

The background of the slide is a microscopic image of cells, likely cancer cells, stained with blue and orange dyes. The cells are irregular in shape and have long, thin projections extending from their surfaces. The overall color palette is dominated by shades of blue and teal, with some orange and yellow highlights on the cells. The image is overlaid with a pattern of semi-transparent hexagons of various sizes and colors (blue, green, orange).

DETECCION DE HER2 EN LINEA CELULAR MES-OV

Proyecto de grado para optar al título de Bacterióloga y laboratorista clínico



FUNDACIÓN UNIVERSITARIA
DE CIENCIAS DE LA SALUD
FUCS

Detección de HER2 en línea celular MES-OV de cáncer de ovario



Génesis Thalia Rumbo Campo

Asesoras externa:

Luz Dary Gutiérrez MSc. PhD (c)

Asesora Interna:

Ruth Mélida Sánchez MSc. PhD

**Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico**

CONTENIDO



INTRODUCCIÓN



PREGUNTA
PROBLEMA



OBJETIVOS



METODOLOGÍA



RESULTADOS Y
DISCUSIÓN



CONCLUSIONES Y
RECOMENDACIONES



Epidemiología

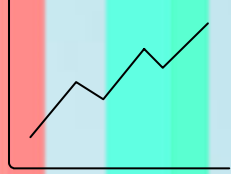
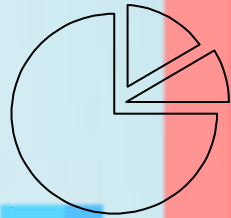
Séptima neoplasia maligna más común en las mujeres, la segunda de tipo ginecológica después del cáncer de cuello uterino. El CO abarca el 2.5% del total de las neoplasias que se presentan en mujeres, pero el 5% de las muertes por cáncer.

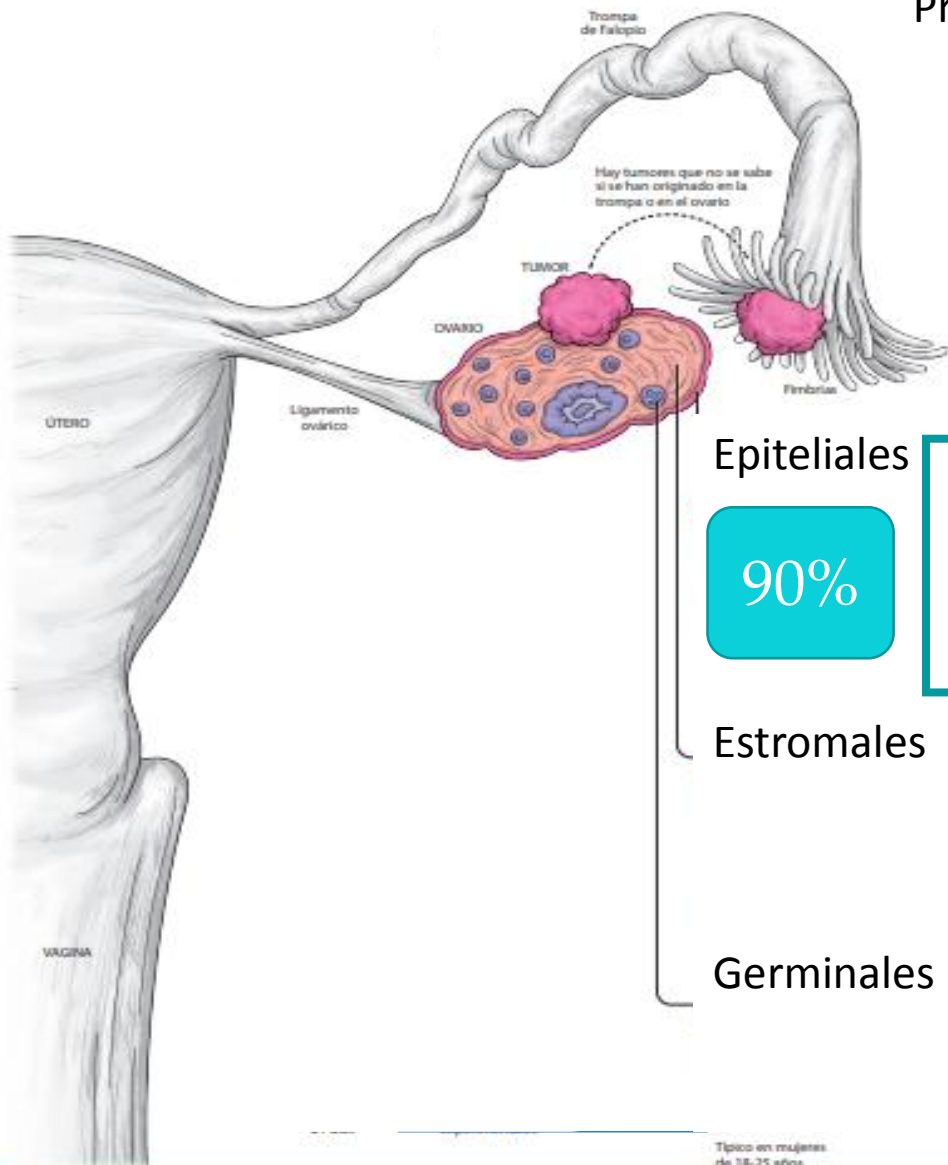


Colombia

Incidencia: 2.4%

Mortalidad: 2.7%





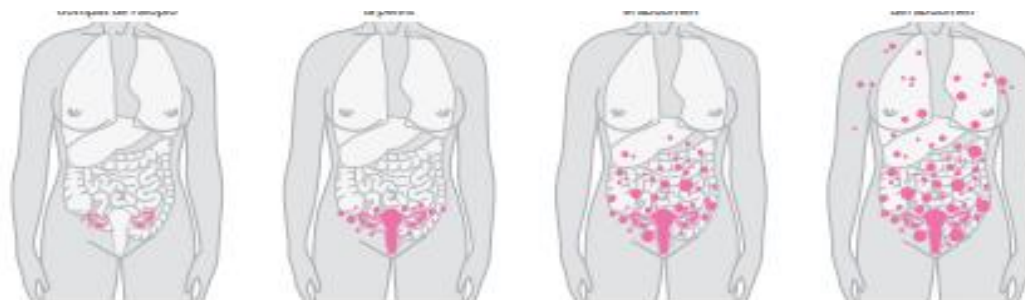
Pronóstico variable

Etapa I

Etapa II

Etapa III

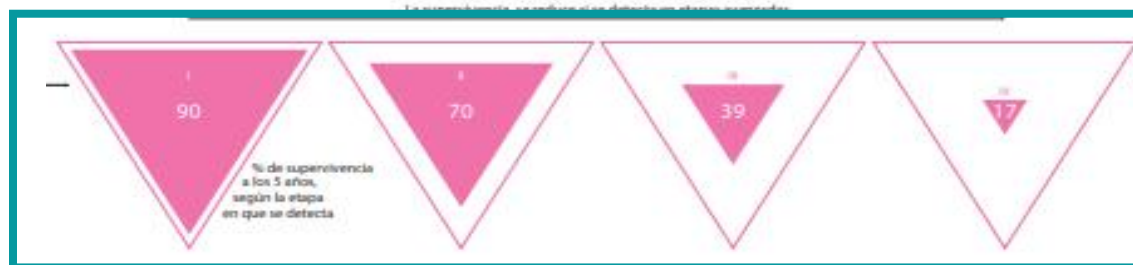
Etapa IV



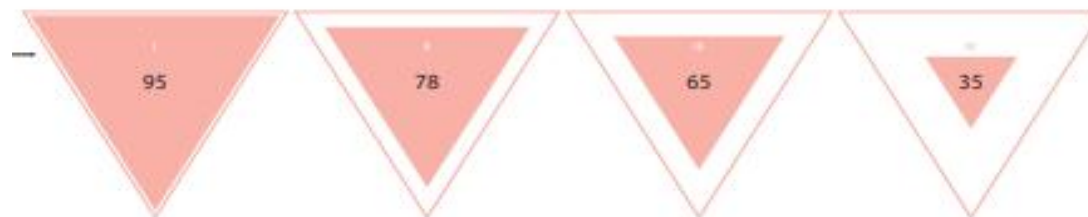
El CO suele ser asintomático en estadios tempranos

