
La fusión entre un anticuerpo anti-HER2 y C5adesArg aumenta su internalización y disminuye la fosforilación intracelular en células tumorales que sobreexpresan HER2.

Anilo Albornos-Loaiza¹, Tommy Marin-Jauregui², Ramón F. Montaña²
y Jaheli Fuenmayor²

¹Laboratorio de Biología Celular. Universidad del Zulia, Facultad Experimental de Ciencias, Maracaibo, Venezuela.

²Laboratorio de Patología Celular y Molecular. Centro de Medicina Experimental. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. Caracas, Venezuela.

Palabras clave: anticuerpo anti-HER2; microscopía de fluorescencia; fosfatasa PTEN; cáncer de mama; C5adesArg.

Resumen. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra HER2 han sido utilizados con fines terapéuticos por más de 20 años. En el presente trabajo se exploraron algunos de los mecanismos involucrados en la funcionalidad de células de la línea de cáncer de mama SKBR-3, que sobre-expresa HER2, tratadas con un anticuerpo recombinante anti-HER2 fusionado a la molécula C5adesArg. Para ello, se estudiaron la internalización del complejo anticuerpo/receptor, los niveles de fosforilación intracelular de tirosina y la expresión de la fosfatasa PTEN (del Inglés *Phosphatase and Tensin Homologue*, homólogo de tensina y fosfatasa), mediante la técnica de microscopía de fluorescencia. De acuerdo a los resultados obtenidos, la capacidad de unión del anticuerpo anti-HER2/C5adesArg pareciera ser mayor, lo que podría estar mediado por la carga catiónica de la molécula C5adesArg. Este incremento aparente no se asoció con un incremento concomitante de la fosforilación intracelular de tirosina, sugiriendo que la molécula C5adesArg pudiese interferir con la activación de rutas y mecanismos alternos de supervivencia/rescate celular, normalmente inducidos por el tratamiento con el anticuerpo sin fusionar. La tendencia a una expresión sostenida de PTEN en el contexto del tratamiento con anti-HER2/C5adesArg sugiere que la molécula C5adesArg pudiera contribuir a la inhibición de la fosforilación de tirosina desencadenada por el anticuerpo sin fusionar. Estas observaciones aportan evidencias para un mejor entendimiento de los mecanismos de muerte inducidos por anti-HER2/C5adesArg en esta línea celular.

The fusion of C5adesArg to an anti-HER2 antibody increases its internalization and reduces the antibody-induced tyrosine phosphorylation in a HER2-overexpressing cell line.

Invest Clin 2019; 60 (2): 117-127

Key words: anti-HER2 antibodies; fluorescence microscopy; PTEN; breast cancer; C5adesArg.

Abstract. Therapeutic antibodies against HER2, such as trastuzumab, have been used in the treatment of breast cancer for over 20 years. In this work, we explored some of the cellular mechanisms involved in the lethal effect of an anti-HER2/C5adesArg fusion antibody on a human breast cancer cell line that over-expresses HER2 (SKBR-3). To this end, the internalization of the HER2/Anti-HER2 complex, tyrosine phosphorylation levels, and PTEN (*Phosphatase and Tesein Homologue*) expression were measured using fluorescence microscopy. We observed an increased trend in the binding of the anti-HER2/C5adesArg antibody to the cell surface. Also, overall tyrosine phosphorylation levels appeared increased in cells treated with the non-fused version of the antibody, as opposed to what was observed in cells treated with the anti-HER2/C5adesArg version. Additionally, our results point to a diminished expression of PTEN in cells treated with the anti-HER2 (non-fused) antibody that did not occur in cells treated with anti-HER2/C5adesArg. Therefore, we presume that the anti-HER2/C5adesArg binding capacity is higher, which could be mediated by the cationic nature of the C5adesArg molecule. This increase does not seem to be associated to a concomitant increase in intracellular tyrosine phosphorylation, suggesting that C5adesArg could also interfere with the activation of survival/recue pathways triggered by the antibody alone. The observed sustained expression of PTEN could contribute to the inhibition of the intracellular phosphorylation induced by the antibody alone. These observations provide further evidence for a better understanding of the mechanisms involved in the lethality of anti-HER2/C5adesArg on this cell line.

Recibido 07-02-2018 Aceptado 05-04-2019

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama y otras neoplasias humanas son el resultado de diferentes alteraciones genéticas que involucran múltiples transformaciones, las cuales incluyen alteraciones secuenciales en la estructura o actividad de algunos de los genes que controlan los procesos de proliferación y diferenciación celular, llamados proto-oncogenes (activación) y en genes encargados de la reparación del ácido desoxirribonucleico (ADN), la diferenciación celular

y la apoptosis, denominados genes supresores de tumores (inactivación). Las alteraciones en cualquiera de estos dos tipos de genes pueden contribuir al desarrollo o progresión del fenotipo maligno (1). Tal es el caso del gen *HER2/erbB2/neu*, el cual codifica para el receptor de desarrollo epidérmico humano tipo 2 (HER2) y se encuentra sobre-expresado en aproximadamente el 30% de los casos de cáncer de mama humano. La sobreexpresión de este gen está relacionada con uno de los peores pronósticos y resultados clínicos (2).

