



*DETECCIÓN DE HER2 EN LA LÍNEA CELULAR MES-OV DE CÁNCER DE OVARIO*

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO

TRABAJO DE GRADO

BOGOTÁ D.C, 2019



*DETECCIÓN DE HER2 EN LA LÍNEA CELULAR MES-OV DE CÁNCER DE OVARIO*

AUTORA:

**GÉNESIS THALÍA RUMBO CAMPO**

**ASESOR INTERNO: RUTH MÉLIDA SÁNCHEZ MORA MDc PhD..**

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

**ASESOR EXTERNO: LUZ DARY GUTIÉRREZ CASTAÑEDA MSc PhD (Ca).**

Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO

TRABAJO DE GRADO

BOGOTÁ D.C, 2019

## DEDICATORIA

*Dedico esta tesis a mi Dios por sus bendiciones y por permitirme consolidar esta investigación.*

*A mi familia, por su amor, sacrificio y ejemplo. Por siempre estar a mi lado motivándome, escuchándome, apoyándome y dándome fuerza. Les agradezco por su comprensión, por enseñarme a superar metas, a ser fuerte, a valorar cada esfuerzo, a creer en mí y en las demás personas, por la educación que me han brindado y por cada cosa a lo largo de la vida que en consecuencia permitió cumplir este sueño.*

*A todos mis amigos, familiares, docentes, asesores y personas que estuvieron apoyándome durante este largo recorrido.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia por el apoyo, la paciencia, el esfuerzo en cada paso y a todas las personas que de una u otra manera me apoyaron y me colaboraron en la realización de esta investigación.

Agradezco a mis asesoras, Luz Dary Gutiérrez Castañeda y Ruth Mélida Sánchez Mora por ser acompañarme y apoyarme para sacar este estudio adelante, dedicación, y los conocimientos que me transmitieron, por su calidad a nivel personal y profesional.

De igual forma, expreso un agradecimiento a la Fundación de Ciencias de la Salud (FUCS) por permitirme el desarrollo experimental de este proyecto de investigación, especialmente al área de ciencias básicas.

Doy gracias a la Universidad Colegio Mayor de darme bases fuertes y sólidas en el desarrollo de la investigación; por el proceso de formación a nivel académico, personal y profesional.

Agradezco al semillero de biotecnología y genética, quienes siempre me incentivaron e impulsaron desde su cátedra a ser una estudiante integra, con retos, capaz, sin límites, a ir más allá y a ser excelente profesional de la salud e investigación.

## TABLA DE CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN .....	3
2	OBJETIVOS.....	5
2.1	Objetivo general .....	5
2.2	Objetivos específicos.....	5
3	ANTECEDENTES.....	6
4	MARCO TEÓRICO .....	8
4.1	Epidemiología del cáncer ovario .....	8
4.2	Cáncer de ovario.....	9
4.2.1	Definición de Cáncer.....	9
4.2.2	Carcinogénesis del CO .....	10
4.2.3	Clasificación del CO .....	13
4.2.4	Factores de riesgo.....	15
4.2.5	Factores preventivos.....	16
4.2.6	Diagnóstico.....	17
4.2.7	Tratamiento .....	18
4.3	Cisplatino.....	18
	Receptor HER2 .....	18
4.3.1	Estructura del receptor HER2 .....	19
4.3.2	Activación de HER2.....	20
4.3.3	Vías de señalización activadas por HER2.....	22
4.3.4	Alteraciones en el receptor HER-2.....	25
4.3.5	Papel en el desarrollo y tumoral.....	27
5	METODOLOGIA .....	29
5.1	Tipo de investigación.....	29
5.2	Población .....	29
5.3	Muestra .....	29
5.4	Hipótesis .....	29
5.5	Variables e indicadores.....	29
5.5.1	Variables.....	29
5.5.2	Indicadores .....	29

5.5.3	Criterios de Inclusión .....	29
5.5.4	Criterio de Exclusión.....	29
5.6	Materiales y Métodos .....	30
5.6.1	Cultivo celular .....	30
5.6.2	Viabilidad celular .....	31
5.6.3	Tratamiento con cisplatino.....	32
5.6.4	Inmunocitoquímica.....	33
5.6.5	Análisis estadístico.....	33
6	RESULTADOS .....	35
6.1	Viabilidad celular .....	35
6.2	Expresión de HER-2.....	35
6.3	Cambios morfológicos.....	38
7	DISCUSIÓN.....	40
8	CONCLUSIONES .....	44
9	RECOMENDACIONES .....	45
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	46
10	ANEXOS.....	46
10.1	Anexo 1: Protocolo de inmunocitoquímica .....	52
10.2	Anexo 2: Clasificación de acuerdo a expresión e intensidad.....	54

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Características del cáncer.....	10
Figura 2. Anatomía del ovario.....	11
Figura 3. Formación de quistes de inclusión.....	12
Figura 4. Relación mesotelio-fimbrias .....	13
Figura 5. Tipos de células del ovario .....	14
Figura 6. Estructura del gen ERBB2.....	19
Figura 7. Heterodimerización de HER2 con miembros de la familia EGF.....	21
Figura 8. Fosforilación del receptor. ....	22
Figura 9. Vías de señalización activadas por el receptor HER2 .....	23
Figura 10.Principales alteraciones en el receptor HER-2 .....	25
Figura 11. Morfología, Células MES-OV de cáncer de ovario.....	30
Figura 12. Se muestra ejemplo de la forma del análisis fotográfico en el software Image “J” (Versión libre). ....	34
Figura 13.Expresión de HER2. ....	35
Figura 14. El cisplatino induce formación de cristales en células MES-OV .....	36
Figura 15. Expresión de HER2 en diferentes concentraciones de cisplatino.....	37
Figura 16. Morfología celular .....	39



**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO**

***DETECCIÓN DE HER2 EN LA LÍNEA CELULAR MES-OV DE CÁNCER DE OVARIO***

### **RESUMEN**

El cáncer de ovario (CO) es la principal causa de muerte en mujeres, considerado la séptima neoplasia maligna más común, y a su vez, la segunda causa de neoplasias ginecológicas después del cáncer cérvico-uterino. Este afecta principalmente a mujeres entre los 50 y 75 años, presentándose mayor incidencia hacia los 63 años de edad, donde con frecuencia los signos y síntomas son inespecíficos; razón por lo cual, es diagnosticado en estadios tardíos (III - IV) donde se asocia a altas tasas de mortalidad. Actualmente, la terapia más utilizada en pacientes con estadios avanzados es el cisplatino, y aunque los tratamientos son efectivos, la resistencia a este antineoplásico se presenta en un gran porcentaje de mujeres (30%). Hoy por hoy, este cáncer presenta tasas de supervivencia a 5 años menores al 30%.

La sobreexpresión de la oncoproteína HER2, se ha visto asociada con evolución desfavorable en cáncer de mama; el cual se diferencia por ser un tumor más agresivo, con peor pronóstico y con

mayores tasas de recaída. Se ha reportado que es posible encontrarlo, aunque en menor medida, en el cáncer de ovario.

Se ha descrito que la célula tumoral genera resistencia a la quimioterapia, uno de los mecanismos a los que se ha atribuido este efecto es a cambios en la expresión de genes relacionados con la supervivencia. Por este motivo, el objetivo de este trabajo fue evaluar la expresión de la proteína HER2 en la línea celular MES-OV de cáncer de ovario tratadas con cisplatino. Para lo cual utilizamos la técnica de inmunocitoquímica, la que nos permitió encontrar la presencia de esta proteína; como también identificar cambios en la expresión de HER2 en las células tratadas con cisplatino. Los resultados mostraron que diferentes concentraciones de cisplatino inducen cambios en la expresión de la proteína en la línea celular MES-OV e induce cambios morfológicos.

**Palabras Claves:** Neoplasia, Cáncer de Ovario, línea celular MES-OV, receptor HER2, cisplatino, marcador tumoral, sobreexpresión, señalización celular.

## 1 INTRODUCCIÓN

El cáncer de ovario (CO) es la principal causa de muerte en mujeres, y la segunda causa de enfermedades ginecológicas después del cáncer cérvico-uterino. Según Ferlay y cols., en el año 2015, cerca de 240.000 mujeres fueron diagnosticadas con cáncer de ovario y aproximadamente 152.000 mueren cada año en el mundo (1). El riesgo promedio de desarrollar la enfermedad es de 1 por cada 75 mujeres y la posibilidad de morir a causa de la enfermedad de 1 en 100 (2), el CO se convierte en un ente crítico para la salud de las mujeres. Las altas cifras de mortalidad se deben en gran medida a la falta de síntomas específicos que impide la detección temprana y conlleva a un diagnóstico poco efectivo.

El CO presenta tasas de supervivencia a 5 años inferiores al 30%, lo que se debe en gran medida al diagnóstico en los estadios III y IV (70-80%) de la enfermedad, donde usualmente los tratamientos no logran controlar la progresión de la enfermedad (3). Actualmente se diferencia en tres tipos principales: carcinoma epitelial, tumores de células germinales y tumores del estroma (5). El CO de tipo epitelial, reportado en el 90% de los casos, afecta principalmente a mujeres post-menopáusicas cuya edad de aparición oscila entre los 50 y 75 años; sin embargo, se presenta mayor incidencia hacia los 63 años de edad (5,6).

Existen diferentes factores de riesgo asociados al desarrollo o prevención de este cáncer. Entre los que aumentan el riesgo se encuentran la mayoría de edad, la existencia de antecedentes familiares en cáncer de mamá o de ovario, y mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2. Por otro lado, los factores que disminuyen el riesgo son la nuliparidad y el uso de anticonceptivos orales son factores que disminuyen el riesgo (7).

Los marcadores tumorales usados actualmente en el diagnóstico, antígeno carbohidrato 125 (CA 125) y la proteína epididimal humana 4 (HE4), constituyen una herramienta útil para valorar el riesgo de aparición o recaída del cáncer epitelial de ovario; sin embargo, son de baja sensibilidad y especificidad (8). Lo anterior, hace necesario identificar biomarcadores que permitan un adecuado diagnóstico, y crea la necesidad de un abordaje multidisciplinario que permita

profundizar en el conocimiento para mejorar la calidad de vida de los pacientes por medio de tratamientos específicos.

La identificación de proteínas oncogénicas relacionadas con el desarrollo del cáncer ha sido de gran ayuda para realizar diagnósticos adecuados y tratamientos específicos lo que ha llevado a mejorar la sobrevivencia de los pacientes con cáncer. Hasta el momento las proteínas más utilizadas en la terapia dirigida son las que participan en vías de señalización que controlan diferentes mecanismos celulares. Sin embargo, en cáncer de ovario no se han identificados blancos moleculares específicos que puedan servir para hacer diagnóstico temprano y se puedan potencializar como moléculas de tratamiento (9).

La terapia dirigida se ha basado en la oncoproteína HER2, la cual se expresa en forma de receptor transmembranal proporcionándole las principales características a las células cancerígenas, como división acelerada, supervivencia y evasión del sistema apoptótico, entre otras. Este es usado como diana oncogénica y factor predictivo en el cáncer de mama, lo que ha impulsado al estudio enfocado en evaluar su presencia en otros cánceres como el cáncer de ovario (10).