Epiteliales

90%



Estromales



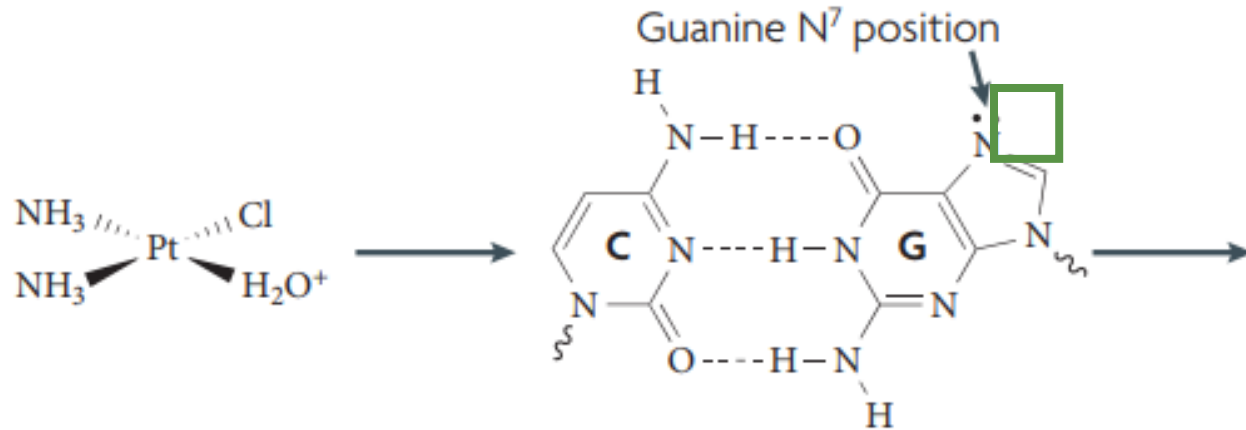
Geminales



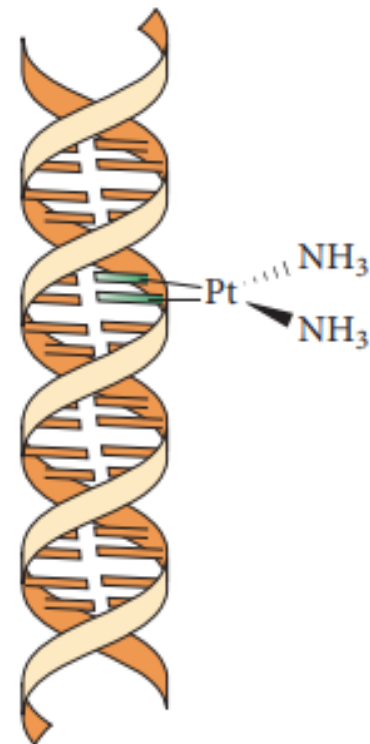
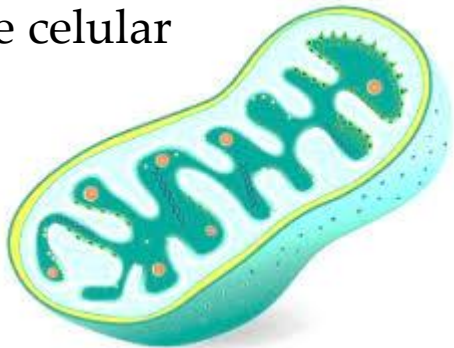
Típico en mujeres de 18-25 años.

Tratamiento

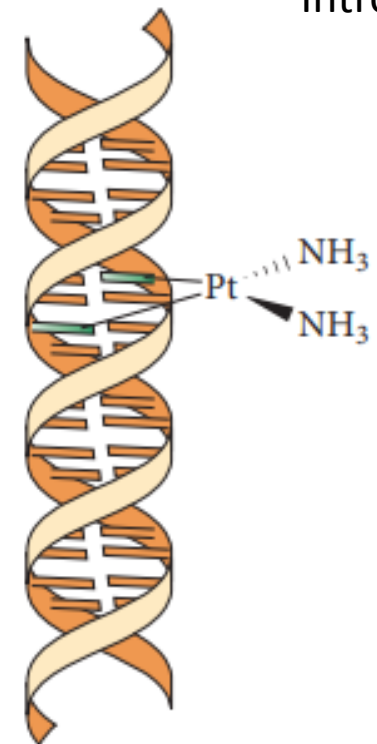
Mecanismos de acción



- ✓ Formación de aductos
- ✓ Daño mitocondrial
- ✓ Disminución de la actividad ATPasa
- ✓ Alteración de mecanismos de transporte celular



Major intrastrand crosslink



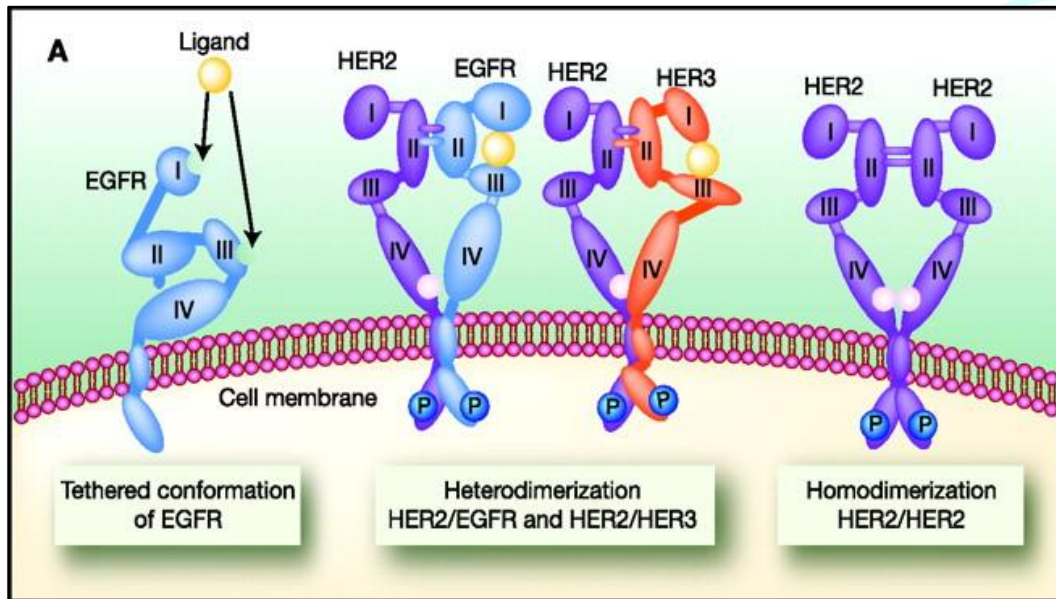
Minor interstrand crosslink

Mecanismos de resistencia

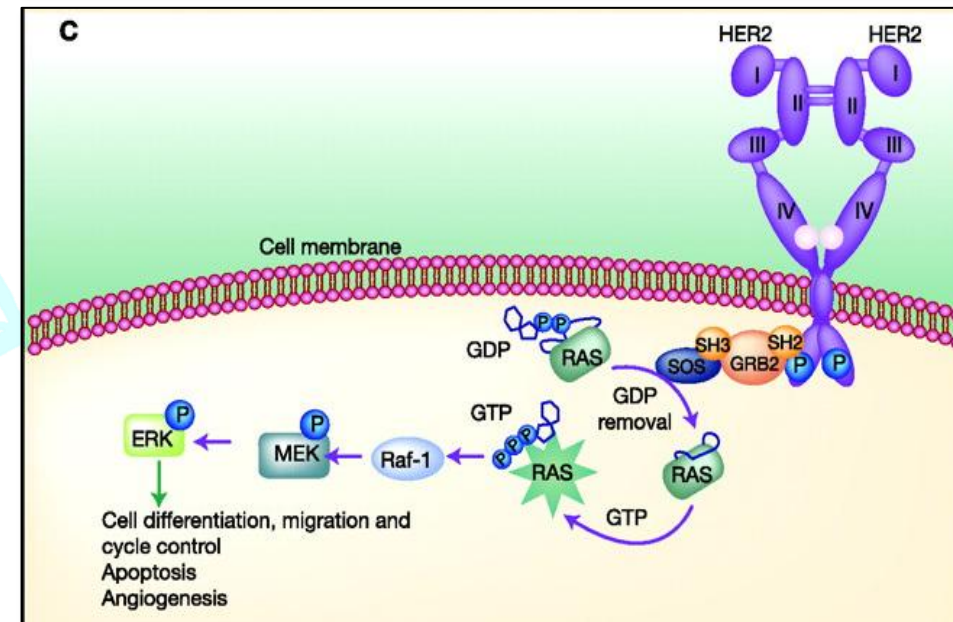
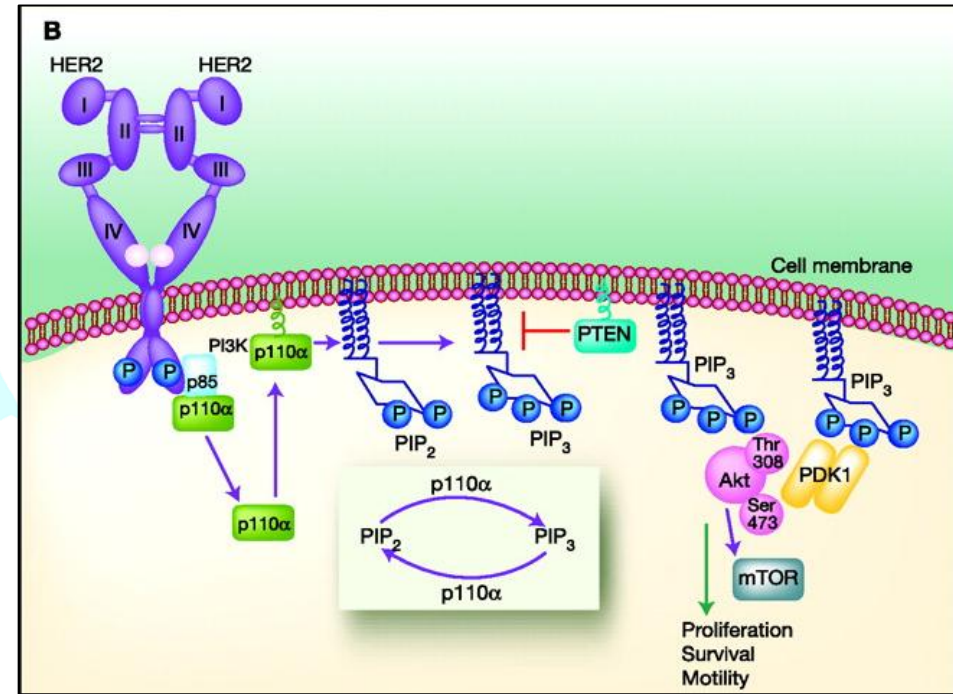
- Alteración en el flujo de salida del fármaco
- Alteración en proteínas intracelulares capaces de unirse y secuestrar el platino
- Expresión alterada de proteínas pro-supervivencia