Los anticuerpos monoclonales que hoy en día se utilizan en clínica deben su existencia a los avances en la ingeniería de anticuerpos recombinantes que se derivaron inicialmente a partir de la tecnología de hibridomas múridos y de una mejor comprensión de la naturaleza de la diversidad de anticuerpos (3). El uso de anticuerpos monoclonales dirigidos contra HER2 es uno de los enfoques más prometedores para la inhibición de cascadas de señalización iniciadas por este receptor, causando una disminución en la fosforilación de HER2 y una alta reducción en la actividad de las vías de transducción PI3K y Ras/MAPK, las cuales se encuentran a su vez reguladas por la fosfatasa PTEN (del Inglés Phosphatase and Tensin Homologue, homólogo de tensina y fosfatasa) (4).

Por su parte el C5a, un péptido soluble liberado después de la escisión proteolítica de C5 durante la activación de la cascada del complemento, es un potente quimioatrayente y activador de leucocitos polimorfonucleares (PMNs). C5a recluta PMNs hacia los sitios de inflamación y prolonga su supervivencia (5, 6). Una enzima carboxipeptidasa presente en el plasma sanguíneo humano elimina la arginina carboxi-terminal de C5a, convirtiéndolo en C5adesArg. El C5adesArg humano conserva la mayoría de las propiedades biológicas de C5a, pero en gran medida pierde su actividad espasmogénica / anafilática (7).

Fuenmayor y col. en el año 2010 (8) reportaron la fusión genética de C5adesArg a un anticuerpo recombinante anti-HER2. La proteína de fusión resultante exhibió la capacidad de enlazar y activar el receptor de C5a (C5aR), y de atraer células inmunitarias. Adicionalmente, este anticuerpo fusionado mostró una alta actividad anti-proliferativa y de inducción de muerte en células tumorales que sobreexpresan HER2 *in vitro*, a través de mecanismos que no han sido esclarecidos. Por lo expuesto, en el siguiente trabajo se exploraron algunos de los mecanismos involucrados en la funcionalidad de

células de cáncer de mama que sobreexpresan el receptor HER2 que fueron tratadas con el anticuerpo recombinante fusionado a C5adesArg. Los mecanismos de interés fueron la internalización del complejo HER2/Anti-HER2, los niveles de fosforilación intracelular en tirosina y la actividad de la fosfatasa PTEN.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivo celular y montaje: Se utilizaron células SKBR-3 (adenocarcinoma mamario de origen humano que sobre-expresa HER2), obtenidas comercialmente de la Colección Americana de Cultivos Tipo (*American Type Culture Collection ATCC*, EUA), las cuales se descongelaron y se cultivaron en condiciones de esterilidad, a 37°C en frascos de 25 cm² de superficie (T-25) en medio de cultivo McCoy's 5A (Gibco, EUA), suplementado con suero fetal bovino al 5% (SFB, Gibco), L-glutamina (250mM) (Sigma-Aldrich, EUA) y una mezcla de antibiótico-antimicótico al 1% (100 U/mL) (Gibco, EUA). Se creó una superficie de adherencia celular en láminas cubreobjetos previamente esterilizadas, para luego colocarlas en placas de cultivo de 6 pozos. Esto se hizo agregando 200 µL de Poli-D-Lisina 0,1mg/mL (Sigma, EUA) en cada lámina cubreobjeto e incubando durante 2 horas a temperatura ambiente. Se lavó 3 veces con tampón fosfato salino (PBS) y a cada lámina se le agregó la suspensión celular a razón de 1 x 10⁶ células por lámina y se incubó a 37°C y 5% de CO₂. Previo a la aplicación de los tratamientos, se retiró el medio suplementado y se adicionaron 1000 µL de medio McCoy's sin suplementar; para sincronizar el ciclo celular de las células adheridas en la lámina cubreobjeto, se dejó 1 hora a 37°C, se retiró el medio no suplementado y se adicionó de nuevo medio suplementado durante 12 horas para su recuperación.

Tratamiento con anticuerpos modificados: Las células previamente sincronizadas se trataron con anticuerpos recombinantes modificados (IgG3 humana anti-HER2

fusionada a C5adesArg e IgG3 humana anti-HER2 sin fusionar [8]), a una concentración de $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ durante 90 minutos. Transcurrido este tiempo se retiró el tratamiento, se lavaron 3 veces con PBS y se fijaron con gases de Formaldehído al 40% (Merck, Alemania).

Tinción por inmunofluorescencia (IF) y visualización de láminas al microscopio de epi-fluorescencia: Las láminas cubreobjeto con las células previamente fijadas se colocaron en cámara húmeda y se procedió a permeabilizar con triton X-100 (Sigma, EUA) al 0,1% por 5 minutos. Posterior al lavado con PBS, las láminas se bloquearon en una solución de albumina sérica bovina (BSA, Sigma, EUA) al 3% con Triton X-100 al 0,1% durante 60 minutos. Mientras, se realizaron diluciones de los anticuerpos primarios de marcaje (anti-P-tyr 4G10 hecho en ratón, 1:200; anti-PTEN producido en conejo, 1:200 y anti-IgG3 humana producida en ratón, 1:1000), todos de la casa comercial Cell Signaling (EUA). Transcurrido el tiempo de bloqueo, se retiró el excedente y se adicionaron $50 \mu\text{L}$ de las diluciones de anticuerpos primarios durante 60 minutos y se lavaron 3 veces con PBS. Se prepararon diluciones de los anticuerpos secundarios anti-conejo FITC (1:200) y anti-ratón PE (1:200), de la casa comercial Cell Signaling (EUA); se adicionaron $50 \mu\text{L}$ a las láminas cubreobjeto y se dejaron 60 minutos en oscuridad. A continuación, se lavaron 3 veces con PBS y se agregó medio de montaje con diamino-fenol-indol (DAPI), para colorear los núcleos. Posteriormente, se procedió a observar las láminas en un microscopio de Epi-fluorescencia Nikon Eclipse CI (Software NIS-Elements) y se preparó una galería de fotos con distintos filtros: azul ($\lambda_{\text{ex}}^{\circ} 420-495 \text{ nm}$), verde ($\lambda_{\text{ex}}^{\circ} 510-560 \text{ nm}$) y rojo ($\lambda_{\text{ex}}^{\circ} 590-650 \text{ nm}$) en cada tratamiento, tomando 5 campos, en cada uno de los cuales se encontraban al menos 10 células, para un total de 50 células analizadas por tratamiento.

