica de ErbB2 en el corazón, modifica la expresión y activación de las moléculas de la vía de señalización PI3K/Akt (fosfoinositósido 3-cinasa/proteín cinasa B) involucradas en los mecanismos de respuesta de la célula cardiaca ante un daño o en el proceso de reparación.

Objetivos específicos

- Determinar en ratas hembra adulta si el tratamiento con cuatro dosis de T-DM1 (2mg/kg) modifica la expresión de la proteína PI3K en tejido cardiaco.
- Determinar en ratas hembra adulta si el tratamiento con cuatro dosis de T-DM1 (2mg/kg) modifica la expresión y activación de la proteína Akt en tejido cardiaco.

Metodología

El estudio se realizó empleando un grupo de 12 ratas Wistar (peso 300-350g) hembras adultas a las cuales previo al tratamiento se les extirpó quirúrgicamente los ovarios. Los animales se sub-agruparon al azar en dos grupos, siendo n=6 para cada grupo: I. control (inyectado con vehiculo); II. Tratadas con 4 dosis de T-DM1 (2 mg/kg de peso cada cuarto día), por vía de administración intravenosa (vena caudal). Dos días después de la 4ª dosis los animales se sacrificaron bajo anestesia obteniendo el corazón, separando el ventrículo izquierdo (VI); éste se almacenó inmediatamente a -80°C hasta su uso.

Detección de proteínas PI3K, Akt y P-Akt

Obtención de fracciones sub-celulares de ventrículo izquierdo.

El VI de las ratas control y tratadas con T-DM1 se colocaron en una solución amortiguadora de homogenización (Solución H) fría (4°C) conteniendo: Sacarosa 250 mM, Tris-HCl 10mM y EDTA 1mM a pH 7.4 y además se le adicionó una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete, Roche) se cortó finamente y se homogenizaron en

homogenizador Polytrón. Los homogenados se centrifugaron a 3000 RPM (4°C). Los sobrenadantes se separaron y se ultracentrifugaron (45,000 RPM/4°C) por 30 min, los botones se resuspendieron en la solución H y se etiquetaron como fracción membranal y los sobrenadantes como fracción citosólica. La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry. (OLIVER H. LOWRY, 1951).

Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS y Western Blot

Alícuotas conteniendo 30 µg de proteínas de la fracción citosólica se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) al 10% con SDS durante una hora a 100 V. Concluida la electroforesis las proteínas se electro-transferieron a membranas de fluoruro de polivinildieno (PVDF) por un tiempo de 1 H a 100 mA; terminada la electrotransferencia las membranas se bloquearon por 2H con una solución de PBS 1X conteniendo 5% de leche descremada (Svelty), una vez bloqueadas las membranas se lavaron tres veces con PBS 1X y enseguida se incubaron con el anticuerpo primario específico por 18 H a 4°C y enseguida 1H a temperatura ambiente bajo agitación orbital constante a velocidad baja; a continuación las membranas se lavaron por 5 veces con PBS1X con Tween 20 al 0.1%, después se adicionó el anticuerpo secundario marcado con peroxidasa por 1H a temperatura ambiente; finalmente las membranas se lavaron con PBS1X 5 veces. Las proteínas se detectaron empleando anticuerpos primarios específicos contra: PI3K, Akt y P-Akt. Los inmunoblots se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes conjugados con peroxidasa y la reacción se visualizó por medio de quimioluminiscencia-facilitada (Millipore), empleando un sistema de detección de imágenes: Chemi Doc Imaging System Bio-Rad. Posteriormente la evaluación densitométrica de las bandas observadas para cada proteína bajo estudio se realizó empleando el programa MyImage Analysis, versión 2.0. Las diferencias entre los grupos se calcularon estadísticamente empleando el programa Graphpad Prism v5. Se consideró una diferencia significativa cuando la $p \leq 0.05$

Resultados

Los niveles de expresión de PI3K disminuyen por efecto del tratamiento con 4 dosis de T-DM1