Proteínas transmembranales

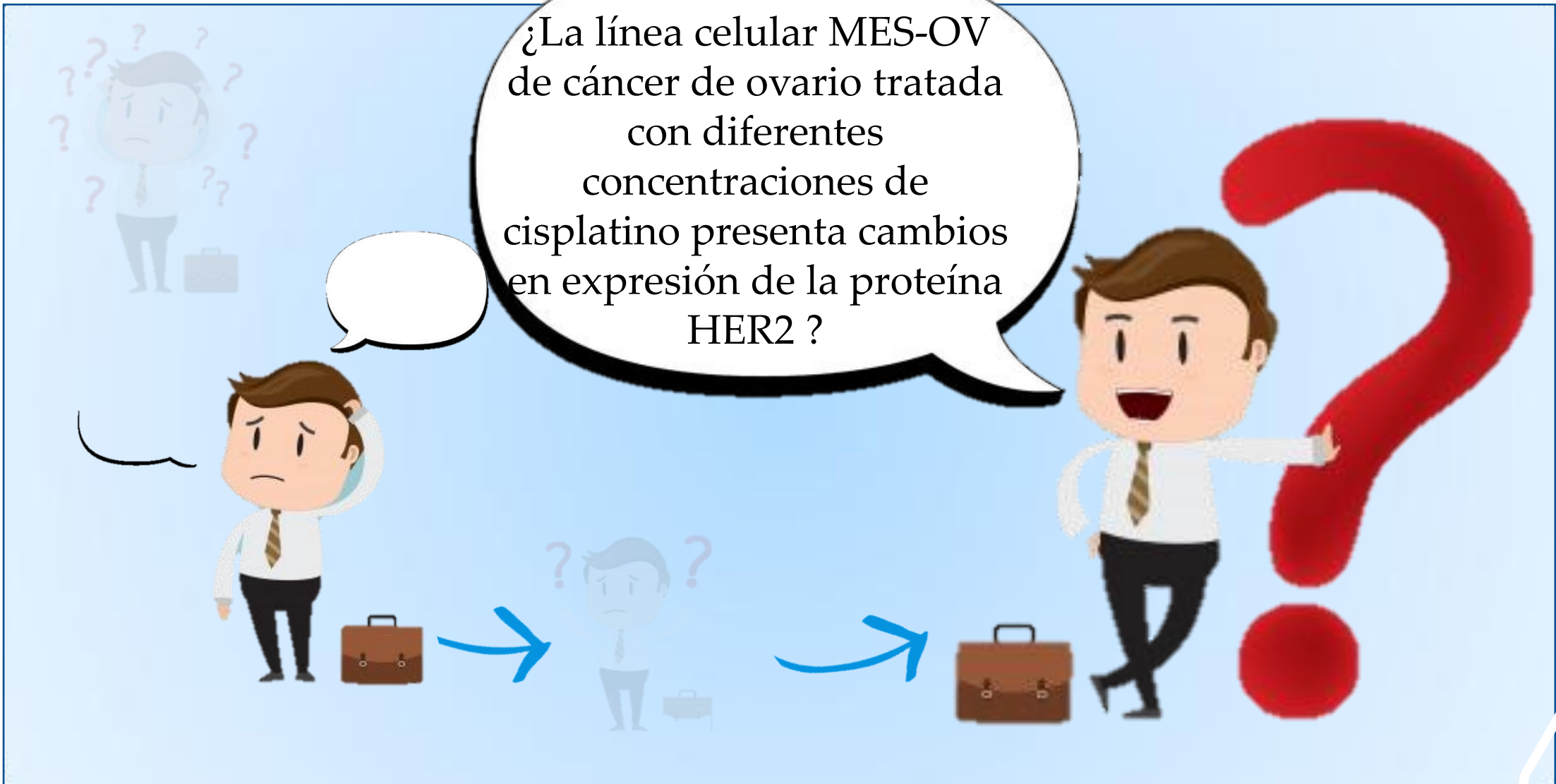
- ✓ Unión al ligando
- ✓ Dimerización
- ✓ Autofosforilación
- ✓ Transducción de señales



HER2 es una proteína oncogénica en cáncer de mama. Esta se ha visto sobre expresada en el 20% del CO pero no se han evaluado cambios en su expresión. Además, en la actualidad no se conoce si su sobreexpresión está implicada en mecanismos de resistencia.



¿La línea celular MES-OV de cáncer de ovario tratada con diferentes concentraciones de cisplatino presenta cambios en expresión de la proteína HER2 ?



Objetivos Específicos

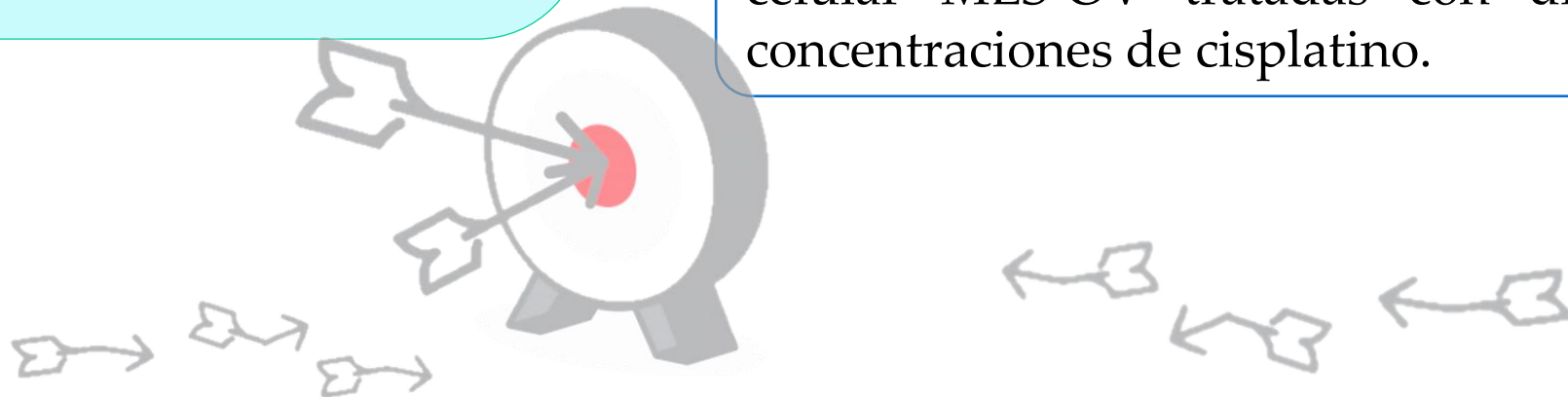
Objetivo General

Determinar la expresión de la proteína HER2 en la línea celular MES-OV de cáncer de ovario tratada con diferentes concentraciones de cisplatino.

Detectar la expresión de la proteína HER2 en la línea celular MES-OV.

Identificar cambios en la expresión del receptor HER2 en la línea celular MES-OV tratadas con diferentes concentraciones de cisplatino.

Evaluar cambios morfológicos en la línea celular MES-OV tratadas con diferentes concentraciones de cisplatino.