Análisis de fotografías y organización de datos: El análisis de la galería de fotos

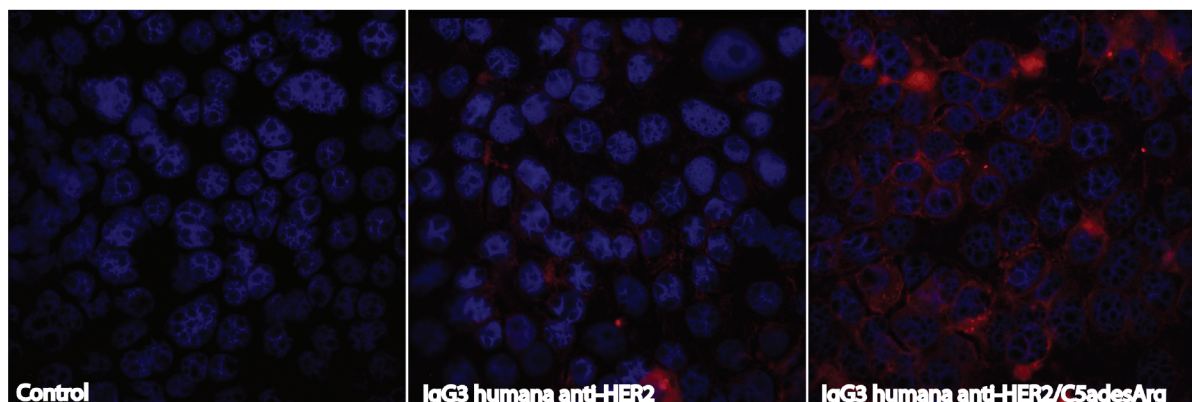
mencionada arriba, se realizó con el programa ImageJ (9), delimitando 3 zonas celulares: núcleo, citoplasma y membrana y tomando las siguientes medidas por píxeles: núcleo y citoplasma, 80 píxeles y membrana, 21 píxeles. Los datos obtenidos fueron trasladados al programa Prisma versión 6.0 de GraphPad (EUA), y se organizaron según las zonas celulares y los tratamientos. Se realizó una matriz con los datos obtenidos se promediaron las medidas de fluorescencia de cada zona por célula y se graficaron como un único valor para un total de 50 puntos por zona, cada uno de los cuales representó el valor de la fluorescencia para esa zona, de una célula en particular.

RESULTADOS

Internalización del anticuerpo anti-HER2/C5adesArg. En el ensayo mostrado en la Fig. 1, se evaluó la capacidad de internalización de los anticuerpos IgG3 humana anti-HER2/C5adesArg e IgG3 humana anti-HER2 sin fusionar. Se muestran los resultados obtenidos bajo la tinción de inmunofluorescencia. En la Fig. 1A se puede observar que en la imagen correspondiente al control de células sin tratamiento (CTR), solo se observa la tinción del núcleo con el marcador DAPI (color azul). En el tratamiento con la IgG3 humana anti-HER2 usada como referencia de internalización del anticuerpo, la señal resultó muy débil, probablemente debido a las bajas concentraciones de anticuerpo utilizadas. Concentraciones equivalentes de este anticuerpo evaluadas mediante la técnica de citometría de flujo mostraron un enlace evidente del anticuerpo a la superficie de las células SKBR-3 (datos no mostrados). Por otra parte, el tratamiento con la IgG3 humana anti-HER2/C5adesArg mostró una señal claramente visible tanto en la membrana como en el citoplasma de las células. La evaluación a tiempos menores de tratamiento no arrojó señal alguna en ninguno de los casos.

En la Fig. 1B se observa la cuantificación de la población celular analizada en

A



B

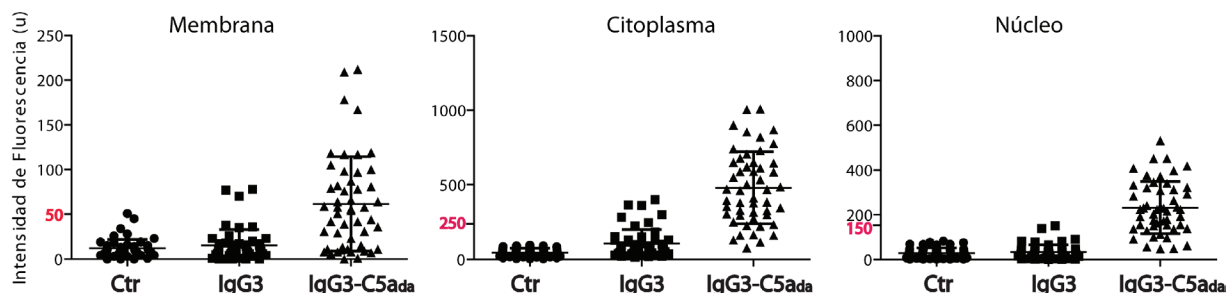


Fig. 1. Internalización de anticuerpos recombinantes Anti-HER2. 1A. Marcaje por Inmunofluorescencia, donde se visualiza la internalización del anticuerpo recombinante anti-HER2/C5adesArg, en células SKBR-3 (adenocarcinoma mamario de origen humano, con sobreexpresión del receptor HER2), en un tiempo de 90 minutos a una concentración de $1 \mu\text{g/mL}$. El tratamiento con un anticuerpo inespecífico del mismo isotipo resultó en una señal idéntica a la del control sin tratar. Aumento de 40X. 1B. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia encontrada en la región indicada para cada célula (50 células, $N=1$).