En otros tipos de cáncer se ha detectado la sobreexpresión de esta proteína oncogénica, y esta puede ser usada como blanco molecular. Lo anterior permite postular la proteína HER2 como posible marcador de pronóstico en las pacientes con cáncer de ovario (11).

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

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 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.

### **2.2 Objetivos específicos**

- 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.

### 3 ANTECEDENTES

El estudio del cáncer se remonta desde épocas antiguas, palabra acuñada por primera vez por Hipócrates en la “teoría humoral”; posteriormente, Rudolf Virchow, el fundador de la patología celular, correlacionó la patología microscópica a la enfermedad por medio del estudio a tejidos sacados después de cirugía, lo cual fue un buen inicio en el estudio del cáncer y sobre todo en su diagnóstico. Los avances más significativos se han logrado en las últimas dos décadas, visto que los científicos se han centrado en la prevención, detección temprana y tratamiento de este (12).

En la actualidad, debido al incremento en la incidencia del cáncer a nivel mundial, la investigación está concentrada en identificar factores de riesgo, y blancos moleculares que permitan hacer un diagnóstico temprano y/o conocer el pronóstico de esta enfermedad. Dado a que el principal obstáculo ante su mitigación es la detección en estadios tardíos y que la terapia es poco efectiva.

El cáncer de ovario ocupa el séptimo lugar en las causas de muertes de mujeres por cáncer, la mayoría son diagnosticadas en los estados avanzados III y IV. Lo anterior lo clasifica como uno de los cánceres más letales, por lo que es necesario realizar estudios orientados a identificar características poblacionales, clínicas y moleculares para hacer un diagnóstico más preciso y conocer el pronóstico de las pacientes. Adicionalmente, esto permitiría orientar la terapia y controlar el progreso de la enfermedad (3).

En 1982, Padhy y cols. (13) identificaron por primera vez la proteína HER2 como una fosfoproteína de 185 Dalton que se sintetizaba en el neuroblastoma de ratón; posteriormente, un grupo de científicos en el Instituto de Tecnología de Massachusetts, Rockefeller y la Universidad de Harvard realizaron un estudio donde inducían tumores en roedores por medio de la transfección del oncogén *neu*, el cual se asociaba a la transformación celular. También, fue identificado como Neu o p185 y relacionado con el factor de crecimiento epidermal a partir de técnicas de Souther blot (12).

La sobreexpresión de HER-2 se ha asociado a mal pronóstico en CO desde 1990, cuando Berchuck y cols. (14), realizaron un análisis por medio de inmunohistoquímica a 75 tumores con diferentes grados de expresión de HER2-neu. Existen pruebas moleculares que son utilizadas en la detección de HER2, la inmunohistoquímica (IHQ), la hibridación fluorescente in situ (FISH) o la técnica de western blot, entre otras, que permiten estudiar más específicamente la expresión del gen ERBB2. En base a lo anterior, los científicos han desarrollado tratamientos específicos para el cáncer de mama HER2 positivo, los cuales consisten en un anticuerpo monoclonal (Trastuzumab®) que se une a los receptores HER2 de las células cancerígenas, evitando que estas reciban señales de crecimiento (15).

Estudios recientes han demostrado que el gen ERBB2 está implicado en la carcinogénesis de varios tipos de cáncer. La sobreexpresión de este gen produce una desregulación en la señalización de HER2 llevando a un aumento en la proliferación celular, invasión y metástasis. La expresión de HER2 se relaciona con mal pronóstico en pacientes de CO. Se ha propuesto que HER2 puede usarse como biomarcador predictivo de cáncer en paciente con cáncer de ovario (16,17). Sin embargo, no se ha evaluado si este aumenta la expresión en condiciones relacionadas con la exposición a quimioterapéuticos como el cisplatino.

## 4 MARCO TEÓRICO

### 4.1 Epidemiología del cáncer ovario

El cáncer de ovario es una de las principales causas de incidencia y mortalidad por cáncer en todo el mundo. Es también considerado como la séptima neoplasia maligna más común en las mujeres, y a su vez, la segunda de tipo ginecológica después del cáncer de cuello uterino (1–3). El CO abarca el 2.5% del total de las neoplasias que se presentan en mujeres, pero el 5% de las muertes por cáncer (18).

Cada año, aproximadamente 240.000 mujeres son diagnosticadas con CO, de las cuales cerca de 150.000 mueren debido a las bajas tasas de supervivencia, ya que estas no superan el 45%; y en gran medida son impulsadas por diagnósticos en etapa tardía (2). La enfermedad generalmente se presenta en etapas finales cuando la tasa de supervivencia relativa a 5 años es solo del 29%. Pocos casos (15%) se diagnostican con tumor localizado (etapa 1) cuando la tasa de supervivencia a 5 años es del 92% (2).

Se ha observado que las estadísticas del CO a escala mundial se comportan acorde al nivel socioeconómico de cada país (19). En los países desarrollados se ha observado una disminución en la incidencia y la mortalidad por CO de forma gradual desde 1990, cuyas tasas de incidencia ajustadas por edad son superiores a los 8 por 100.000 habitantes; mientras los países menos desarrollados con un crecimiento económico reciente y cambios en el estilo de vida han visto un aumento en las tasas de incidencia (5,8 por 100.000) y mortalidad (1).

En Colombia, el cáncer de ovario se comporta de acuerdo a las tasas internacionales (20). Según la Organización mundial de la Salud (OMS) es el cáncer ginecológico más mortal y la quinta causa de muerte por cáncer en el país. Se estima que aproximadamente el 70% de las mujeres diagnosticadas con CO tendrían una recurrencia, la cual tiene mayor probabilidad respecto al estadio de diagnóstico. Las mujeres que reciben diagnóstico de cáncer de ovario en fase III tienen un riesgo de recurrencia entre el 70-90%, la cifra se incrementa a 90-95% para las mujeres diagnosticadas en fase IV (5).

En Colombia, según el Ministerio de Salud y Protección Social y el Instituto Nacional de Cancerología, mueren aproximadamente 96 personas cada día a causa del cáncer como consecuencia de los múltiples factores que lo causan y aumentan su incidencia (21).

Según Mora (22), el cáncer de ovario es de gran interés en la población colombiana ya que se caracteriza por presentar altos porcentajes de mortalidad e incidencia; lo cual podría ser causa en gran medida al estado socioeconómico y el grado de escolaridad que determinan de cierta forma el conocimiento sobre la enfermedad.

Según el proyecto GLOBOCAN, se estima que para el año 2020 habrá un crecimiento elevado en las tasas del CO en Colombia, respecto al estudio realizado en el año 2012. Aproximadamente, la incidencia tendría un aumento del 26.6% reflejado en 1.820 casos nuevos y se estima que la mortalidad tenga un incremento de 31.4%, cerca de 1.160 mujeres. Este cambio demográfico afectaría en gran medida a las mujeres mayores de 65 años (21,23).

Teniendo en cuenta que la incidencia varía dependiendo el tipo de cáncer, se observa que el CO abarca un grupo heterogéneo de tumores malignos que varían principalmente en etiología y biología molecular (24). El CO epitelial es el subtipo patológico más predominante, abarca el 90% de los cánceres (2).

Según Plagens y cols. (19), el porcentaje de supervivencia del CO varía de acuerdo a la etapa en la cual se diagnostica y depende de la gravedad del mismo en el momento: “Ia - 89,9%, Ib - 84,7%, Ic - 80,0%, IIa - 69,9%, IIb - 63,7%, IIc - 66,5%, IIIa - 58,5%, IIIb - 39,3%, IIIc - 28,7%, y IV - 25%”. Además, es un factor importante en la alta tasa de mortalidad que se presenta en el CO, la cual se asocia fuertemente al diagnóstico tardío.

## **4.2 Cáncer de ovario**

### **4.2.1 Definición de Cáncer**

El cáncer se caracteriza por presentar diferentes cualidades que le permiten generar diversas enfermedades neoplásicas, la principal característica se basa en la capacidad de mantener la

proliferación celular activa. Lo anterior, por medio de la desregulación de vías de señalización que regulan el control del ciclo celular, le permite evadir los supresores de crecimiento y la apoptosis. Células normales se convierten en cancerígenas cuando adquieren dichas cualidades que permiten inestabilidad genómica y por ende la progresión del tumor; además, se convierte en una célula inmortal capaz de adquirir los nutrientes necesarios por medio de la angiogénesis e invadir otros órganos (25) (*Ver figura 1*).



*Figura 1. Características del cáncer.* Tomado de Hanahan y cols., 2011 (25)

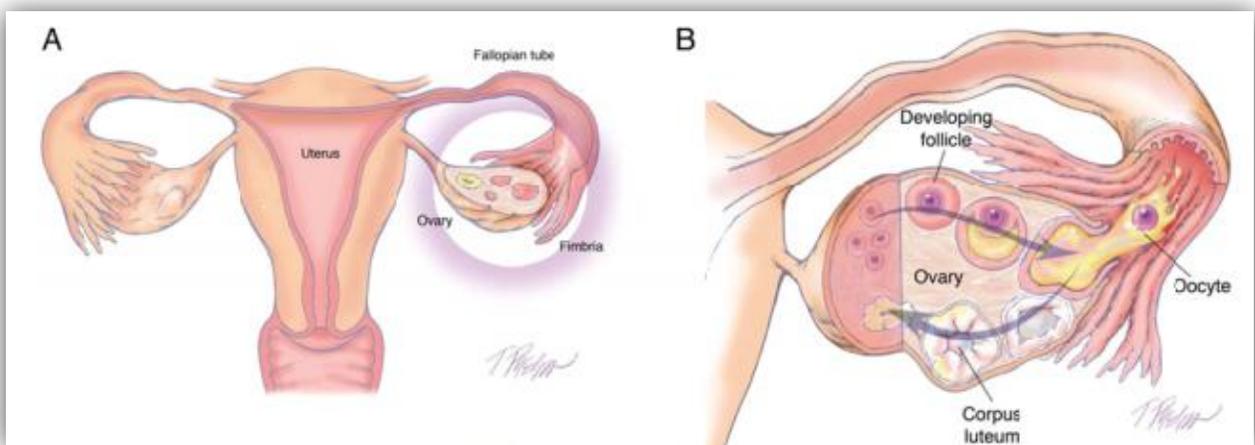
#### 4.2.2 Carcinogénesis del CO

El cáncer se caracteriza por ser multifactorial, la transformación del tejido normal a neoplásico se debe en gran medida a diferentes factores como la acumulación de variaciones genéticas o exposición a sustancias carcinógenas (26). Estas provocan la activación de oncogenes y la inactivación de genes supresores de tumor, los cuales son de gran importancia en el desarrollo normal de las células (27).

Aproximadamente, el 80% de los tumores de ovario son inicialmente benignos. Una de las razones que desencadena el desarrollo del CO es la división celular interrumpida y la continúa regeneración del epitelio del ovario en cada ovulación. Lo anterior, proporciona la oportunidad de

transformación maligna, como mutaciones o alteraciones, estimuladas por el microambiente tumoral (27).