Para investigar el papel de T-DM1 sobre la vía de salvamento PI3K/Akt después del tratamiento con 4 dosis de T-DM1 (2mg/Kg de peso), primero analizamos los niveles de expresión de PI3K (Figura 1). Los resultados obtenidos muestran un cambio significativo a la baja en los niveles de expresión de la proteína PI3K en el grupo de ratas tratadas de aproximadamente el 80% respecto al grupo control. Este hallazgo es importante, ya que la proteína PI3K es la iniciadora de esta cascada de señalización. En la figura 1 se muestran los 2 grupos: 1.- control (barra blanca) y 2.- tratados con T-DM1 (barra con relleno); en el eje de las "y" se grafican las unidades relativas de proteína con respecto al control de carga. En la parte inferior de la gráfica se presenta un Western blot representativo del estudio.

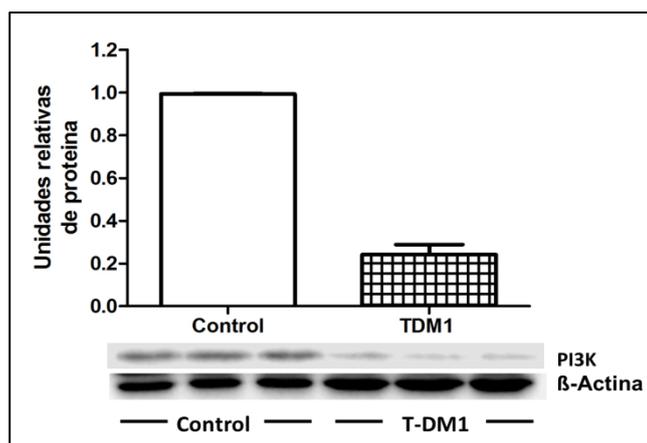


Fig. 1. El tratamiento con cuatro dosis de T-DM1 (2mg/Kg de peso) ocasionan disminución en los niveles de expresión de PI3K. La electroforesis en geles de poliacrilamida y posterior Wester blot se hicieron como se describe en la sección de métodos. Los grupos tratados y no tratados fueron de n=6; control de carga: β -Actina; la inyección de las proteínas se realizó por triplicado. Las diferencias observadas fueron significativas, $p < 0.0001$.

El tratamiento con 4 dosis de T-DM1 no provoca cambios en los niveles de expresión de Akt total.

Enseguida examinamos el efecto ejercido por el T-DM1 sobre la expresión de la proteína Akt total (Figura 2) en la fracción citosólica, mediante Western-blot. Como se puede observar los niveles de expresión no sufrieron cambios significativos entre ratas del grupo control (no tratadas) y el grupo de ratas tratadas con T-DM1; 4 dosis (2mg/Kg de peso). En la figura 2 se muestran los 2 grupos: 1.- control (barra blanca) y 2.- tratados con T-DM1 (barra negra); en el eje de las "y" se representan las unidades relativas de proteína Akt en relación a la proteína utilizada como control de carga (densidad de la proteína Akt/densidad de la proteína β -Actina). En la parte inferior de la fig 2 se muestra una imagen representativa de un Western blot obtenido para Akt total. Para cada grupo la n fue de 6 y como control de carga se utilizó β -Actina; la inyección se realizó por triplicado.

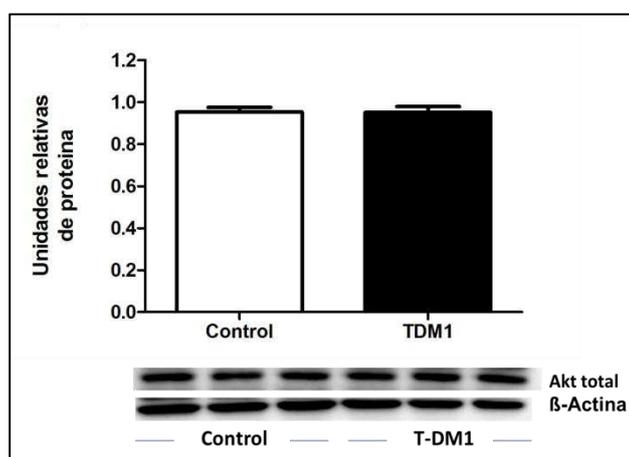


Fig. 2. Efecto del tratamiento con T-DM1 sobre la expresión de Akt. En la sección de métodos se describen las condiciones para la realización de la electroforesis en geles de poliacrilamida y posterior Western blot. Control=ratas hembra no tratadas; T-DM1=ratas hembra tratadas con 4

dosis de T-DM1 (2mg/Kg de peso). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas, $p=0.45$.