cada uno de los compartimientos celulares indicados: membrana, citoplasma y núcleo. El análisis de estos valores arrojó una tendencia diferencial entre la señal de anticuerpo obtenida para el cultivo de células tratadas con anti-HER2/C5adesArg y la intensidad de fluorescencia obtenida en el cultivo tratado con el mismo anticuerpo sin fusionar, tanto en la membrana celular como en el citoplasma y el núcleo. El tratamiento con el anticuerpo anti-HER2/C5adesArg mostró la mayor intensidad de fluorescencia.

Fosforilación intracelular en tirosina en células SKBR-3 tratadas con los anticuerpos recombinantes. De manera cualitativa, se pudo observar (Fig. 2A) que la fosforilación intracelular en tirosina de las

células tumorales SKBR-3 difirió al ser tratadas con el anticuerpos recombinante anti-HER2 o anti-HER2/C5adesArg. En la imagen correspondiente al control de células sin tratamiento (CTR) se observó que el estado basal de fosforilación intracelular en tirosina presenta una menor intensidad de fluorescencia que la observada al ser tratadas con el anticuerpo anti-HER2 sin fusionar. Por su parte, al tratar con el anticuerpo anti-HER2/C5adesArg, se observó un comportamiento similar al de las células sin tratamiento (CTR).

En la Fig. 2B, se observa la gráfica que sirvió para el análisis cuantitativo descriptivo de la población celular mostrada en la Fig. 2A. En la zona de la membrana se encontraron

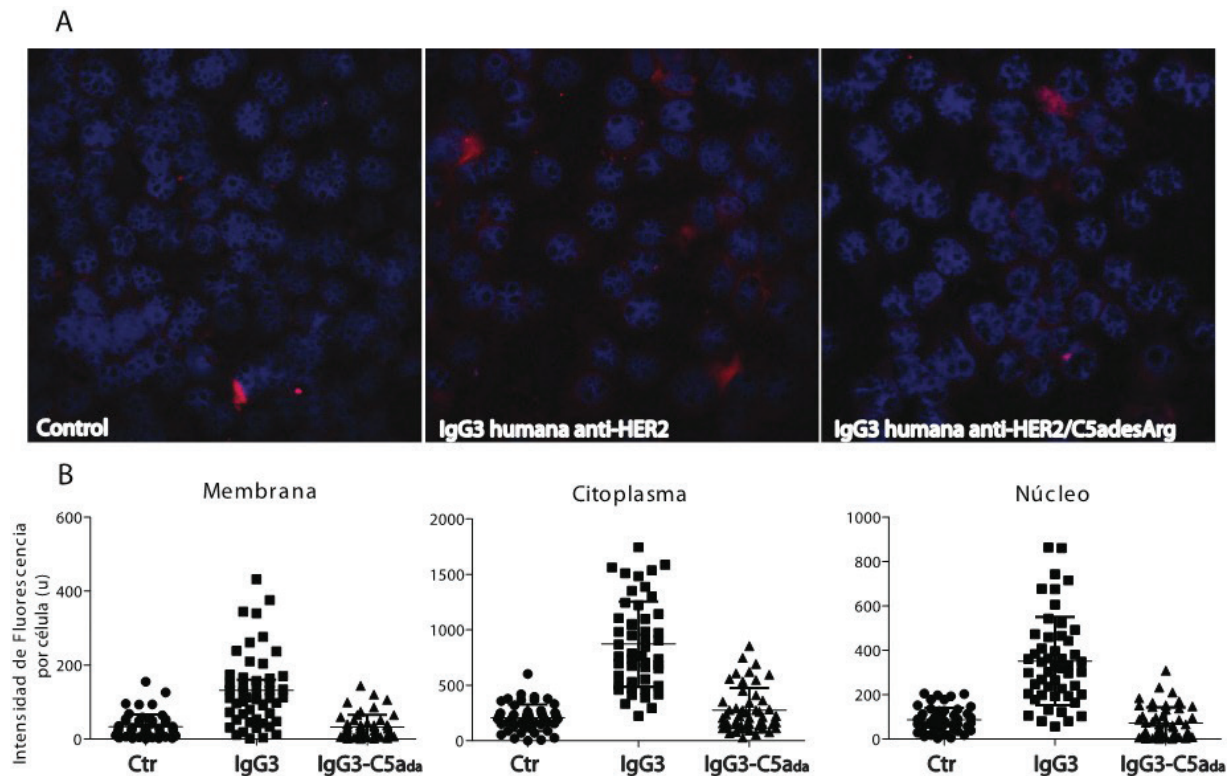


Fig. 2. Fosforilación intracelular en tirosina de células tumorales positivas para HER2 tratadas con anticuerpos recombinantes. 2A. Tinción por inmunofluorescencia del estado general de fosforilación intracelular en tirosina de células tumorales positivas para HER2 (SKBR-3), al ser tratadas durante 90 minutos con anticuerpos recombinantes dirigidos contra el receptor HER2. El tratamiento con un anticuerpo inespecífico del mismo isotipo resultó en una señal idéntica a la del control sin tratar. Aumento 40X. 2B. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia encontrada en la región indicada para cada célula (50 células, N=1).