Normalmente, las células epiteliales de la superficie del ovario son inactivas, presentan bajo porcentaje de proliferación. Durante la ovulación, ante la ruptura del folículo y la liberación del ovocito, dichas células proliferan rápidamente con el fin de reparar el daño y generar quistes de inclusión (*Ver figura 2*). La proliferación celular es altamente regulada por factores hormonales como estrógenos, andrógenos, hormona folículo estimulante y la hormona luteinizante (27).

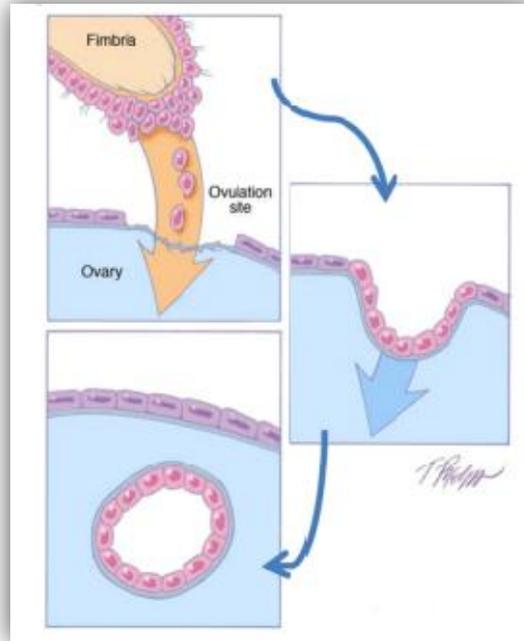


*Figura 2. Anatomía del ovario.* Tomado de Kurman y cols. 2010 (27)

La carcinogénesis de ovario se basa en la morfología del mismo, visto que el ovario está conformado por células epiteliales originadas en el epitelio mesodérmico. Sin embargo, diferentes tipos de CO derivan de epitelio característico de conductos mullerianos (27). Existen diferentes teorías implicadas en el desarrollo del CO, lo cual ocurre por medio de la transformación de una célula epitelial afectada en el proceso de ovulación (28). A continuación, se presentan las dos teorías principales:

- **Metaplasia del tejido superficial:** Se fundamenta en la transformación maligna del epitelio de superficie ovárico (mesotelio), el cual tras la invaginación al estroma subyacente forma quistes de inclusión. Ante la invaginación del mesotelio subyacente, el ovario forma quistes de inclusión cortical favoreciendo el microambiente que le permite transformarse en un tipo de epitelio

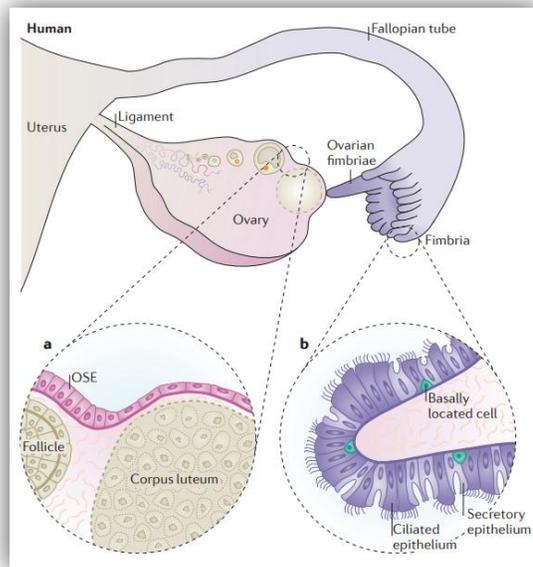
mulleriano; este epitelio puede sufrir una transformación maligna que resulta en los carcinomas características de las diferentes células del ovario, actuando como célula madre del cáncer (29) (Ver figura 3).



*Figura 3. Formación de quistes de inclusión. Tomado de Kurman y cols. 2010 (27)*

- Ovulación incesante: Esta teoría sugiere que la ovulación recurrente con ruptura y reparación repetidas del epitelio de la superficie ovárica (o exposición recurrente a fluido folicular rico en hormonas y citoquinas) aumenta la similitud del daño del ADN y la carcinogénesis (28). Por lo tanto, cuantas más ovulaciones experimenta una mujer en su vida, mayor es su riesgo de desarrollar cáncer de ovario.

Este se deriva de implantación de células malignas de otros tejidos, trompa de Falopio o endometrio, en el ovario durante la ovulación. La estrecha relación ovario-fimbria origina el CO favorecido de la vasculatura de estas y el contacto entre los tejidos en el proceso de ovulación. Las células epiteliales de las trompas (fimbrias) pueden desprenderse e implantarse en el quiste de inclusión del que posteriormente se origina el CO, como un proceso metaplasico (29) (Ver figura 4).



*Figura 4. Relación mesotelio-fimbrias.* Tomado de Ng y cols. 2015 (30)

Según Ottevanger (31), las dos teorías son ciertas dado que el CO de bajo grado, seroso de bajo grado y carcinoma endometriode, se origina a partir de células epiteliales anormales. Mientras, el CO tipo II, se estima que tiene su origen en células secretadas de las trompas de Falopio por medio de la interacción de las fimbrias con el ovario en el proceso de ovulación.

Otra teoría un poco menos estudiada resulta de la hipótesis de que todas las células surgen de un mismo progenitor, pero varía su diferenciación dependiendo la vía adoptada en la embriogénesis de genes HOX. Estos genes no se expresan normalmente en la superficie del epitelio ovárico. Sin embargo, en algunos estudios se ha determinado la expresión de HOXA9, HOXA10 y HOXA11 como posible factor que induce a las células a diferenciarse a diferentes linajes mullerianos. Lo anterior, permitiría el desarrollo de los diferentes tumores característicos del CO (32).

#### 4.2.3 Clasificación del CO

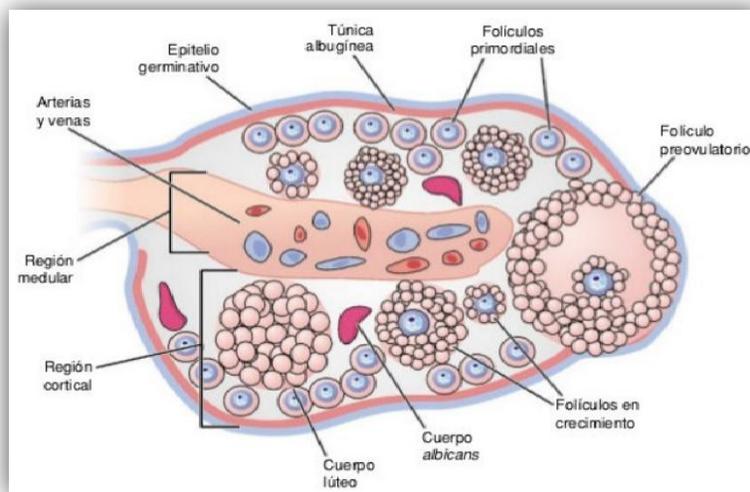
El CO se clasifica de acuerdo a la heterogeneidad en dos tipos. Los tumores tipo I son aquellos de bajo grado de malignidad, tales como serosos de bajo grado, endometriode de bajo grado, carcinomas de células claras y mucinosas. Usualmente, estos tumores son genéticamente estables, aunque presentan mutaciones en genes como KRAS, BRAF, ERBB2, PTEN, CTNNB1 y PIK3-k

(27). Los tumores tipo II son aquellos de que se caracterizan por ser más agresivos, normalmente se presentan en etapas avanzadas y son genéticamente inestables. Los más comunes en este grupo son el seroso de alto grado, endometriode de alto grado y los tumores indiferenciados; comúnmente estos tumores presentan mutaciones en el gen TP53 (27).

El CO se clasifica en diferentes subtipos de acuerdo a la morfología celular (*Ver figura 5*):

- Epitelial (85% de los CO): Mucinoso, serosos, endometriales y células claras.
- Células germinales: Teratoma, carcinosarcoma y carcinoma embrionario
- Células del estroma

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el CO de tipo epitelial se caracteriza por ser altamente heterogéneo. Se clasifica en cinco subtipos: seroso de alto grado (90%), endometriode (10%), de células claras (10%), mucinoso (3%) y seroso de bajo grado (<5%). Lo anterior respecto al origen celular, proliferación, alteraciones moleculares, expresión génica y pronóstico (3,24).



*Figura 5. Tipos de células del ovario.* Tomado de Junqueira y cols., 2005 (33)

Este a su vez se asocia a diferentes estadios dependiendo de la progresión del tumor:

I. Cáncer limitado a ovarios (estable genéticamente).

II. Cáncer en uno o ambos ovarios y diseminado a pelvis (inestable genéticamente).

III. El cáncer compromete a uno o ambos ovarios, la pelvis y se disemina al peritoneo, afectación de ganglios linfáticos.

IV. Cáncer diseminado a órganos distantes.

#### 4.2.4 Factores de riesgo

El CO se origina por la acumulación de alteraciones genéticas que provocan el descontrol celular. En la actualidad existen muchos factores que aumentan el riesgo de padecer cáncer, aunque no existen factores etiológicos definidos para el CO (5,24). Varios estudios han identificado los siguientes factores como predisponentes para la enfermedad:

- **Obesidad:** El sobrepeso es un factor que aumenta el riesgo dependiente del tipo de CO y la edad de la mujer. Lo anterior se basa en cambios hormonales, estrógenos circulantes a causa de la aromatización de andrógenos en el tejido adiposo, presente en mujeres post menopáusicas (2).
- **Factores genéticos:** cerca del 20% de los CO son hereditarios, las mutaciones más comunes en el CO se presentan en los genes BRCA, estas normalmente se presentan en tumores serosos de alto grado (7). Estos genes supresores de tumores expresan proteínas encargadas de la reparación del ADN, lo que permite la transcripción de un genoma óptimo (5). El riesgo de padecer CO es del 35-46% para las portadoras de mutación en BRCA-1, y entre el 13-23% para las portadoras de BRCA-2 mutado (27).
- **Antecedentes familiares:** El factor de riesgo más importante para el cáncer de ovario es un historial familiar de cáncer de mama o de ovario, el riesgo de desarrollar cáncer de una mujer con familiares afectados es tres veces mayor al de una mujer que no (1). Se estima un riesgo del 5% cuando hay un familiar afectado y del 7-15% cuando hay dos o más familiares. Aproximadamente el 18% de los cánceres epiteliales de ovario, especialmente carcinomas serosos de alto grado, son causados por mutaciones heredadas que sugieren un alto riesgo, como los genes BRCA1 o BRCA2. Estas mutaciones representan casi el 40% de los casos de cáncer de ovario en mujeres con antecedentes familiares de la enfermedad (18).

- Otros factores: Algunos estudios sugieren diferentes factores asociados al estilo de vida como predisponentes de la enfermedad, tales como el consumo de alcohol, el cigarrillo, la dieta y el uso de talcos en la zona genital por periodos prolongados. Este último posiblemente aumenta el riesgo en un 20-25%, aunque hasta el momento no se encuentran evidencias sustanciales (7).