El efecto de 4 dosis de T-DM1 sobre los niveles de expresión de Akt -P, ocasiona cambios significativos.

Después de obtener los resultados de Akt total, decidimos investigar si el tratamiento con T-DM1 afectaba la activación (fosforilación) de esta proteína; para ello estudiamos los niveles de expresión de la proteína Akt-fosforilada (Akt-P) (Figura 3) después del tratamiento con el antineoplásico T-DM1, en la fracción citosólica. Los resultados obtenidos arrojaron una disminución significativa de aproximadamente el 60% en el nivel de expresión de Akt-P en el VI de ratas después del tratamiento con 4 dosis de T-DM1 con respecto al grupo control (no tratadas). En la figura 3 se muestran los 2 grupos: 1.- control (barra en blanco) y 2.- tratados con T-DM1 (barra con relleno); graficando en el eje de las "y" las unidades relativas de proteína. En la parte inferior se muestra una imagen representativa de un Western-blot realizado para detectar Akt-P.

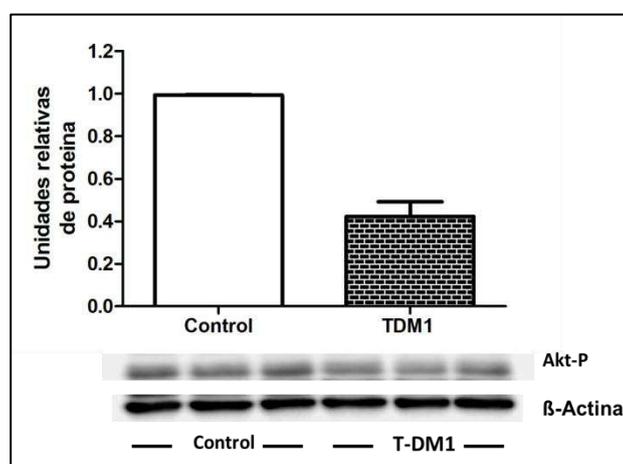


Fig. 3. El tratamiento con 4 dosis de T-DM1 (2mg/Kg de peso) ocasiona disminución en los niveles de expresión de Akt-P. Las muestras se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida y posterior Western Blot siguiendo lo descrito en la sección de métodos. Para cada grupo la $n=6$ y como control de carga se utilizó β -Actina; la inyección de las proteínas se realizó por triplicado. Las diferencias entre los dos grupos fueron significativas, $p<0.0001$.

Discusión

El ca de mama es un gran problema de salud tanto a nivel mundial como en México. Se sabe que en el periodo de 2011-2016 el ca de mama fue la principal causa de muerte por tumores malignos en mujeres mexicanas de 20 años o más. Existen diversos tratamientos para este tipo de padecimiento maligno, que pueden ser a criterio del médico oncólogo tratante: quirúrgicos, farmacológicos, quimioterapia, radioterapia o la combinación de ellos. Sin embargo en la última década se le ha dado auge a la terapia dirigida; la cual se basa en anticuerpos monoclonales, contra antígenos específicos de las células tumorales, tal es el caso del Trastuzumab y T-DM1, empleados en el tratamiento de pacientes con tumores mamarios que sobre-expresan el oncogén ErbB-2, que codifica para un receptor conocido como HER2 (en humanos) o ErbB2 (en roedores).