diferencias entre la intensidad de la señal de fosforilación en tirosina obtenida al incubar en presencia de los anticuerpos anti-HER2 y el control, a diferencia de lo observado al comparar con el anticuerpo anti-HER2/C5adesArg. Igualmente, en la zona del citoplasma la incubación en presencia del anticuerpo anti-HER2 sin fusionar presenta altos niveles de fosfotirosina (pTyr), que se muestran diferentes a lo observado en las células tratadas con el anticuerpo anti-HER2/C5adesArg o en las células sin tratamiento (CTR). En el núcleo, las células tratadas con el anticuerpo anti-HER2 sin fusionar también presentaron un alto nivel de fosforilación en tirosina, a diferencia de lo observado en las células tratadas con el anticuerpo anti-HER2/C5adesArg y el control.

Niveles de expresión de la fosfatasa PTEN. En la imagen de los cultivos celulares del control (CTR) se muestra la intensidad de la señal de la fosfatasa en estado basal (color verde) como una señal bien definida en la periferia del citoplasma. Cualitativamente, las células tratadas con el anticuerpo anti-HER2 sin fusionar muestran una tendencia a disminuir la señal de la fosfatasa PTEN en comparación al control y a las tratadas con el anticuerpo anti-HER2/C5adesArg. Por su parte, el tratamiento con el anticuerpo anti-HER2/C5adesArg, a pesar de presentar una localización citoplasmática más difusa, muestra un comportamiento similar al control, como se muestra en la Fig. 3A.

Se puede observar en la Fig. 3B un análisis cuantitativo de los datos obtenidos de

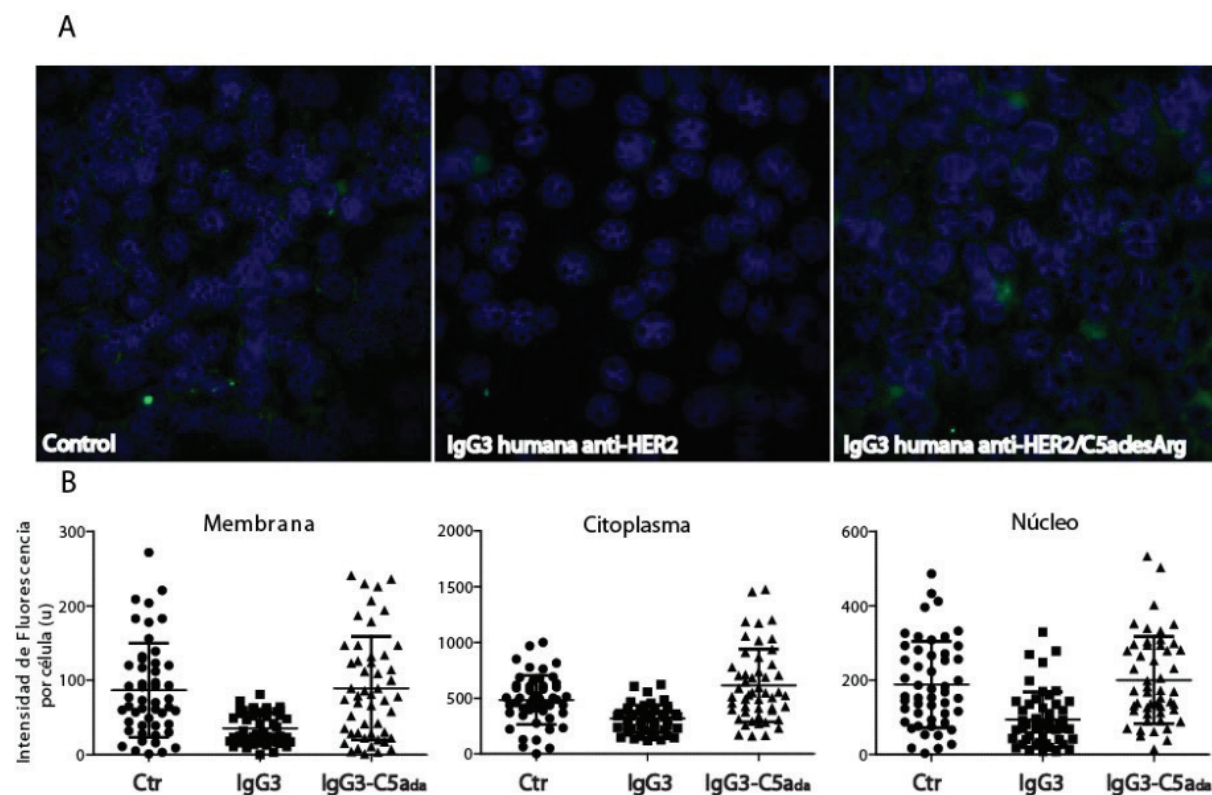


Fig. 3. Expresión de la fosfatasa PTEN. 3A. Tinción por inmunofluorescencia para determinar la expresión de la fosfatasa PTEN en células tumorales positivas para HER2 (SKBR-3), al ser tratadas durante 90 minutos con anticuerpos recombinantes modificados dirigidos contra el receptor HER2. El tratamiento con un anticuerpo inespecífico del mismo isotipo resultó en una señal idéntica a la del control sin tratar. Aumento de 40X. 3B. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia encontrada en la región indicada para cada célula (50 células, N=1).

la Fig. 3A. Las membranas de las células sin tratamiento (CTR) y de las tratadas con el anticuerpo anti-HER2/C5adesArg no mostraron tendencias significativas en cuanto a la intensidad de la señal para PTEN registrada por inmunofluorescencia, diferente a lo observado con el anticuerpo anti-HER2 sin fusionar, donde la señal parece menor. En la zona del citoplasma también se observó este comportamiento entre la intensidad de la señal de PTEN y el tratamiento con el anticuerpo anti-HER2/C5adesArg o las células sin tratamiento. El núcleo de las células tratadas con el anticuerpo anti-HER2/C5adesArg y el de las células sin tratamiento tampoco presentaron diferencias en cuanto a los niveles de expresión de PTEN, contra-

rio a lo observado al tratar las células con el anticuerpo anti-HER2 sin fusionar, donde la señal fue menor.