#### 4.2.5 Factores preventivos

- Embarazo y nuliparidad: Estudios han comprobado que las mujeres con hijos tienen un riesgo aproximado de 30% al 60% menor que las mujeres nulíparas (2), el embarazo causa anovulación y suprime la secreción de gonadotropinas hipofisarias. Las mujeres tienen un riesgo cada vez menor relacionado con el número de embarazos, estudios deducen que cada nacimiento disminuye en un 10-20% el riesgo; y la vez, se estima que disminuye el riesgo de portar mutaciones en los genes BRCA (7,27). Al parecer, las mujeres que no han tenido hijos tienen un mayor riesgo consecuente a la estrecha relación de los factores hormonales y la reproducción con el origen del CO.

- Anticonceptivos: Los inhibidores de la ovulación tienen un efecto protector. Condiciones que conlleven a la no ovulación prolongada (menarquia tardía, menopausia precoz, embarazos, y utilización de anticonceptivos orales) generan una disminución del riesgo de padecer CO (27). Entre las mujeres que usan anticonceptivos orales durante periodos prolongados, 5 a 9 años, el riesgo se reduce en un 35%; el efecto protector permanece cerca de 30 años después de la interrupción (18).

- Edad de la menarquia y la menopausia: Según la hipótesis de la ovulación incesante, con cada ovulación el epitelio de revestimiento del ovario sufre procesos de “disrupción-reparación”; estos procesos se asocian con un incremento de mutaciones genéticas que pueden contribuir a alteraciones en los mecanismos de control celular y con ello al CO (7). Con base en lo anterior, la menarquia tardía y de la menopausia precoz disminuye el riesgo de padecer la enfermedad, suponiendo que el bajo número de ciclos ovulatorios disminuye la división celular asociada con la reparación del tejido superficial después de cada ovulación (2).

#### 4.2.6 Diagnóstico

El CO no presenta síntomas específicos, suele ser asintomático en estadios tempranos. Sin embargo, se presentan síntomas como: “dolor y distensión abdominal, estreñimiento, sangrado vaginal, alteraciones de la menstruación, dispareunia, astenia, anorexia, náuseas, dolor de espalda o polaquiuria, entre otros” (24). El signo más común de la enfermedad avanzada es la hinchazón del abdomen causada por la ascitis (18). Dicha inespecificidad de los síntomas no facilitan su diagnóstico, haciendo frecuente su detección cuando el tumor se ha diseminado (5).

El CO suele diagnosticarse inicialmente por medio de herramientas diagnósticas como ultrasonido, radiografía o tomografía computarizada, las cuales permiten detectar el tumor y asignarle un estado maligno o benigno. Otros métodos un poco más invasivos como la laparoscopia permiten determinar la etapa del CO o la biopsia. Esta última se hace a partir de la extirpación del tumor en una cirugía (34).

También se utilizan marcadores tumorales como CA-125, ya que se pueden ver aumentados sus niveles en algunos tipos de CO. Además, las pruebas genéticas son útiles para determinar alteraciones ya sean hereditarias o de Novo que pueden arrojar luces sobre el pronóstico y el tratamiento a utilizar.

Según la (FIGO), Entre el 70 y el 80% de las pacientes se diagnostican en estadios avanzados (III y IV) y entre el 20 y 30% en estadios iniciales (I y II). En los pacientes con estadios avanzados la supervivencia a los 5 años se reduce drásticamente, siendo de un 35% y menor de un 10% para las que presentan un estadio III o IV (24).

Los métodos aprobados para la detección de HER2 son la inmunocitoquímica (IHQ) y la hibridación de fluorescencia in situ (FISH). Aunque no existe una técnica clasificada como Gold estándar para su detección, la FISH es la técnica más utilizada en la actualidad dado su alta sensibilidad y especificidad; pero, el estudio molecular se realiza de forma concomitante con la IHQ (35).

#### 4.2.7 Tratamiento

El tratamiento es dependiente del tipo de CO, etapa y grado del tumor; puede ser cirugía, quimioterapia, radioterapia o terapia hormonal. El fármaco quimio-terapéutico de elección en el tratamiento del cáncer de ovario es el platino en cualquiera de sus formulaciones como Cisplatino o carboplatino; los cuales se caracterizan por tener una eficacia similar, pero niveles de toxicidad diferentes. Usualmente es combinado con otros fármacos también activos como los taxanos y antraciclinas (36).

El estándar actualmente es Paclitaxel más carboplatino durante 6 ciclos cada 3 semanas. Aunque, el esquema más empleado en estadios avanzados consiste en la combinación de Paclitaxel-Cisplatino de forma intraperitoneal cada 21 días; este tratamiento se basa en suministrar la dosis en la cavidad abdominal para mayor efectividad, ya que va orientado directamente a las células tumorales (37).

### 4.3 Cisplatino

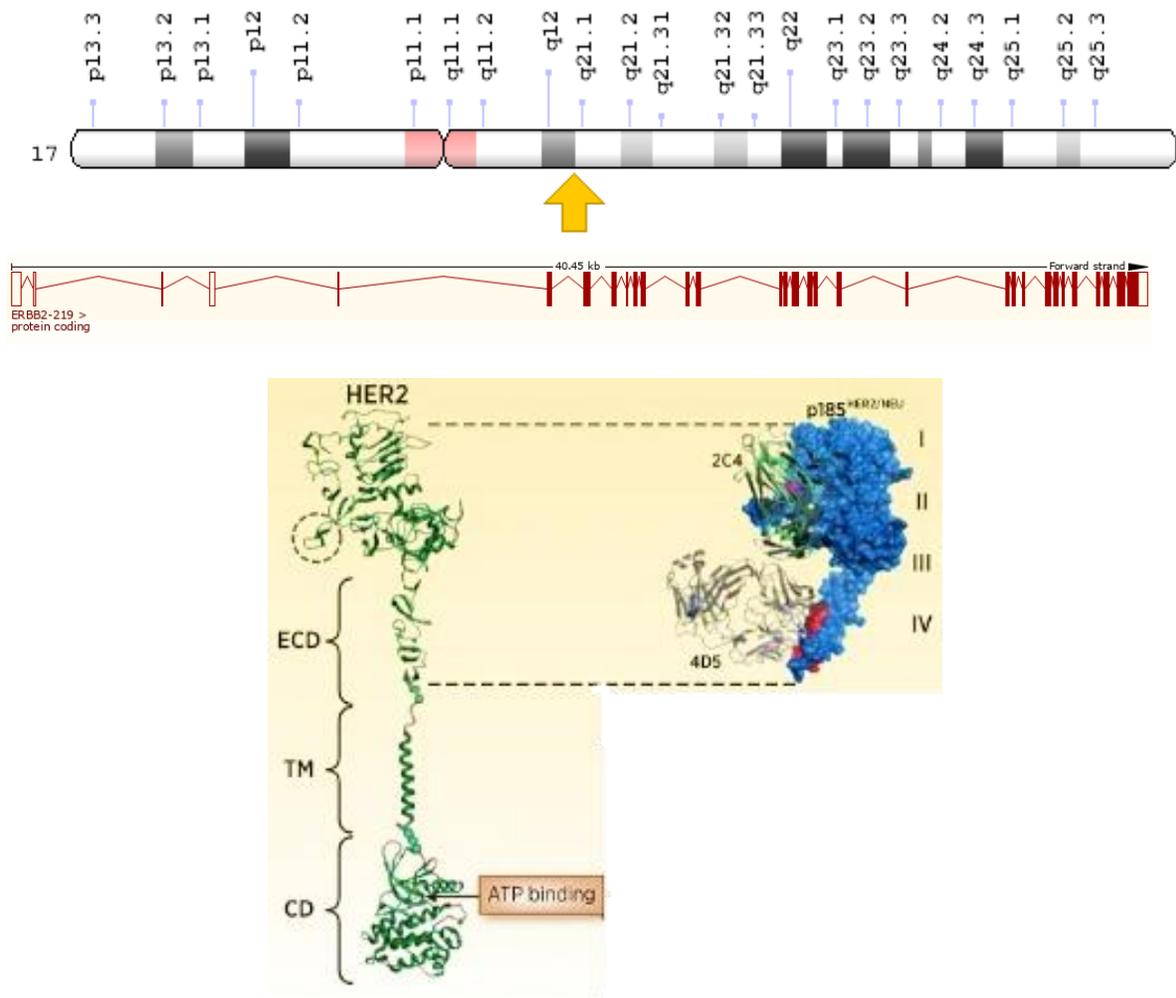
El cisplatino (cis-diaminodicloroplatino) es agente cito-tóxico alquilante bifuncional. El antineoplásico interactúa con el ADN, directamente con posiciones N-7 de las purinas, alterando la conformación del ADN por medio de la formación de aductos intercatenarios e intracatenarios (38). Los derivados del cisplatino se utilizan como tratamiento principal del cáncer de ovario, a pesar de sus efectos secundarios graves y el desarrollo de resistencia.

### Receptor HER2

El receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2) también llamado neu, oncogén ERBB2 o CD340, forma parte de la superfamilia de receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGF), constituida por: EGFR (HER1), HER2, HER3 (ErbB3) y HER4 (ErbB4) (39,40). ES una familia de receptores tirosina quinasa (RTK) importantes en la embriogénesis, el desarrollo celular normal y tumorigénesis (39).

#### 4.3.1 Estructura del receptor HER2

HER2 es una proteína transmembranal codificada por el protooncogén ERBB2, está ubicado en la región q12 del cromosoma 17 (7). Este gen está compuesto por 28 exones que codifican una proteína de 1255 aminoácidos y abarcan un segmento de 185 kDa (26,41). El receptor es una glicoproteína integral de membrana constituida por tres regiones, un dominio extracelular amino terminal donde se encuentra el sitio de unión al ligando, un único dominio transmembranal; y un dominio citoplasmático carboxilo terminal donde se localiza el sitio catalítico responsable de la actividad tirosina quinasa (1) (*Ver figura 6*).



*Figura 6. Estructura del gen ERBB2. Tomado de Sledge y Pegram; 2015 (42)*

La región extracelular está conformada por cuatro dominios, I / L1, II / CR1, III / L2 y IV / CR2, se encuentra codificada por 630 aminoácidos. Se estima que los dominios I y III participan en la unión del ligando, y los dominios II y IV permiten la dimerización entre los receptores con la finalidad de ser activado e iniciar la posterior transducción de señales; lo anterior, por medio de un cambio conformacional en las proteínas (29).

La región transmembranal está conformada por un segmento alfa helicoidal y la región intercelular o citoplasmática con actividad tirosina quinasa (43). El dominio tirosina-quinasa está conformado por dos lóbulos, N y C, donde se ubica el bucle de activación; además, presentan una cola carboxilo terminal donde ocurre posteriormente la autofosforilación (44). Aproximadamente, el 20% de la estructura del receptor está conformada por residuos glicosilados, los cuales pueden estar implicados en el correcto plegamiento, el transporte a la membrana y la obtención de las funciones del receptor (1).