La vía de señalización de la fosfatidilinositol-3-kinasa (PI3K/Akt) es de vital importancia en gran variedad de aspectos del crecimiento y la supervivencia celular. Esta vía es estimulada fisiológicamente por factores de crecimiento mediante la unión con receptores de la familia HER; además puede ser activada por factores reguladores de supervivencia y muerte celular. Varias alteraciones genéticas como amplificación, mutación, delección y rearrreglos cromosómicos pueden comprometer la vía PI3K, generando su activación permanente. Tal es el caso del ca de mama, donde el oncogén ErbB-2 se encuentra sobre-expresado y activado; generando la activación continua de esta vía. Dicha activación anormal de la vía PI3K/Akt resulta en alteración de los mecanismos de control del crecimiento y la supervivencia celular (anti apoptótica), lo que favorece el crecimiento competitivo, la capacidad metastásica y, frecuentemente, una mayor resistencia a los tratamientos (Carlos Eduardo Pinzón, 2009).

Como se ha descrito, la función del anticuerpo monoclonal Tz y el conjugado T-DM1, es inhibir la proliferación y supervivencia de las células cancerosas, lo cual es deseable; sin embargo este mecanismo de los antineoplásicos lo pueden ejercer en células sanas que expresen en su membrana los receptores HER-2 entre ellas las células cardiacas; por tal motivo, tanto Tz como T-DM1 pueden afectar vías importantes para la supervivencia de la célula cardíaca como es la vía PI3K/Akt.

Existen reportes en la literatura que han generado la controversia sobre la posible o no carditoxicidad del conjugado T-DM1; en este estudio presentamos resultados de gran importancia, ya que mostramos que la vía PI3K/Akt se ve afectada en células cardiacas por la administración de 4 dosis (2mg/Kg de peso) con el antineoplásico utilizado en el tratamiento de ca de mama. Al ser una vía que regula el crecimiento y la supervivencia celular, una afección a ella compromete la correcta función de la células, lo que podría explicar el efecto cardiotóxico secundario al tratamiento con T-DM1. Los resultados obtenidos en el presente trabajo pueden ser importantes para el oncólogo-médico para que cuando el tratamiento de elección sea T-DM1 simultáneamente se administre al paciente un tratamiento cardioprotector.

Conclusión

El tratamiento con 4 dosis de trastuzumab-emtansina (2mg/kg de peso) en ratas adultas, afecta la vía de señalización PI3K/Akt (fosfoinositósido 3-cinasa/proteín cinasa B) involucrada en los mecanismos de respuesta de la célula cardíaca ante un daño o en el proceso de reparación, disminuyendo los niveles de expresión de PI3K y la activación de Akt) involucrada en los mecanismos de respuesta de la célula cardíaca ante un daño o en el proceso de reparación; por lo cual se cumple el objetivo de este trabajo de investigación.

Bibliografía

Brown D, e. a. (2018). Neuregulin-1 is essential for nerve plexus formation during cardiac maturation. *journal of cellular and molecular medicine*.

- Bruce A. Chabner, M., Thomas J. Lynch, J. M., & Dan L. Longo, A. M. (2009). *Harrison Manual de Oncología*. Ciudad de México: INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C.V.
- cáncer, C. M. (2018, 10 22). *INCAN*. Retrieved from INCAN: <http://incan-mexico.org/incan/docs/docencia/cmama.pdf>
- Cáncer, I. N. (2018, 10 05). *National Cancer Institute at the National Institutes of Health*. Retrieved from National Cancer Institute at the National Institutes of Health: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
- Carlos Eduardo Pinzón, M. M. (2009). Role of phosphatidylinositol 3-kinase pathway (PI3K/Akt) in humans. *Rev. Cienc. Salud*, 47-66.
- Cemil Ozcelik, e. (2002). Conditional mutation of the ErbB2 (HER2) receptor in cardiomyocytes leads to dilated cardiomyopathy. 8880-8885.
- Claudia De Lorenzo, e. a. (2018). Cardiotoxic effects of the novel approved anti-ErbB2 agents and reverse cardioprotective effects of ranolazine. *OncoTargets and Therapy*, 2241–2250.
- David L. Nelson, M. M. (2001). *Lehninger Principios de Bioquímica*. Barcelona : Omega.
- Eduardo Lazcano Ponce, P. E. (2014). *CÁNCER DE MAMA: DIAGNÓSTICO, TRATAMIENTO, PREVENCIÓN Y CONTROL*. México: SPM ediciones.
- Enrique Ruiz-Mori, e. a. (2017). Chemotherapy-induced cardiotoxicity at the Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas 2012-2016. *Horiz. Med.*, 24-28.
- Flores, J. (2014). *Farmacología Humana*. Barcelona: Elsevier.
- general, A. m. (2016). *Tratado de cirugía general*. México: El Manual Moderno.
- Heidi Egloff, e. a. (2018). Ado-Trastuzumab Emtansine-Induced Pulmonary Toxicity: A Single-Institution Retrospective Review. *Case Reports in oncology*, 527–533.
- Hernández, Á. G. (2010). *Tratado de Nutrición Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición*. Madrid: Panamericana.
- HP Rang, M. D. (2012). *Farmacología*. España: Elsevier.
- INEGI. (2018, 10 15). *INEGI*. Retrieved from INEGI: http://www.beta.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2018/cancer2018_Na l.pdf
- Lei Wang, e. a. (2018). STAT3 activation confers trastuzumab-emtansine (T-DM1) resistance in HER2-positive breast cancer. *Cancer science*, 3305–3315.