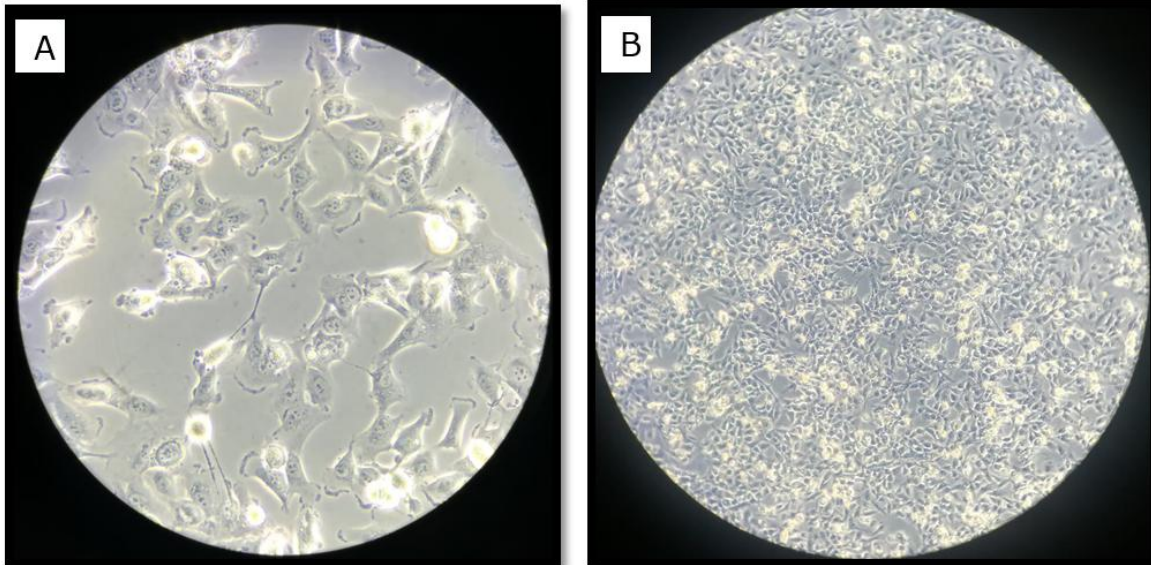


Diseño metodológico

Investigación de tipo experimental in vitro.

Muestra: Línea celular MES-OV de CO.

Hipótesis: El receptor HER2 se sobreexpresa en la línea celular MES-OV como un mecanismo de supervivencia celular frente al estrés ocasionado por un agente inductor de muerte celular.



Cultivo celular



Crio vial
Línea celular MES-OV
ATCC, conservadas en
Nitrógeno líquido

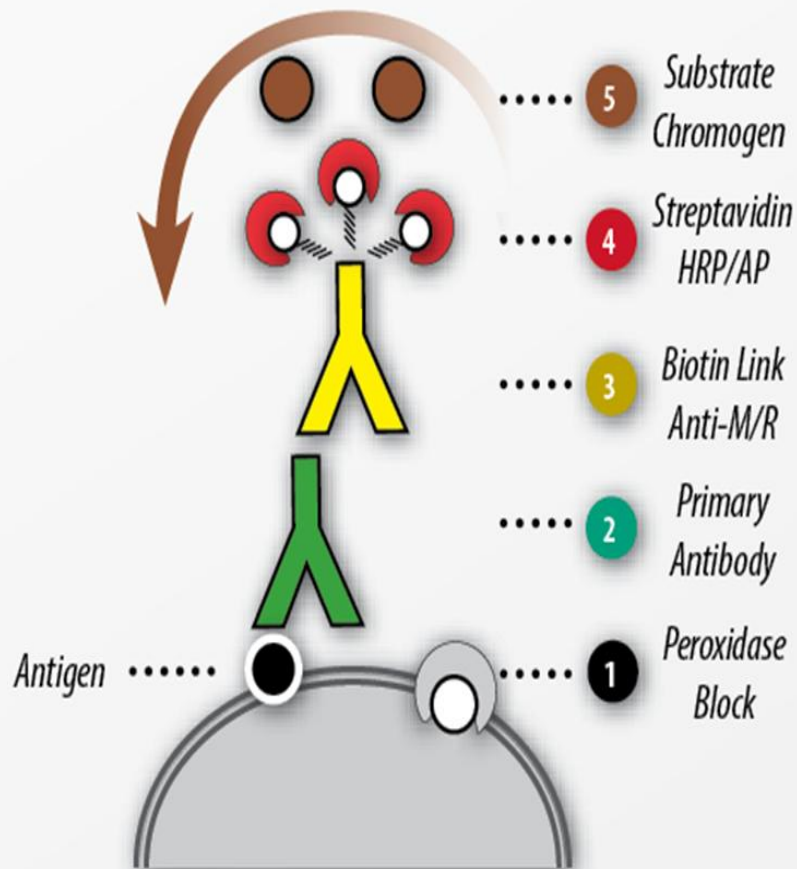
Crecimiento celular

- Cultivadas en medio Mc Coys suplementado con SFB (10%)
- Incubadas a 37°C y 5% CO₂
- Monitoreo con microscopio de luz invertido hasta hallar la confluencia deseada.

Desprendimiento celular

- Tripsinización para obtener células en suspensión.
- Conteo por medio del método de exclusión de azul de tripan en cámara de Neubauer.

Inmunocitoquímica



Above: Bio SB ImmunoDetector mechanism of action.

Cultivo

- Laminas cubreobjetos con campo de reacción

Tratamiento

- Diluciones seriadas a partir de un stock inicial de cisplatino

Bloqueo

- SFB 3% para bloquear uniones inespecíficas

Revelado con peróxido de hidrogeno = tinción marrón

Cromógeno diaminobencidina (DAB)

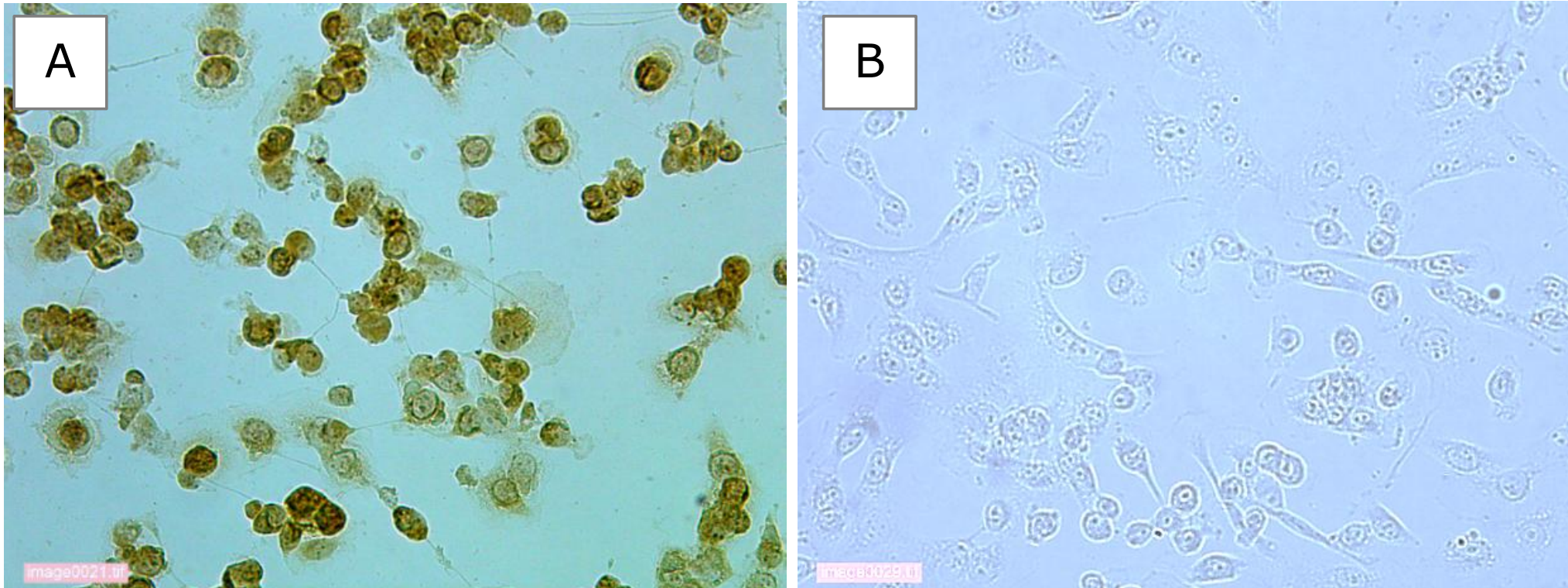
Anticuerpos

- Se añadió el anticuerpo monoclonal Anti HER2 y el anticuerpo secundario

Anticuerpo monoclonal de conejo Anti-ErbB2 Affibody® Molecule (HRP) abc31896
Dilución 1:1000

Detectar la expresión de la proteína HER2 en la línea celular MES-OV.

¿Las células MES-OV expresan HER2?