#### 4.3.2 Activación de HER2

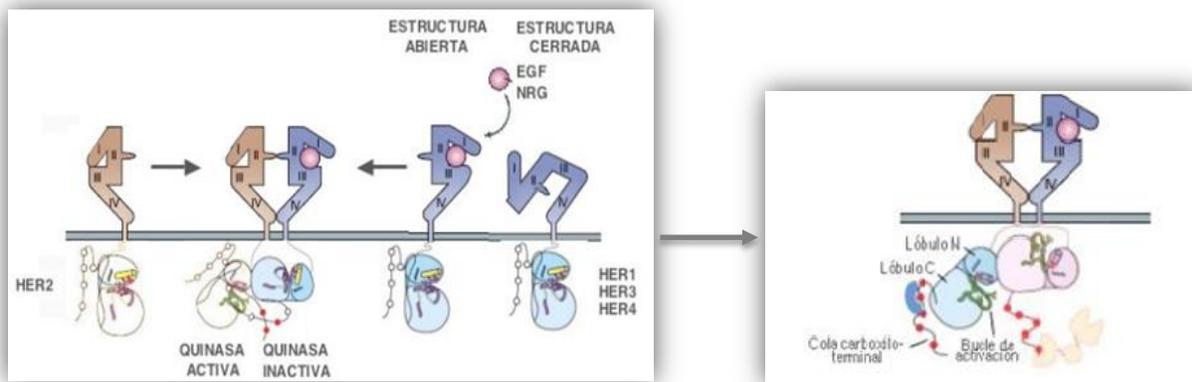
##### ○ Ligando

La activación de los receptores es posible por la unión al ligando específico. Se han identificado diferentes ligandos para los diferentes receptores. El factor de crecimiento transformante  $\alpha$  (TGF  $\alpha$ ) y la amfíregulina (AR) se unen a HER1, además, la betacelulina (BTC), el factor de crecimiento de unión a la heparina (HB-EGF) y la epiregulina (EPR) se unen a HER1 y a HER4. Por otro lado, las diferentes isoformas de neureglinas (NRGs) se unen a HER3 y HER4 (NRG1 y NRG2), y específicamente a HER4 (NRG3 y NRG4) (45,46). En la actualidad no se ha encontrado ligando específico para HER2, este no puede ser activado por los factores de crecimiento, por lo que es necesaria la unión estrecha con otro RTK unido al ligando para la posterior formación de un heterodímero, funcionando como co-receptor (43,47).

##### ○ Dimerización

La activación de la señalización por medio del receptor HER2 es posible por medio de un mecanismo de emparejamiento llamado dimerización (29). La dimerización es necesaria para que

el receptor pueda activarse y presentar actividad catalítica, con el fin de activar la transducción de señales intracelulares. Se puede presentar homodimerización, por medio de dos receptores idénticos, o heterodimerización, entre miembros diferentes de la familia de receptores (48) (*Ver figura 7*). HER2 se encuentra activo con el brazo de dimerización abierto incluso sin unión del ligando, este se dimeriza con otros miembros de la familia (heterodimerización), convirtiéndose en receptor preferido para la asociación puesto que les proporciona mayor estabilidad y fuerza a las señales transmitidas, comparado con otros dímeros (46,48).



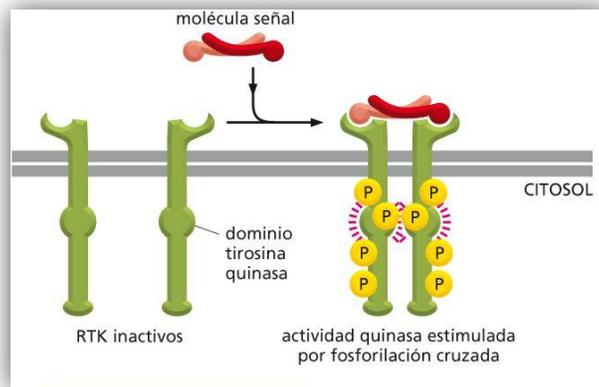
*Figura 7. Heterodimerización de HER2 con miembros de la familia EGF. Tomada de Anido, 2006 (49).*

La dimerización de los receptores es esencial para su funcionalidad, activar la señalización intracelular. Entre los complejos de homo y heterodimerización potencialmente formados por los receptores de HER, el heterodímero HER2/HER3 es el biológicamente más activo y potente para activar la cascada de señalización de PI-3K / Akt (29,39). Es considerado una unidad oncogénica visto que están implicados en el desarrollo y progresión del cáncer (29).

Además, la activación también puede presentarse como resultado del incremento en la expresión del receptor (amplificación) o alteraciones moleculares del mismo, como mutaciones puntuales que permitan la forma truncada del receptor y su activación constitutiva (48). Este proceso de acoplamiento provocado por la unión de un ligando genera un cambio conformacional en la proteína que favorece la posterior auto-trans-fosforilación (29).

- Autofosforilación

Los RTK son un tipo de receptores acoplados a enzimas que fosforilan directamente residuos de tirosina de su propia estructura. Tras la unión del ligando cambia la orientación de varias hélices alfa transmembranales modificando la posición de los bucles citosólicos entre sí, lo que permite que la tirosina quinasa intracelular fosforile ciertas cadenas laterales de la proteína, tanto propias como de las proteínas de señalización que se unen a las zonas fosforiladas de los receptores (*Ver figura 8*). Lo anterior, reestructura el dominio proporcionando una configuración abierta que permite el acceso de ATP para la correcta actividad del receptor (44).



*Figura 8. Fosforilación del receptor.* Tomada de Alberts, 2015 (50)

También es posible que la unión del ligando permita que las cadenas de los receptores se dimericen juntando los dominios quinasa de los receptores (proximidad inducida). Así, se fosforilan de forma cruzada con diferentes tirosinas (trans autofosforilación), lo que incrementa la actividad quinasa de la enzima y genera lugares de unión de alta afinidad para ciertas proteínas intracelulares (50).

La actividad tirosin-quinasa intracelular de los receptores estimula las vías de señalización involucradas en la regulación de procesos celulares oncogénicos: proliferación, supervivencia, movilidad celular y angiogénesis.

#### 4.3.3 Vías de señalización activadas por HER2

Como se ha mencionado, la unión del ligando permite la activación del receptor, el cual genera sitios de unión específicos para diferentes proteínas transductores de señal. Por medio de este

mecanismo se activan diferentes vías de señalización intracelular que juegan un papel importante en el crecimiento celular, la proliferación y la supervivencia, entre otros procesos celulares (Ver figura 9). Por medio de la dimerización del receptor HER2 se pueden activar dos vías claves para la célula, la vía fosfatidilinositol-3 quinasa PI3K-Akt que estimula la supervivencia celular; y la vía de la proteína quinasa activada por mitogeno MAPK que permite la proliferación (29,50).

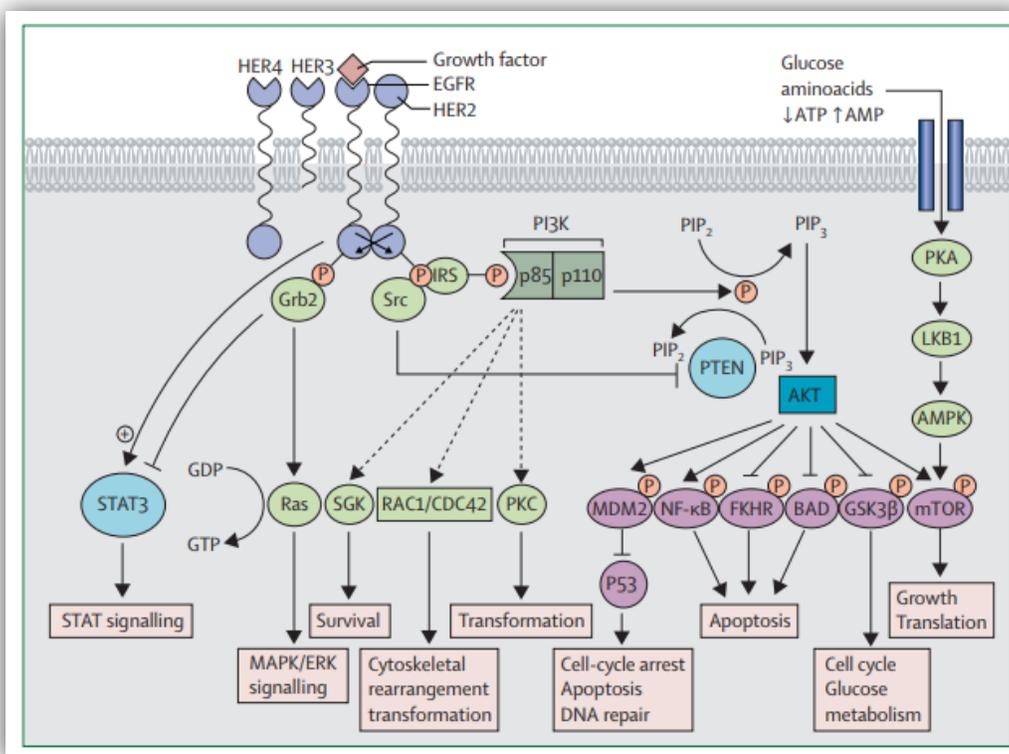


Figura 9. Vías de señalización activadas por el receptor HER2. Tomado de Henessy y cols. 2009 (32)

○ Vía MAPK

La activación de la vía conduce a la transcripción de los genes que regulan la proliferación celular, así como la migración, la diferenciación y la angiogénesis (51).

En esta vía de señalización intracelular se ven específicamente implicadas las proteínas de la familia MAP quinasa. Estas proteínas son reclutadas en el dominio intracelular del receptor por diferentes proteínas, homologa Src, proteína de unión fosfotirosina y la proteína adaptadora del factor de crecimiento (GRB2). Posteriormente, un factor intercambiador de nucleotidos, SOS, se

une a RAS y activa a RAF soluble/MAPs, e inicia la transducción de señales de prenilación RAF/MEK/ERK, también llamado MAPKKK/MAPKK/MAPK (52).

Las células utilizan esta vía con la finalidad de activar y controlar mecanismos de transcripción y traducción implicados en la proliferación celular; por medio de las dianas de ERK: MNK, ELK1, CREB, RSK (52).

- Vía PI3K-Akt

La señalización a través de la vía PI3K-Akt conduce a funciones celulares fundamentales, proliferación celular y supervivencia. Lo anterior, por medio de la activación río debajo de proteínas que directa o indirectamente controlan la maquinaria apoptótica (53).