- Luis Manso, e. a. (2018). Late Administration of Trastuzumab Emtansine Might Lead to Loss of Chance for Better Outcome in Patients with HER2-Positive Metastatic Breast Cancer. *Breast Care*, 277–283.
- Martín Granados García, O. A. (2016). *Tratamiento del cáncer: oncología médica, quirúrgica y radioterapia*. México, D.F.: El manual moderno.
- Navarrete, S. (2017). Cáncer y cardiotoxicidad en la mujer. *Revista colombiana de cardiología*, 144-153.
- Octavio Zerecero Carreón, e. a. (2012). El receptor para el factor de crecimiento epidérmico y su relación con el cáncer. *Revista especializada en ciencias de la salud*, 15-25.
- OLIVER H. LOWRY, N. J. (1951). PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. *Department of Pharmacology, Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri* , 265-275.
- OMS. (2018, 10 17). OMS. Retrieved from OMS:
<http://www.who.int/topics/cancer/breastcancer/es/index1.html>
- Salud, M. d. (2018, 10 05). *Ministerio de la Salud* . Retrieved from Ministerio de la Salud :
<http://www.msal.gob.ar/ent/index.php/informacion-para-ciudadanos/cancer>
- SALUD, S. D. (2018, 10 24). *IMSS*. Retrieved from IMSS:
http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/232_IMSS_09_Ca_Mama_2oN/GRR_IMSS_232_09.pdf
- SergeyRyzhov, e. a. (2018). ErbB2 promotes endothelial phenotype of human left ventricular epicardial highly proliferative cells (eHiPC). *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 39-50.
- Society, A. C. (2018, 10 05). *American Cancer Society*. Retrieved from American Cancer Society:
<https://www.cancer.org/es/cancer/aspectos-basicos-sobre-el-cancer/que-es-el-cancer.html>
- Solange Moraes Sanches, J. M. (2010). Interacción entre Especialidades: Miocardiopatía Dilatada y Neoplasia de mama HER2 positiva. *Sociedad brasileña de cardiología*, e11-e15.
- Tania Lahera Sánchez, O. J. (2010). Epidermal growth factor receptor and its role in tumor development. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 172-180 .
- Velázquez, e. (2008). *Farmacología Básica y Clínica* . Madrid: Médica Panamericana.
- Yukinori Endo, e. a. (2018). T-DM1-resistant cells gain high invasive activity via EGFR and integrin cooperated pathways. *mAbs*, 1003-1017.

Zahra Mohammadi Abgarmi, e. a. (2018). Inhibition of Erbb2 by Trastuzumab Induces Oxidative Stress Markers in HER2 Positive Breast Cancer Cell Lines. *Journal of Research in Medical and Dental Sciences*, 158-165.

Vo.Bo Asesor Interno
M. en C. Francisco López Naranjo

Vo.Bo Asesor Externo
Dra. Margarita del Carmen Ramírez Ortega