Expresión de HER2. (A) Expresión del receptor HER2 en células sin tratamiento, control basal; (B) control del anticuerpo secundario. Fotografías tomadas por el autor

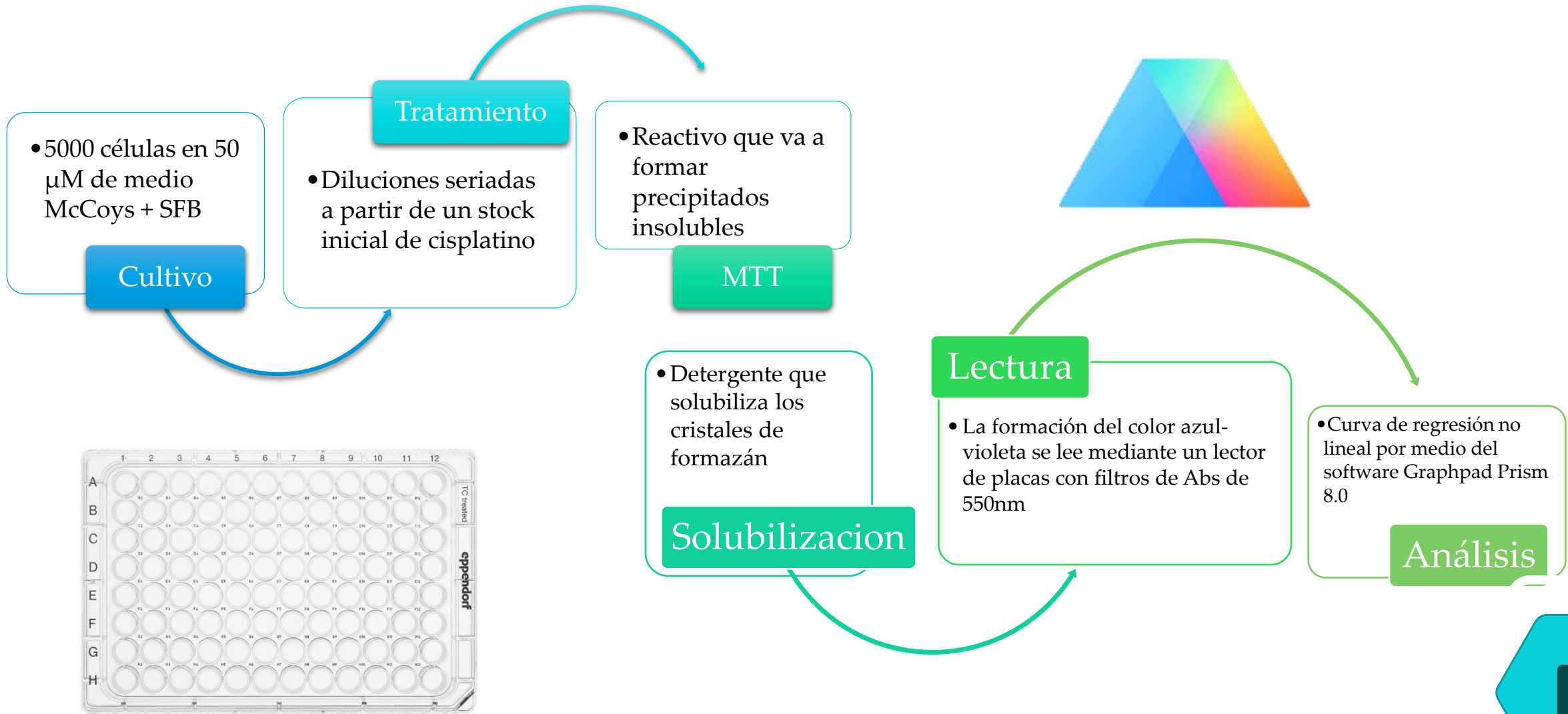
7

Ajani y cols. 2016..
línea celular

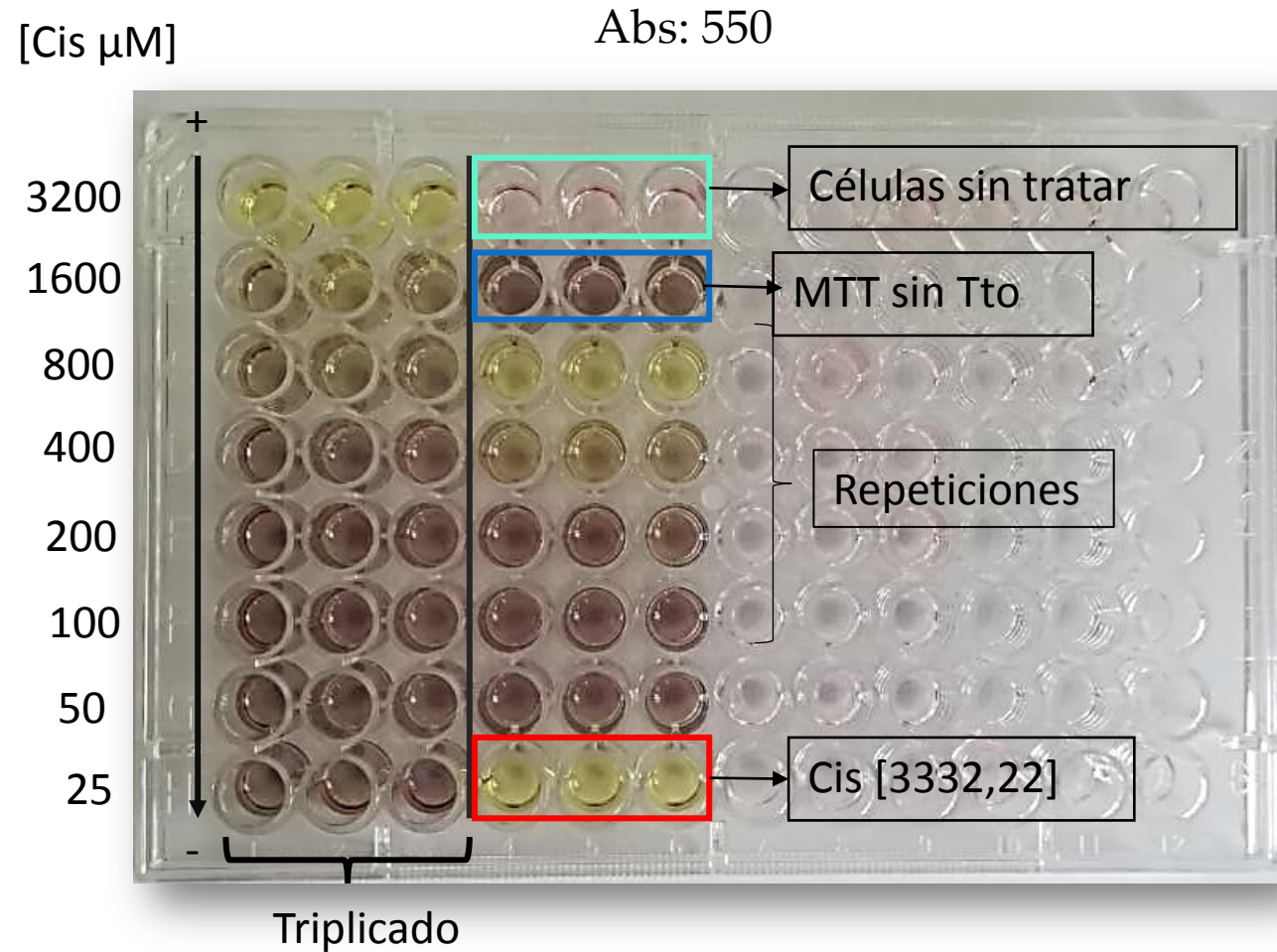
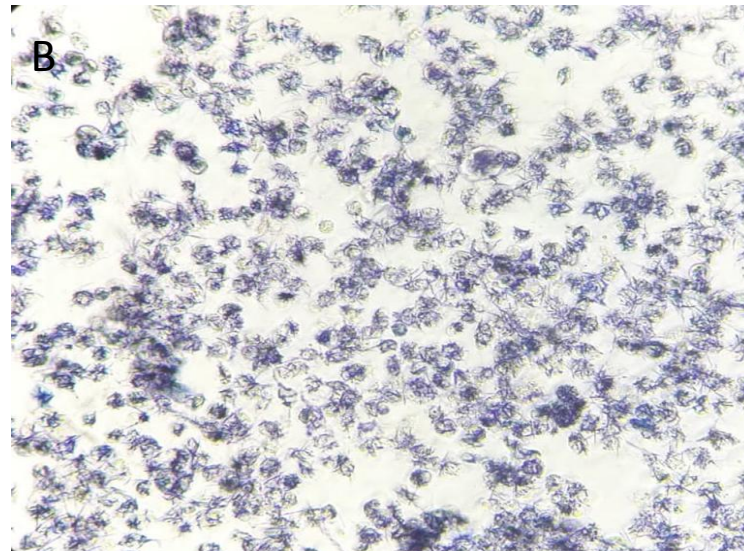
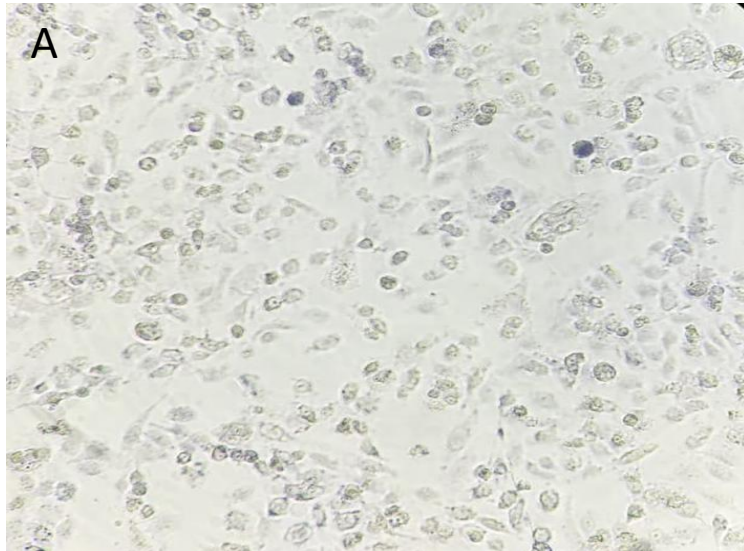
Expresión de HER-2 en 33 de 90 casos de CO por medio de IHQ en estadios avanzados.