La activación de la familia de fosfoinositoles (Ptdins) es activada por medio de fosforilación del heterodímero PIP2 a PIP3, el cual por medio de proteínas de unión homologas de plekstrina (PH) permiten la continuidad de la señal. Posteriormente, la kinasa serina/treonina(AKT) es fosforilada en la membrana gracias a su unión a PIP3 que le genera un cambio conformacional que permite la exposición de los dominios kinasa y la activación por medio de PKD1 y mTOR (raptor) (54). La activación de AKT es la principal función de la vía, ya que esta regula diferentes proteínas diana encargadas de diferentes funciones intercelulares e internucleares.; tales como reguladores tradicionales (P70S6K1, mTOR), supresores de crecimiento (complejo TSC1/TSC2), efectos antiproliferativos (p21/waf1/cip1 y p27/kip2), regulación del ciclo celular (GDK-3), entre otros (55).

Según Bast y cols. (56), la vía PI3K se encuentra activa en el 70% de los CO impulsada por la amplificación de genes PI3K, Akt y PTEN. Además, la vía se activa de forma clásica, por medio de receptores transmembranales. Esta vía se encuentra asociada a la resistencia a diferentes tratamientos como la quimioterapia.

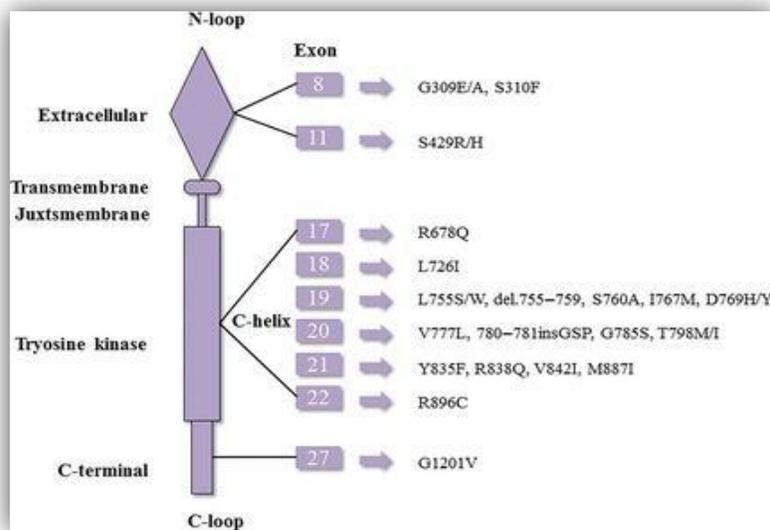
Es importante mencionar que las alteraciones en las vías de señalización intracelular juegan un papel importante en el desarrollo del cáncer, ya que la activación aberrante de estas desencadena

la patogénesis de algunos tipos de cáncer y posteriormente su resistencia a quimioterapias. Estos tienden a ser de un pronóstico más agresivo (32).

#### 4.3.4 Alteraciones en el receptor HER-2

Según la literatura, la posibilidad de mutaciones de HER-2 se presenta dependiente al tipo de cáncer, aproximadamente el 2% de los canceres presenta las siete mutaciones activadoras más comunes, G309A, D769H, D769Y, V777L, P780ins, V842I y R896C (57). En el cáncer de mama el riesgo mutacional es de 1.67%, en cáncer de pulmón de 1-4% y en cáncer colorrectal de 2.9%. Este receptor también se ha encontrado mutado en otros tipos de cáncer como vejiga, ovario, gástricos, etc. (58).

En cáncer de ovario las mutaciones más comunes son sustituciones de bases y amplificación del gen ERBB2 (59). Según Wen y cols. (60), en el 0.5% de los tumores analizados se encontraron variaciones como: L755S, I767F/M, D769Y, G815R, V842I y T862A (*Ver figura 10*).



*Figura 10. Principales alteraciones en el receptor HER-2. Tomado de Sun y cols. 2015 (58).*

La activación mutacional de HER2 abarca tres tipos de alteraciones moleculares somáticas: pequeñas inserciones o mutaciones en el dominio intracelular de tirosina quinasa, mutaciones en

el dominio extracelular y grandes deleciones del dominio extracelular que produzcan una forma truncada del receptor.

- Mutaciones en el dominio extracelular (ECD)

Las mutaciones más frecuentes en este dominio se presentan frecuentemente en el exón 8 (S310F/Y, G309A/E, S335C), las cuales se activan por dos causas: fosforilación elevada de la cola C-terminal y dimerización covalente por formación de enlaces disulfuro intermoleculares (57). Según diferentes estudios (59,61), la mutación más común en este dominio es S310F y S310Y, las cuales suelen activarse a través de la hiperfosforilación. La mutación S310Y, se ha encontrado con mayor frecuencia en cáncer de vejiga (57).

Existen receptores HER2 incompletos o fragmentos implicados la falla terapéutica, definidos como variantes.  $\Delta$ 16HER-2, es una variante de empalme que carece del exón 16, presenta facilidad de conformar homodimeros y posteriormente transformar las células cuando se expresa en altos niveles. P95HER-2 es una forma truncada que no presenta dominio extracelular completo, puede presentarse por desprendimiento proteolítico o fallas en la traducción del ARNm.

- Mutaciones en el dominio intracelular

La mayoría de las mutaciones ocurren en la región  $\alpha$ C-Hélice, específicamente en los exones 19-21 codificados por las secuencias de ADN en los exones 18-23. Las mutaciones más prevalentes son de inserciones y deleciones en el exón 20 (L755S, V777L, V842I), las cuales adquieren una actividad catalítica más fuerte que convierten al HER2 mutado en un potente transformador celular capaz de inhibir la apoptosis (57). Usualmente, las mutaciones que se presentan en el exón 20 conducen a un cambio conformacional del bucle  $\alpha$ C- $\beta$ 4 auto inhibitorio, manteniendo la condición inactiva; se altera la hendidura de unión al trifosfato de adenosina (ATP), la cual proporciona mayor afinidad de unión, promueve la actividad enzimática y aumenta la fosforilación de tirosina independiente del ligando (41).

Según Petrelli y cols.(59), más del 50% de las mutaciones en el dominio TK son L755S (Exón 19), V777L (Exón 20) y D769H/Y (Exón 19), las cuales se caracterizan por aumentar la

fosforilación y la heterodimerización. Estas variaciones le permiten al receptor realizar una dimerización espontánea y se caracteriza por la activación constitutiva de la actividad catalítica que desencadena la señalización intracelular; lo anterior, aumenta la oncogenicidad del tumor.

#### 4.3.5 Papel en el desarrollo y tumoral

La sobreexpresión del receptor se ha visto asociada a la carcinogénesis y pronóstico en tumores sólidos (58). La proteína HER2 se expresa en células normales en niveles desde 20.000 hasta 200.000 copias por célula, en células tumorales puede estar sobre expresado y aumentar hasta 20 veces más de lo normal (46). Se ha informado en glioblastoma, cáncer de mama, cáncer gástrico, adenocarcinoma de pulmón, cáncer de ovario, incluso en células madre (40). Lo que lo ha convertido en un factor pronóstico y de diagnóstico.

La sobreexpresión de HER2 se encuentra en el 20-30% de los cánceres de mama y ovario, se correlaciona con tumores más agresivos y de peor pronóstico (43,46). La amplificación del gen ERBB2 resulta en la sobreexpresión del HER2, el cual permanece activado en forma constitutiva (62). Según Koeppen y cols., se ha observado amplificación y sobreexpresión de HER2 en algunos tipos de cáncer de ovario epitelial (63). Teniendo en cuenta que es un receptor con actividad constitutiva, puede activarse independiente de su unión al ligando; es un receptor clave en el desarrollo tumoral y un posible objetivo ante las terapias contra el cáncer (44).

El aumento de la expresión del receptor en la superficie celular aumenta la sensibilidad a sus ligandos y favorece la activación del mismo, incrementando posteriormente el crecimiento celular (48). Además, los altos niveles de fosforilación provoca la saturación de la actividad fosfatasa celular, la célula no puede reprimir la transmisión de señales intracelulares que se generan continuamente (49). En consecuencia, la expresión incrementada de HER2 incrementa la actividad de las rutas de señalización activadas por el receptor, y aumenta la capacidad de transformación y el crecimiento del cáncer.

Mutaciones en este gen son indicio de un mal pronóstico en tumores, en la actualidad es una diana terapéutica, ya sea por medio inhibidores de la actividad tirosina quinasa que caracteriza a

la proteína y consecuentemente la ruta de señalización como anticuerpos monoclonales (trastuzumab) (45).

## 5 METODOLOGIA

### 5.1 Tipo de investigación

Esta investigación es un estudio de tipo experimental *in vitro*.

### 5.2 Población

Líneas Celulares de cáncer de ovario.

### 5.3 Muestra

Línea celular de cáncer de ovario MES-OV.

### 5.4 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.

### 5.5 Variables e indicadores

#### 5.5.1 Variables

- Dependiente: Expresión de HER2, morfología y crecimiento celular de la línea celular MES-OV
- Independiente: Dosis de cisplatino

#### 5.5.2 Indicadores

- Proteína HER2

#### 5.5.3 Criterios de Inclusión

Cajas de cultivo con una confluencia mayor al 60%, es el momento adecuado para realizar los ensayos.

#### 5.5.4 Criterio de Exclusión

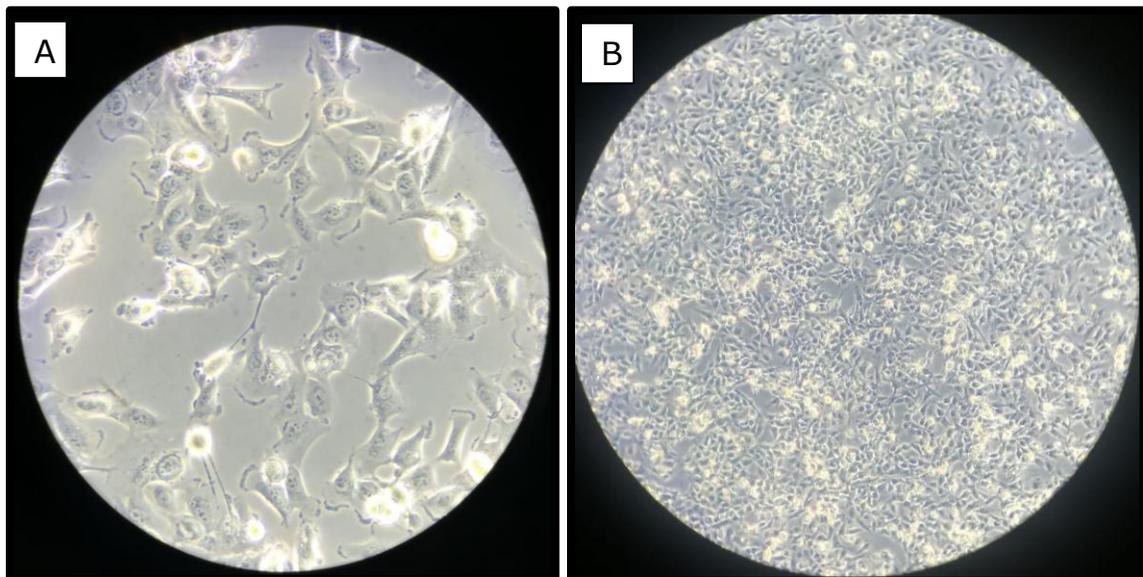
N.A

## 5.6 Materiales y Métodos

### 5.6.1 Cultivo celular

La línea celular MES-OV fue obtenida de “American Type Culture Collection” (ATCC). De acuerdo a las especificaciones de ATCC, esta línea fue aislada a partir de células CRL-3272 del líquido ascítico de una paciente de 53 años con cystadenocarcinoma de ovario en estadio III. Esta línea celular tiene características epiteliales propias de las células neoplásicas ováricas (64) (*Ver figura 11*).