DISCUSIÓN

Con la idea de caracterizar la actividad biológica de posibles nuevas terapias contra células tumorales que sobreexpresan el antígeno HER2, en este trabajo se exploraron algunos de los mecanismos involucrados en la función de células de cáncer de mama SKBR-3 tratadas con anticuerpos recombinantes, tales como la internalización de los anticuerpos, los niveles de fosforilación intracelular en tirosina y la expresión de la fosfatasa PTEN.

La internalización mediada por receptores es un paso crucial en el suministro intracelular dirigido por agentes terapéuticos. Así, la eficacia de ciertas terapias basadas en anticuerpos, incluyendo la de anticuerpos conjugados, depende no solo de la afinidad y especificidad de unión al antígeno, sino también de la capacidad de internalización de los mismos. Por ejemplo, el efecto terapéutico de algunos agentes citotóxicos puede ser mejorado cuando estos se conjugan a un anticuerpo con un alto nivel de internalización, disminuyendo además los efectos secundarios no deseados (11). El trastuzumab, un anticuerpo monoclonal humanizado de uso clínico dirigido contra el receptor de tirosina quinasa HER2, no induce la endocitosis temprana del receptor HER2, mostrando que puede llegar a internalizarse, pero en períodos mayores a las 24 horas (12, 13).

Uno de los resultados más interesantes del presente trabajo es la internalización temprana del anticuerpo anti-HER2/C5adesArg, mostrándose que a los 90 min ya se detecta tanto en el citoplasma como en el núcleo. Los mecanismos mediante los cuales esta versión modificada del anticuerpo podría estar aumentando su internalización, no fueron abordados en este estudio. Sin embargo, es probable que la fusión a C5adesArg promueva una interacción más estable en la membrana y por ello una internalización más temprana en comparación a lo ya reportado para el anticuerpo humanizado trastuzumab y a lo observado para este mismo anticuerpo sin fusionar. Además, podemos sugerir que la molécula C5adesArg pudiera afectar positivamente el enlace del anticuerpo a la superficie celular, ya que en comparación con el anticuerpo recombinante anti-HER2 no fusionado usado en esta investigación, el anticuerpo fusionado pareció acumularse sobre la membrana de las células tumorales SKBR-3. El uso de péptidos o moléculas catiónicas, unidos a proteínas de este tipo, incrementa su endocitosis intracelular tanto *in vitro* como *in vivo* (14, 15), siendo esta una estrategia para provocar la internaliza-

ción temprana de este tipo de moléculas. También se ha observado que la carga neta positiva en péptidos como el C5adesArg, se correlaciona con una mayor eficiencia de internalización celular cuando se añaden a los cultivos celulares, mostrando una mayor adhesión a la superficie celular (15).

Por otra parte, las membranas de muchas células cancerosas contienen mucinas O-glicosiladas. Estas glicoproteínas crean una carga negativa adicional sobre la superficie de la célula cancerosa. Por lo tanto, no se descarta la posibilidad de que el mayor potencial negativo de la membrana de las células cancerosas, en comparación con el de las células no cancerosas, también contribuya a la actividad lítica selectiva de péptidos catiónicos como el C5adesArg (16). Otra explicación posible a las diferentes susceptibilidades de las células cancerosas a péptidos catiónicos, se basa en el número relativamente elevado de microvellosidades en las células tumorales en comparación con las células normales (17). Esto aumenta el área superficial de las membranas celulares tumorales y permite la unión de una mayor cantidad de péptidos. Es probable entonces que este anticuerpo modificado, que contiene un péptido con carga catiónica (C5adesArg), esté causando una interacción mucho más estable en la membrana, que le permita ser acumulado y por ende más frecuentemente internalizado y de esta manera se detecte con mayor intensidad en el citoplasma y el núcleo de las células tumorales. Una vez internalizado, el anticuerpo anti-HER2/C5adesArg podría interactuar tanto con su blanco terapéutico, el receptor HER2, como con membranas internas, interfiriendo con funciones biológicas importantes, lo que ayudaría a explicar su mayor letalidad celular y su capacidad de interferir con la fosforilación intracelular inducida por el tratamiento con anticuerpos.

Por su parte, la fosforilación intracelular está involucrada en diversas funciones tales como la activación de cascadas de señalización implicadas en la proliferación ce-

lular, la actividad enzimática, los procesos de rescate celular y la migración celular. La fosforilación de proteínas en residuos de tirosina constituye al menos un 0,01% de la fosforilación intracelular total, función en la que son partícipes algunas quinasas reguladoras del ciclo celular y otras familias de quinasas activadas por mitógenos (MAPK). La fosforilación en tirosina puede ser el indicador primario, o incluso exclusivo, de la transducción de señales en organismos multicelulares. Los receptores tirosina quinasa (RTKs), tales como HER2, participan en la señalización transmembrana, mientras que otras tirosina quinasas intracelulares participan en diversas señales dentro de la célula, incluyendo la transducción de señales al núcleo (18).