No se ha encontrado expresión de HER2 en la línea celular

Ensayo de viabilidad celular

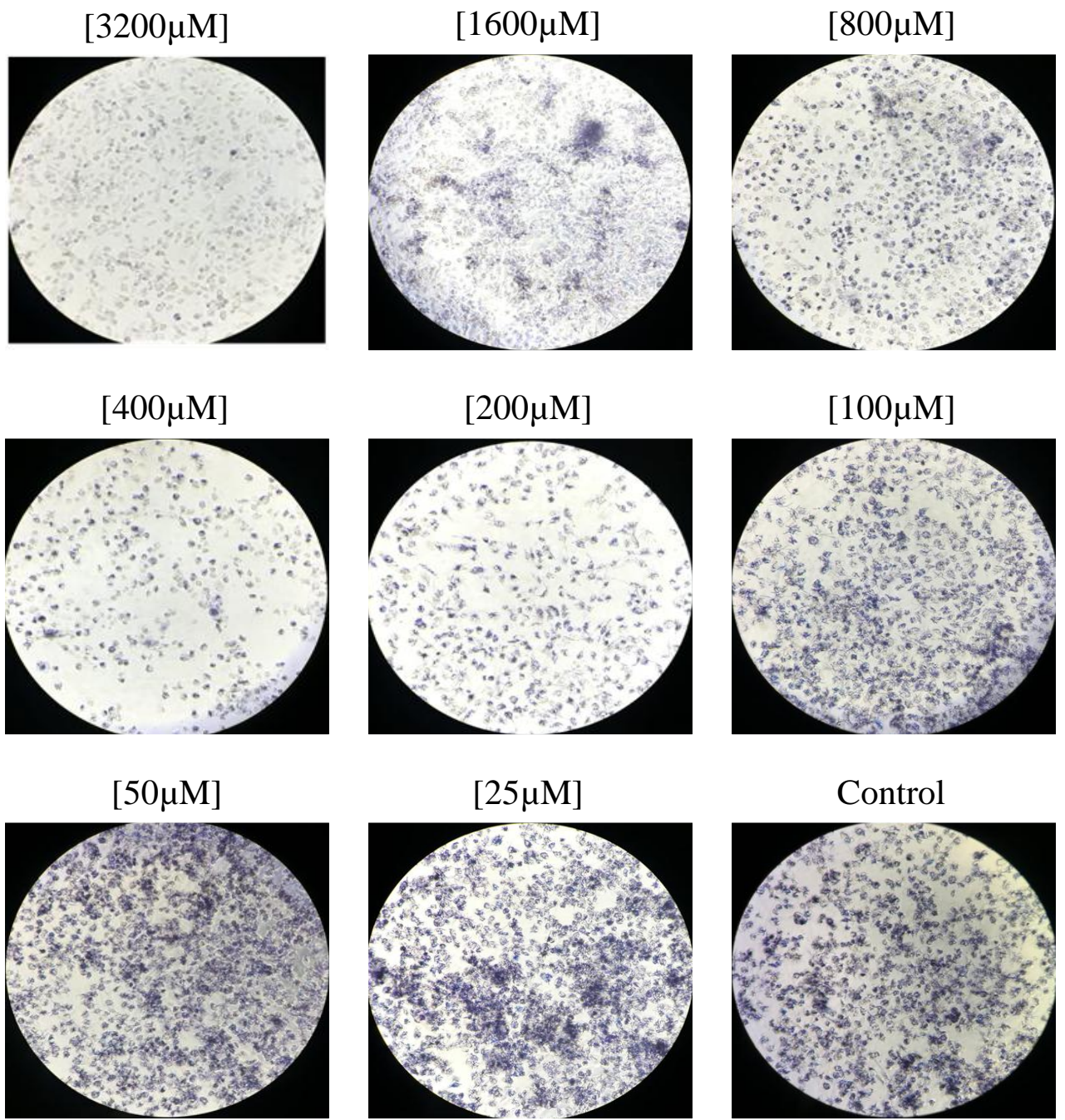


Viabilidad celular de la línea MES- OV con cisplatino



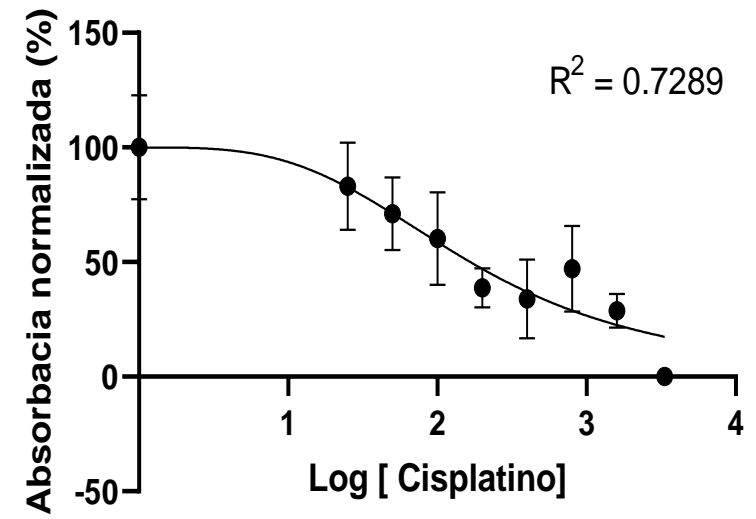
(A) Células MES OV no viables sin metabolización del tetrazolio; (B) Precipitado insoluble: Cristales de formazán

Cristales de formazán en las diferentes concentraciones.



Fotografías tomadas por el autor.

Inhibición Dosis-Respuesta



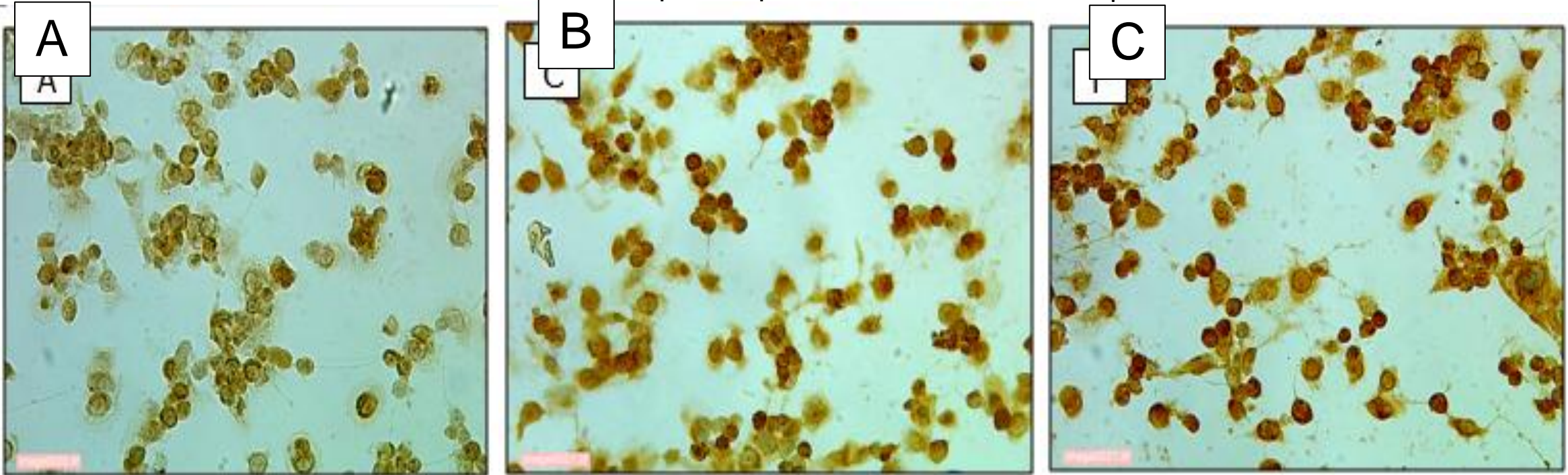
La actividad MTT es inversamente proporcional a la concentración del cisplatino.

↩ Germain y cols. 2010

Se ha evaluado en efecto del cisplatino en otras proteínas en la línea células SKOV-03. Sin embargo, la mayoría de los estudios muestran concentraciones desde 5.100µM

Identificar cambios en la expresión del receptor HER2 en la línea celular MES-OV tratadas con diferentes concentraciones de cisplatino.