Inicialmente, se descongelaron crio preservados de la línea celular, proporcionados por el laboratorio de Genética de la fundación Universitarias de Ciencias de la Salud (FUCS), y se cultivaron las células en caja T-25. Se utilizó medio completo de McCoy’s con adición del 10% de suero fetal bovino para un volumen final de 50mL; lo anterior, con la finalidad de proporcionar las condiciones necesarias para el crecimiento celular y evitar cualquier tipo de contaminación. Las cajas se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> con previo monitoreo diario por medio de microscopia de luz blanca para asegurar el crecimiento celular hasta alcanzar una confluencia entre 60-100%.



*Figura 11. Morfología, Células MES-OV de cáncer de ovario. (A) Confluencia del 50%, objetivo 40X; (B) Confluencia del 90%, objetivo 10X. Fotografías Tomadas por el autor.*

### 5.7.2 Desprendimiento celular

En una caja T-25, tras obtener la confluencia celular cercana al 60%, se eliminó el medio de cultivo y se adicionó 5mL de medio o solución de PBS 1X con la finalidad de lavar las células. A continuación, se eliminó la solución de lavado y se adicionó 2ml de tripsina (0.25%, dependiendo la línea celular) con la finalidad de desprender las células, estas se verificaron mediante microscopio de luz invertido. Se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 2-5 minutos. Posteriormente, se resuspendieron en 5 ml de solución de lavado y se colocaron en un tubo de 15mL para centrifugar por 5 minutos a 1200rpm. Se retiró el sobrenadante y se prosiguió a resuspender el pellet en 5mL de medio y se sembró en cajas T-25, cajas multipozos o láminas con campo de reacción dependiendo el paso a seguir.

### 5.6.2 Viabilidad celular

Se realizó el ensayo de viabilidad celular por medio de un método homogéneo de punto final, mediante la reducción del metil-tiazol- tetrazolio (MTT), que permite la reducción del tetrazolio a un producto insoluble de formazán por medio del NADH y succinato-deshidrogenasas mitocondriales que le transfieren electrones al MTT. A partir de la reacción se forman cristales de formazán, los cuales son solubilizados con DMSO para posterior lectura de la intensidad de color azul-violeta usando espectrofotómetro (65).

A partir de una caja T-25, con una confluencia celular mayor al 60%, sometida a tripsinización se realizó el conteo celular a partir del método de exclusión de azul de tripán, un colorante vital que no penetra las células con membrana íntegra, lo que nos permite diferenciar las células viables (no teñidas) de las no viables (teñidas de azul). A partir de una alícuota de 10µL de las células suspendidas en 10µL de colorante, se realizó el recuento de forma manual por medio de una cámara de Neubauer (cel/ml).

Una vez conocida la densidad celular se sembró la caja de 96 pozos con aproximadamente 5000 células por pozo en 50µL de medio McCoy's suplementado con 10% de suero fetal Bovino. Esta caja se incubó a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> entre 24 y 48 horas hasta obtener la confluencia de 60%

donde se pueden observar claramente las características morfológicas de las células, para posterior tratamiento con cisplatino.

### 5.6.3 Tratamiento con cisplatino

A partir de un stock inicial de cisplatino de 1mg/mL se realizaron diluciones en hasta concentraciones finales de: 1600µM, 800µM y 400µM, 200µM, 100µM, 50µM, 25µM, por medio de la siguiente conversión:

$$\frac{1\text{mg}}{\text{ML}} \times \frac{1\text{g}}{1000\text{mg}} \times \frac{10\text{mol}}{300.1\text{g}} \times \frac{1000\text{mmol}}{1\text{mol}} \times \frac{1000\text{umol}}{1\text{mmol}} \times \frac{1000\text{ML}}{1\text{L}} = 3332.22\text{umol}$$

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$3332.22\text{umol} \times ? = 1600\text{umol} \times 2000\text{uL}$$

$$= 960\text{uL cisplatino} + 1040\text{uL de medio McCoy's con SFB}$$

Las células MES-OV fueron tratadas con las diferentes concentraciones de cisplatino en medio McCoys suplementados con 10% de suero fetal Bovino y se incubaron a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>, por 24 horas. Posteriormente, se realizó el ensayo de MTT usando el KIT TACS MTT Assays Cell Proliferation and Viability Assays.

Inicialmente se monitoreo la morfología celular por medio del microscopio de luz invertido, se retiró el medio con cisplatino y se realizó un lavado con PBS 1X. A continuación, se añadió a cada pozo 50µL de medio McCoys sin suplementar y 5µL de reactivo (MTT), se incubó durante 2 horas a 37°C y se observó al microscopio para visualizar la formación del precipitado insoluble (Imagen 13). Posteriormente se añadió 50µL de reactivo detergente a todos los pozos para solubilizar los cristales y se incubó por 2 horas a 37°C, cubierto de la luz. A partir de la formación del colorante azul-violeta de formazán, se observó en el microscopio invertido para asegurar su solubilización, y se midió colorimétricamente mediante un lector de placas con filtros la densidad óptica en una absorbancia de 550nm.

La prueba se realizó por triplicado y se determinó un blanco a partir de células sin tratamiento con medio McCoys para eliminar las posibles interferencias ocasionadas por el rojo fenol

incorporado en éste; además, se estableció un control positivo de células sin tratamiento con la finalidad de obtener el 100% de las células viables, y un control negativo con la concentración total del cisplatino para lograr el máximo porcentaje de mortalidad celular (como control).

#### 5.6.4 Inmunocitoquímica

Para identificar la expresión de la oncoproteína HER2 en la línea celular MES-OV se realizó un método inmunológico usando la técnica de inmunocitoquímica. Esta técnica nos permite detectar y localizar microscópicamente proteínas presentes en células, se fundamenta en una reacción antígeno-anticuerpo por medio de un enlace covalente. Los resultados de la prueba se basan en la capacidad de las células teñidas o el porcentaje de células teñidas (66).

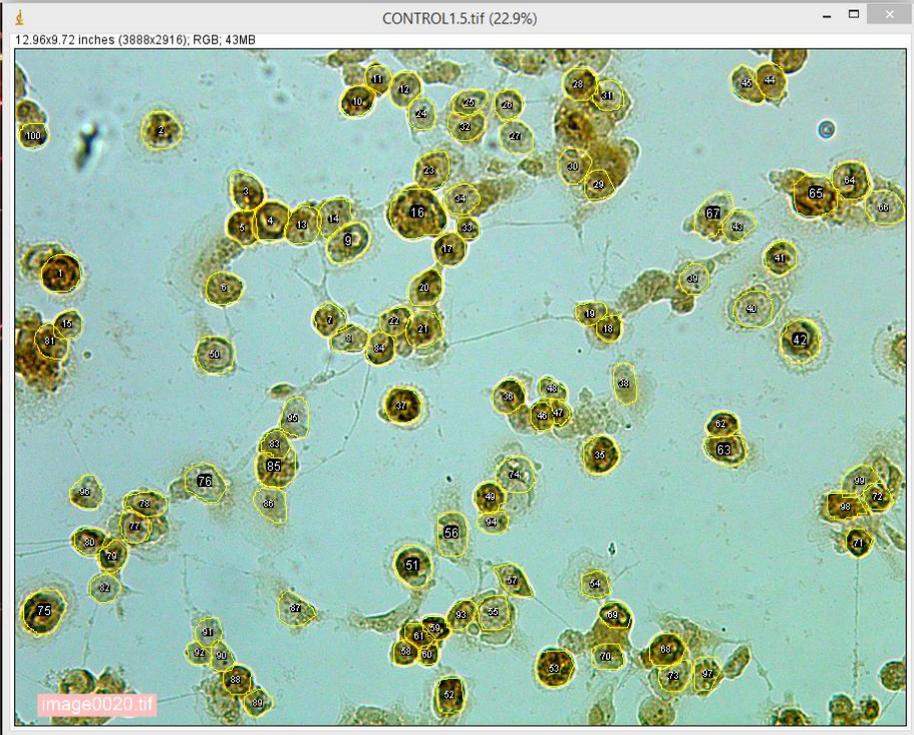
Se sembraron las células MES-OV en laminillas cubreobjetos con campo de reacción. Posteriormente, las células se lavaron con PBS 1X y se bloquearon las uniones inespecíficas con SFB al 3%. A continuación, se incubaron con el anticuerpo monoclonal contra la proteína HER2 durante 1 hora a 37°C; se lavaron con PBS 1X y se expusieron a un anticuerpo secundario, finalmente se reveló la reacción mediante el uso del kit Histostain SP Broad Spectrum (DAB) de Invitrogen. La lectura de presencia o ausencia de la proteína en las células se realizó usando el microscopio Leyca 2500 (Ver ANEXO 1).

#### 5.6.5 Análisis estadístico

La viabilidad celular se calculó mediante una curva de regresión no lineal por medio de la ecuación “Inhibición dosis-respuesta”. Este análisis estadístico se realizó mediante el software GraphPad Prism versión 8.0.

La técnica de inmunocitoquímica fue analizada a partir de 10 fotografías tomadas a cada concentración de cisplatino con la cámara DMC620 de LEICA. A partir de estas fotos se realizó un análisis de intensidad de densidades ópticas medidas en píxeles por medio del programa Image “J”, teniendo en cuenta el área celular delineada (*Ver figura 12*); los datos proporcionados fueron utilizados para determinar el grado de expresión. Dichos datos fueron analizados estadísticamente en hojas de cálculo de Microsoft Excel, donde se establecieron intervalos para delimitar la expresión en cuatro posibles resultados (intervalo-cruz).

La relación intervalo-cruz se determinó de acuerdo a los requerimientos, estableciendo que un resultado negativo se observa en células cuya intensidad oscila entre 0-25 densidades ópticas, 1+ de 25-50, 2+ de 50-75 y 3+ de 75-100 (Ver anexo 2).