En nuestros resultados encontramos evidencias que sugieren que, aún a bajas concentraciones, el enlace del anticuerpo tiene un efecto importante sobre la célula tumoral, lo cual resulta particularmente interesante para el estudio de los posibles mecanismos de generación de resistencia a la terapia en lugares del tumor donde las concentraciones de anticuerpo pudieran estar limitadas. Por consiguiente, este incremento puede relacionarse entonces con una respuesta celular particular al tratamiento con el anticuerpo, que puede depender tanto de su especificidad como de las concentraciones empleadas. Este resultado no fue del todo inesperado, ya que otros anticuerpos terapéuticos son capaces de activar diversas cascadas intracelulares después de su enlace al receptor correspondiente. Por ejemplo, el tratamiento de células tumorales que sobreexpresan HER2 con el anticuerpo terapéutico trastuzumab favorece la activación de un bucle de retroalimentación que aumenta la producción de la proteína ADAM17, una proteasa que a su vez libera factores de crecimiento. Estos factores de crecimiento favorecen la formación de dímeros entre HER2 y otros miembros de la familia de receptores epidérmicos humanos, de tal manera que mantienen la activación de HER2 y la super-

vivencia celular, a través de la dimerización con EGFR, HER3, y HER4. Este bucle de retroalimentación puede estar entre las causas que permiten que células de cáncer de mama HER2-positivas se hagan resistentes a este tratamiento (19).

PTEN es una de las fosfatasa lipídicas encargadas de la desfosforilación de la vía PI3K iniciada por HER2, por lo que posee una función regulatoria de muchos procesos celulares iniciados por cascadas de fosforilación en tirosina, tales como: crecimiento, adhesión, migración, invasión y apoptosis. Es además uno de los supresores tumorales más frecuentemente mutados en cáncer (10). Adicionalmente, la expresión de PTEN suprime la migración de una variedad de tipos celulares, que incluyen fibroblastos humanos primarios, fibroblastos de ratón no transformados y células tumorales. La sobre-expresión de esta fosfatasa inhibe la migración celular, pudiendo esta inhibición ir acompañada de efectos transitorios sobre la adhesión y propagación celular, reduciéndose el número de contactos focales, contactos especializados que median la adhesión célula-sustrato, alterándose el citoesqueleto de actina (20). Nuestros resultados mostraron una tendencia a la disminución en la expresión de la fosfatasa PTEN en las células tratadas con el anticuerpo monoclonal humano anti-HER2 (sin fusionar), aún a concentraciones cuya unión a la membrana es prácticamente imperceptible con la técnica de microscopía de fluorescencia utilizada, lo cual refuerza el resultado obtenido para el estado de fosforilación intracelular en tirosina. Nuevamente surge entonces la interrogante sobre los posibles efectos de la exposición de células tumorales que sobreexpresan HER2 a bajas concentraciones de anticuerpos anti-HER2 sobre la expresión de PTEN no mutado y sus consecuencias en la migración de la célula tumoral y su proliferación.

En cuanto a la aparente ausencia del fenómeno de activación celular al tratar las células tumorales con el anticuerpo anti-HER2/C5adesarg, es posible que la molécula

C5adesarg pudiese interferir negativamente con el aumento de la fosforilación intracelular, evitando la activación de rutas y mecanismos como los ya mencionados. La falta de respuesta de fosforilación en tirosina al tratamiento con el anticuerpo fusionado a C5adesArg pudiera interpretarse también como una falla técnica; sin embargo, estas mismas células mostraron un incremento importante en los niveles de enlace a la membrana celular, lo que además puede contribuir a la mayor capacidad de internalización del anticuerpo. Por lo tanto, y tomando en cuenta su letalidad, consideramos que el tratamiento con el anticuerpo anti-HER2/C5adesArg (8) podría tener un efecto sobre la supervivencia de las células tumorales que es al menos en parte debido a su capacidad de inhibir cascadas de señalización concomitantes que se inician a partir del enlace de la porción variable del anticuerpo a HER2. Así, el efecto letal del anticuerpo no podría ser contrarrestado mediante la activación de cascadas alternativas cuando este se encuentre conjugado a la anafilatoxina. Esta capacidad inhibitoria podría también estar relacionada con los niveles incrementados de internalización observados con el anti-HER2/C5adesArg, el cual, una vez dentro de la célula, podría modificar funciones celulares importantes mediante mecanismos aún no descritos.

Con respecto a la expresión de PTEN en las células tratadas con anti-HER2/C5adesarg, se observó un comportamiento similar al de las células sin tratamiento (CTR) pero en presencia de una alta señal de enlace e internalización. Sin embargo, este comportamiento no implica que la célula no respondió, por lo que sería importante evaluar la actividad de esta proteína a periodos de tiempos mayores para corroborar su estatus intracelular. En cualquier caso, niveles de PTEN comparativamente más altos que los registrados para las células tratadas con el anticuerpo sin fusionar podrían promover la activación de vías de muerte celular como la apoptosis o la autofagia.

A pesar de que el trabajo posee la limitante de tratarse de un experimento exploratorio, muestra resultados inéditos, ya que este tipo de respuesta normalmente no se observa al tratar células tumorales con concentraciones tan bajas de anticuerpo. Hemos realizado ensayos similares con el anticuerpo terapéutico comercial trastuzumab (datos no mostrados), que requirieron una concentración 100 veces mayor para observar resultados positivos como los aquí encontrados. Esta experiencia también nos genera confianza respecto a la reproducibilidad de los resultados encontrados en el presente trabajo.