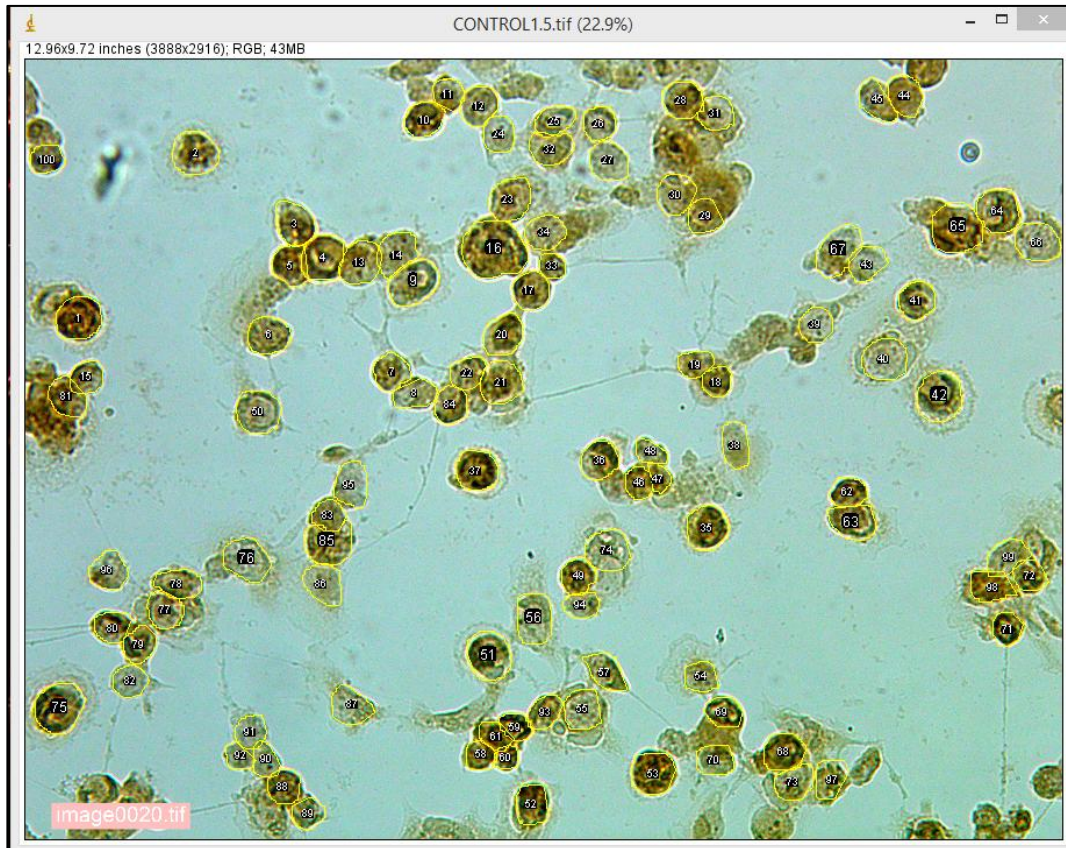
¿Las células tratadas con cisplatino presentas cambios en la expresión?



Expresión del receptor HER2 en diferentes concentraciones de cisplatino, (A) sin tratamiento, (B) 400 μ mol y (C) 1600 μ mol. Fotografías tomada por el autor

Determinación de intensidad en cruces

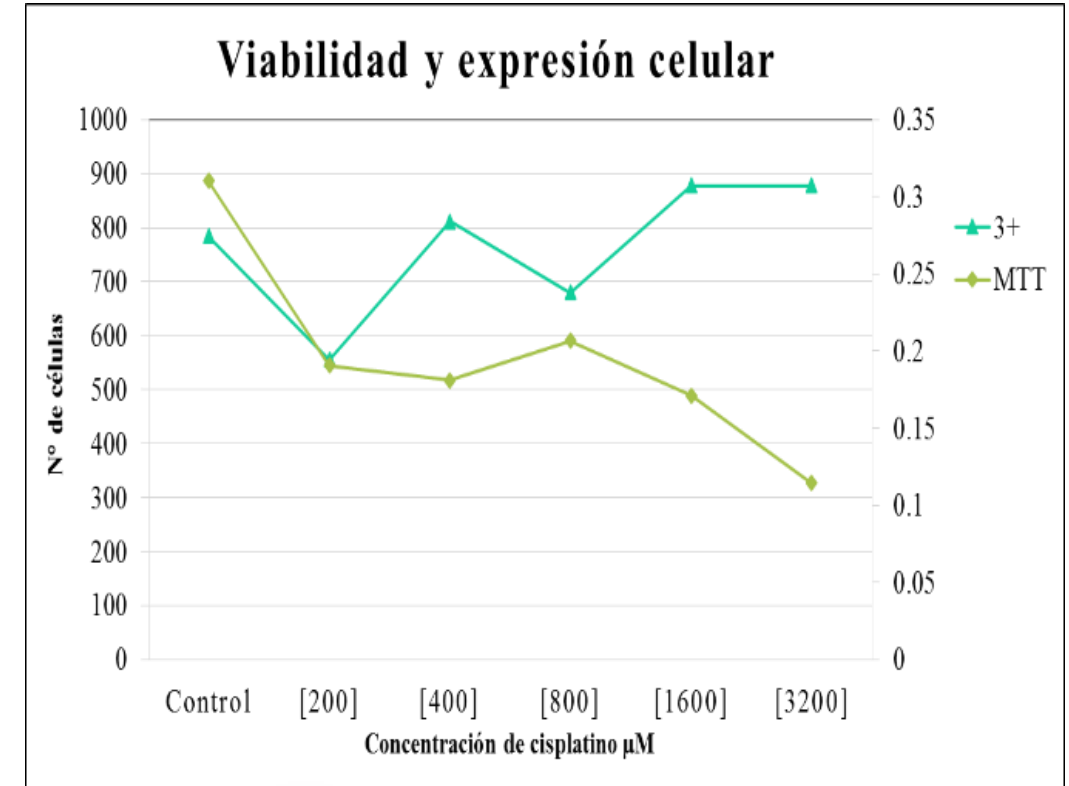
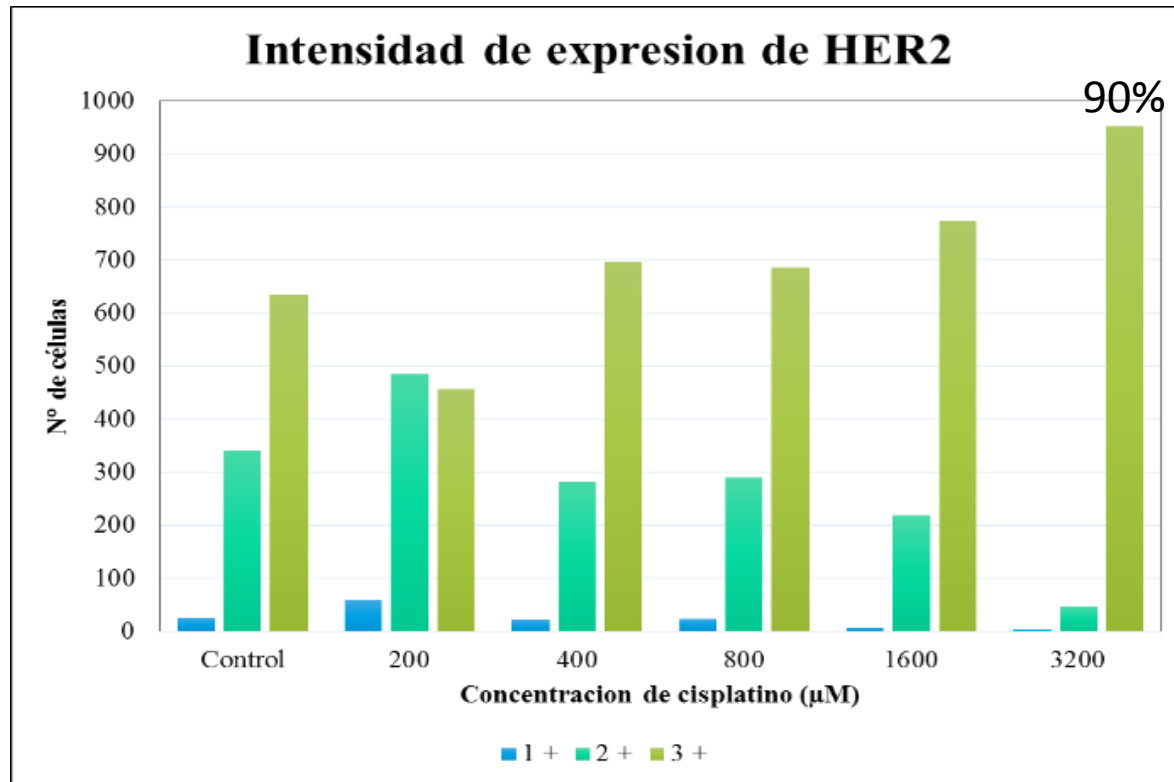
Image "J"



Puntuación	Patrón de tinción	Evaluación de la sobreexpresión de HER2	Inmunocitoquímica (HER2)
1+	Tinción débil/apenas perceptible con intensidad de inmunoreactividad desde 0-50% en las células tumorales	Negativo	
2+	Tinción completa con intensidad de inmunoreactividad del 50-75% en células tumorales	Positivo	
3+	Tinción fuerte con intensidad de inmunoreactividad del 75-100% en las células tumorales	Positivo	

Formula: $=100 - (100 * ((A2 - \text{MIN}(A\$1:A\$1001)) / (\text{MAX}(A\$2:A\$1001) - \text{MIN}(A\$3:A\$1001))))$