Por último, sería interesante evaluar los efectos de ambos tratamientos (anticuerpo fusionado y sin fusionar) sobre los mecanismos de rescate celular como la autofagia y sobre cascadas de señalización específicas asociadas a migración. Adicionalmente, sería importante evaluar el estado de fosforilación de HER2, PI3k y Akt y la actividad de PTEN, en respuesta a diferentes concentraciones del anticuerpo anti-HER2/C5adesArg y estudiar su posible relación con el desarrollo de resistencia al tratamiento con anticuerpos terapéuticos. Algunos de estos ensayos están siendo llevados a cabo en nuestro laboratorio.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue financiado por FONACIT proyecto No. 2012000808. Agradecemos al Servicio de Microscopía de Fluorescencia del Centro de Bioquímica y Biofísica (CBB) del IVIC, así como al Laboratorio de Cultivo Celular del CBB, IVIC.

REFERENCIAS

1. **Pich A, Margaria E, Chiusa L.** Oncogenes and male breast carcinoma: c-erbB-2 and p53 coexpression predicts a poor survival. *J Clin Oncol* 2000; 18: 2948-2956.
2. **Peng M, Ball S, Tyner A.** Protein tyrosine kinase 6 promotes ERBB2-induced mammary

- gland tumorigenesis in the mouse. *Cell Death Dis* 2015; 6:e1848. doi: 10.1038/cddis.2015.210
3. **Deonarain MP.** Recombinant antibodies for cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther* 2008; 8:1123-1141.
 4. **Neve R, Sutterluty H, Pullen N, Lane H, Daly J, Krek W, Hynes E.** Effects of oncogenic ErbB2 on G1 cell cycle regulators in breast tumour cells. *Oncogene* 2000; 19: 1647-1656.
 5. **Monk P, Barker M, Partridge L.** Multiple signaling pathways in the C5a-induced expression of adhesion receptor Mac-1. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1221:3239. doi: 10.1172/JCI117430
 6. **Perianayagam M, Balakrishnan V, King A, Pereira B, Jaber B.** C5a delays apoptosis of human neutrophils by a phosphatidylinositol 3-kinase-signaling pathway. *Kidney Int* 2002; 61:456-463.
 7. **Gerard C, Hugli T.** Identification of classical anaphylatoxin as the des-arg form of the c5a molecule: evidence of a modulator role for the oligosaccharide unit in human des-arg74. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1981; 78:1833-1837.
 8. **Fuenmayor J, Pérez K, Pérez D, Penichet M, Montaña R.** Decreased survival of human breast cancer cells expressing her2/neu on in vitro incubation with an anti-her2/neu antibody fused to c5a or c5adesarg. *Mol Cancer Ther* 2010; 9:2175-2185.
 9. **Abramoff M, Magalhães J, Ram J.** Image processing with ImageJ, *Ígitur Archief - Utrecht Publishing and Archiving Service.* (Citado: 27 de marzo de 2017) (disponible en: <http://www.temoa.info/es/node/321343>).
 10. **Torbett N, Moran L, Knight Z, Houk A, Moasser M, Weiss W, Stokoe D.** A chemical screen in diverse breast cancer cell lines reveals genetic enhancers and suppressors of sensitivity to PI3K isoform-selective inhibition. *Biochem J* 2004; 415: 97110. doi:10.1042/BJ20080639
 11. **Zhu W, Okollie B, Artemov D.** Controlled internalization of Her-2/neu receptors by cross-linking for targeted delivery. *Cancer Biol Ther* 2007; 6:1960-1966.
 12. **Longva K, Pedersen N, Haslekas C, Stang E, Madshus H.** Hereceptin-induced inhibition of ErbB2 signaling involves reduced phosphorylation of Akt but not endocytic down-regulation of ErbB2. *Int J Cancer* 2005; 116:359-367.
 13. **Austin C, Mazie're A, Pisacane P, Van Dijk S, Eigenbrot C, Sliwkowski M, Klumperman J.** Endocytosis and sorting of ErbB2 and the site of action of cancer therapeutics trastuzumab and geldanamycin. *Mol Biol Cell* 2004; 15:5268-5282.
 14. **Pardridge W, Buciak J, Yang J y Wu D.** Enhanced endocytosis in cultured human breast carcinoma cells and in vivo biodistribution in rats of a humanized monoclonal antibody after cationization of the protein. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 286:548-554.
 15. **Futami J, Kitazoe M, Maeda K, Nukui E, Sakaguchi E, Kosaka J, Miyazaki M.** Intracellular delivery of proteins into mammalian living cells by polyethylenimine-cationization. *J Biosci Bioeng* 2005; 99:95-103.
 16. **Papo N, Shai Y.** Host defense peptides as new weapons in cancer treatment. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62:784-790.
 17. **Zwaal R, Schroit A.** Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood* 1997; 89:1121-1132.
 18. **Levizki A, Grazit A.** Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. *Science* 1995; 267: 1782-1788.
 19. **Gijzen M, King P, Perera T, Parker P, Harris A, Larijani B, Kong, A.** HER2 phosphorylation is maintained by a PKB negative feedback loop in response to anti-HER2 hereceptin in breast cancer. *PLoS Biol* 2016; 14: e1002414.
 20. **Tamura M, Gu J, Matsumoto K, Aota S, Parsons R, Yamada K.** Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science* 1998; 280: 1614-1617.