Comportamiento dosis dependiente en las células tratadas con diferentes concentraciones de cisplatino



4 Siddik, 2003

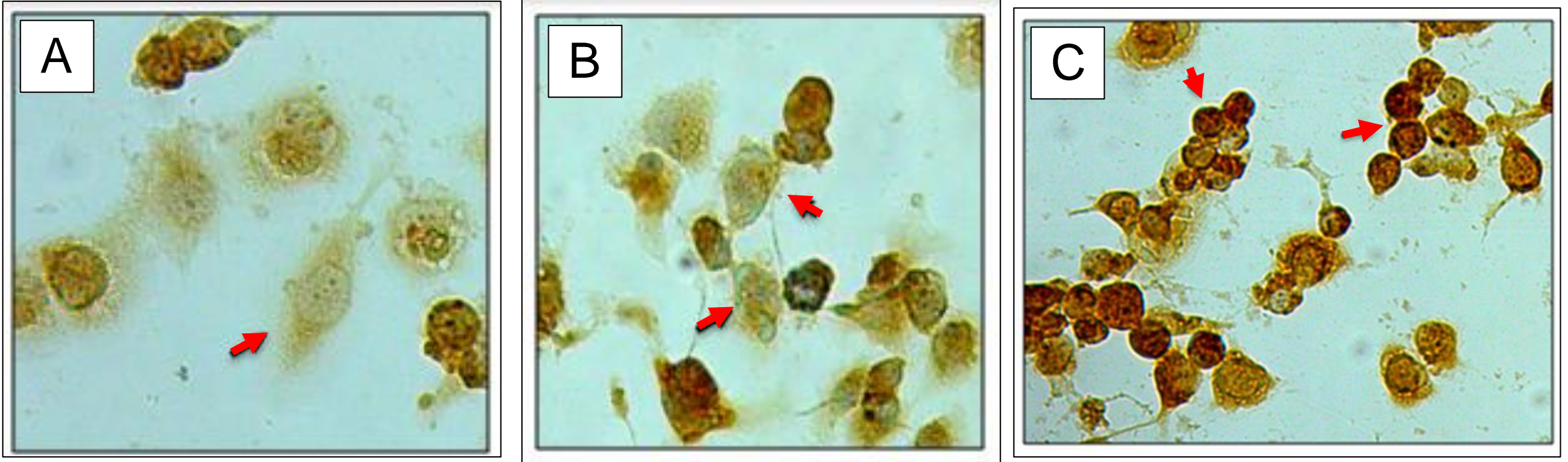
El cisplatino inhibe la supervivencia celular de acuerdo con el grado de expresión de HER2

3 Calikuso y cols. 2009

Células con alta expresión de HER-2 muestran resistencia al cisplatino.

Evaluar cambios morfológicos en la línea celular MES-OV tratadas con diferentes concentraciones de cisplatino.

¿El cisplatino induce cambios morfológicos en la línea celular MES-OV?



(A) Morfología normal, control; (B) vacuolas, 400 μ mol y (C), 3200 μ mol. Fotografías tomadas por el autor.

6 Moasser 2007

HER-2 induce transformacion celular como mayor actividad kinasa que aumenta la actividad celular y contribuye a la desregulacion de la polaridad y adhesion celular

7 Furrer y cols. 2018

Crecimiento aberrante mediado por la sobreexpresión de la proteína, estimulación prolongada

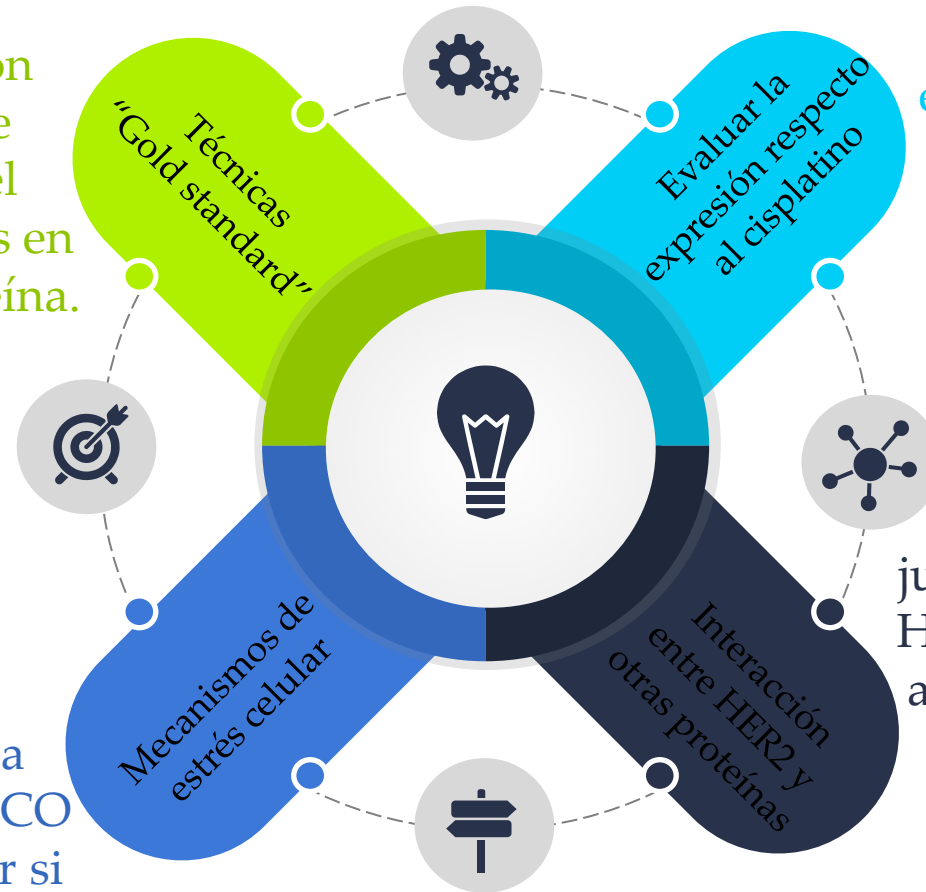
Conclusiones

- Se encontró que la línea celular MES-OV de ovario presenta expresión de la proteína HER2 de forma heterogénea, se observaron diferentes intensidades de inmunoreactividad.
- El cisplatino induce aumento de la expresión de HER2. Se observó que la variación de las concentraciones de cisplatino induce diferentes cambios en la inmunoreactividad que conllevan al posible aumento en la expresión de la proteína HER2.
- Las células presentaron cambios morfológicos en las diferentes concentraciones de cisplatino que se podrían atribuir a posibles mecanismos de apoptosis o supervivencia celular.

Recomendaciones

Corroborar resultados con técnicas más robustas que permitan confirmar que el cisplatino induce cambios en la expresión de esta proteína.

Analizar el comportamiento de la expresión celular de HER2 frente a otros neoplásicos utilizados en el CO como el carboplatino y comprobar si estos cambios son debidos al aumento en la expresión.



Disecionar mecanismos por los cuales el cisplatino podría inducir cambios en la expresión de la proteína HER2 y las vías de señalización que activa.

Evaluar la expresión de HER2 junto con la otras proteínas como HER3, el cual también se ha visto asociado con la sobreexpresión y el desarrollo tumoral.

Agradecimientos

“El aprendizaje es la experiencia, lo demás es información”
Albert Einstein



Gracias:

Patrocinado



FUNDACIÓN UNIVERSITARIA
DE CIENCIAS DE LA SALUD
FUCS



Referencias

1. Ajani M, Salami A, Awolude O, Oluwasola A, Akang E. The expression status of human epidermal growth factor receptor 2 in epithelial ovarian cancer in Ibadan, Nigeria. *South Afr J Gynaecol Oncol*. 7 de abril de 2016;8(1):9-13.
2. St Germain C, Niknejad N, Ma L, Garbuio K, Hai T, Dimitroulakos J. Cisplatin induces cytotoxicity through the mitogen-activated protein kinase pathways and activating transcription factor 3. *Neoplasia N Y N*. julio de 2010;12(7):527-38.
3. Calikusu Z, Yildirim Y, Akcali Z, Sakalli H, Bal N, Unal I, et al. The effect of HER2 expression on cisplatin-based chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer patients. *J Exp Clin Cancer Res [Internet]*. diciembre de 2009 [citado 1 de mayo de 2019];28(1). Disponible en: <https://jeccr.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-9966-28-97>
4. Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*. octubre de 2003;22(47):7265-79.
5. Moasser MM. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene*. octubre de 2007;26(45):6469-87.
6. Furrer D, Paquet C, Jacob S, Diorio C. The Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) as a Prognostic and Predictive Biomarker: Molecular Insights into HER2 Activation and Diagnostic Implications. En: Lemamy G-J, editor. *Cancer Prognosis [Internet]*. IntechOpen; 2018 [citado 7 de abril de 2019]. Disponible en: <https://www.intechopen.com/books/cancer-prognosis/the-human-epidermal-growth-factor-receptor-2-her2-as-a-prognostic-and-predictive-biomarker-molecular>