*Figura 12. Se muestra ejemplo de la forma del análisis fotográfico en el software Image “J” (Versión libre).*

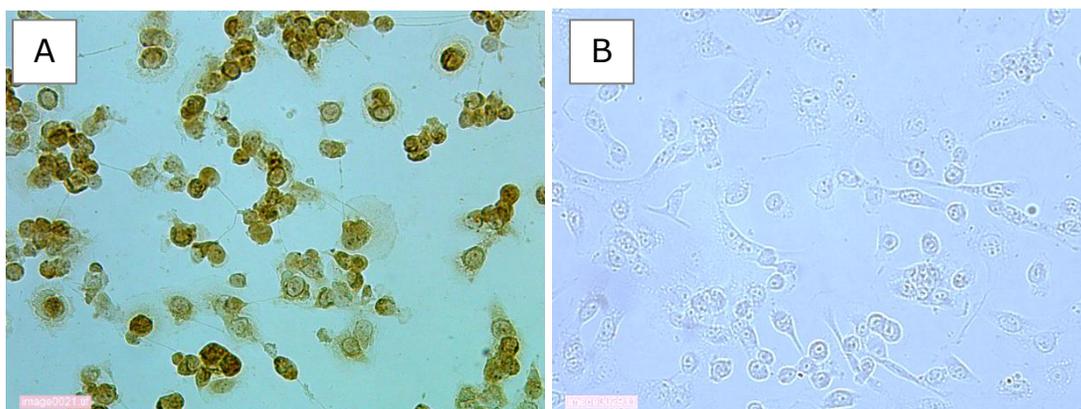
## 6 RESULTADOS

### 6.1 Viabilidad celular

El cisplatino en concentraciones de 3200  $\mu\text{M}$ , 1600 $\mu\text{M}$ , 800 $\mu\text{M}$ , 400 $\mu\text{M}$ , 200 $\mu\text{M}$ , 100 $\mu\text{M}$ , 50 $\mu\text{M}$  y 25 $\mu\text{M}$  induce muerte celular. La actividad MTT fue inversamente proporcional a la concentración de cisplatino aplicado (*Ver imagen 13*).

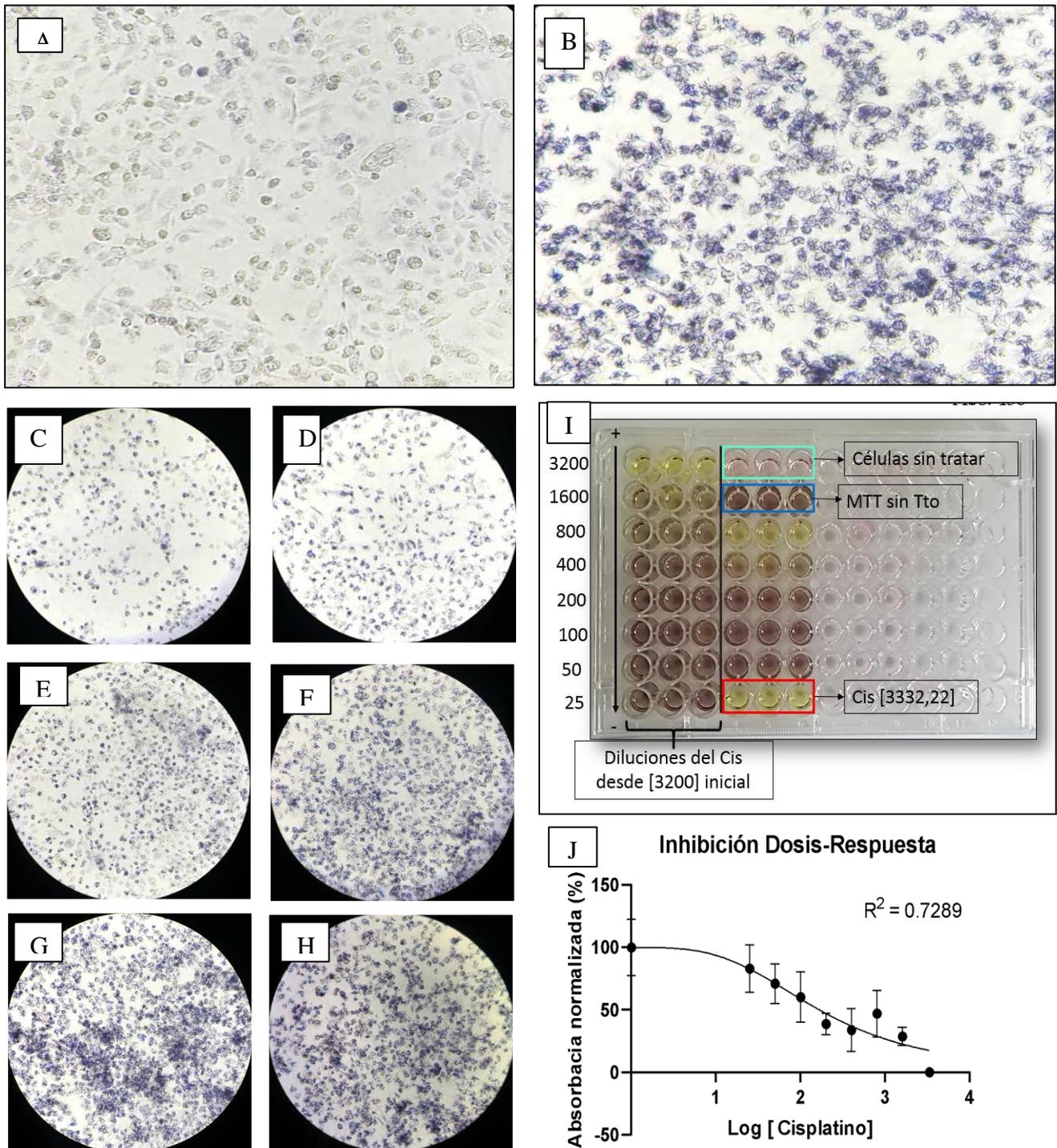
### 6.2 Expresión de HER-2

La inmunohistoquímica mostró que las células MES-OV sin tratamiento expresan el receptor HER2. Se puede observar que la inmunoreactividad presente es equivalente a la presencia del receptor HER2, en contraste con el control del anticuerpo secundario, en el cual la reacción es negativa (*Ver imagen 13*). Se observa que todas las células expresan el receptor, aunque en intensidades diferentes.



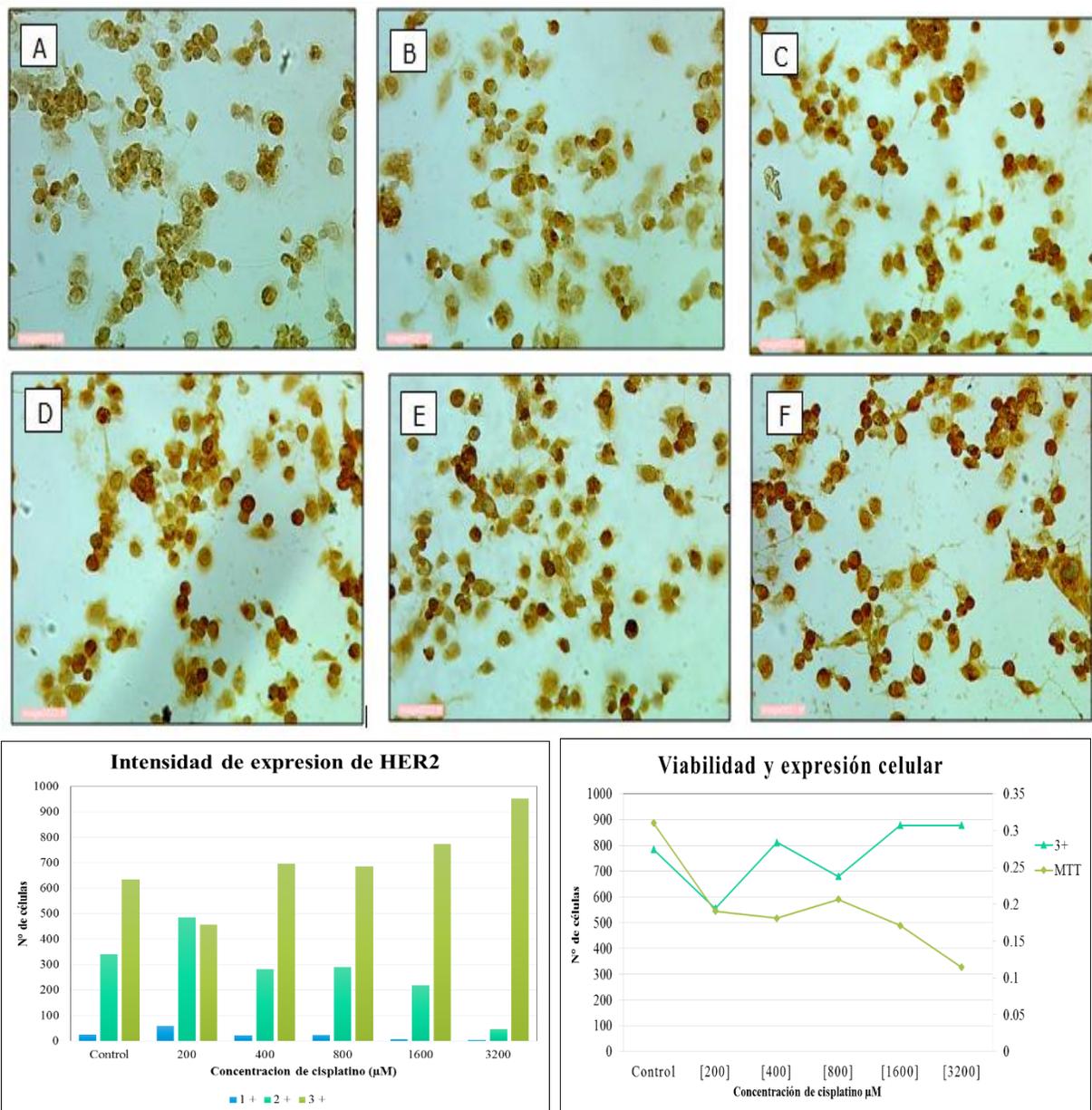
*Figura 13. Expresión de HER2. (A) Expresión del receptor HER2 en células sin tratamiento, (B) control del anticuerpo secundario. Fotografías tomadas por el autor.*

En las células tratadas con cisplatino, a medida que aumenta la concentración del cisplatino la cantidad de proteínas receptoras HER2 aumenta algunas células. Por ejemplo, en concentración de 3200 $\mu\text{M}$  la intensidad de la expresión HER2 es fuerte (3+) casi en el 100% de las células. En todas las concentraciones, el porcentaje de células sin expresión es baja (*Ver imagen 14*).



*Figura 14. El cisplatino induce formación de cristales en células MES-OV. (A) Células no viables sin formación de cristales, (B) precipitado insoluble: cristales de formazán en células viables (Control), (C-H) cristales de formazán en las diferentes concentraciones de cisplatino (1600µM, 800µM, 400µM, 200µM, 100µM, 50µM), (I) la densidad óptica es inversamente proporcional a la concentración de cisplatino, (J) relación dosis dependiente entre la viabilidad (% de absorbancia) y la concentración de cisplatino (µM).*

El porcentaje de expresión del receptor HER2 en las diferentes concentraciones de cisplatino fue evaluado mediante el análisis de intensidad de la tinción en las imágenes por medio del software Image “J” (Versión libre). La expresión del receptor HER2 presenta un comportamiento dosis-dependiente, ya que a mayor concentración de cisplatino mayor es la intensidad de la tinción.



*Figura 15. Expresión de HER2 en diferentes concentraciones de cisplatino. (A) Células sin tratamiento, (B-F) Cambios en la inmunoreactividad en diferentes concentraciones (200µM,*

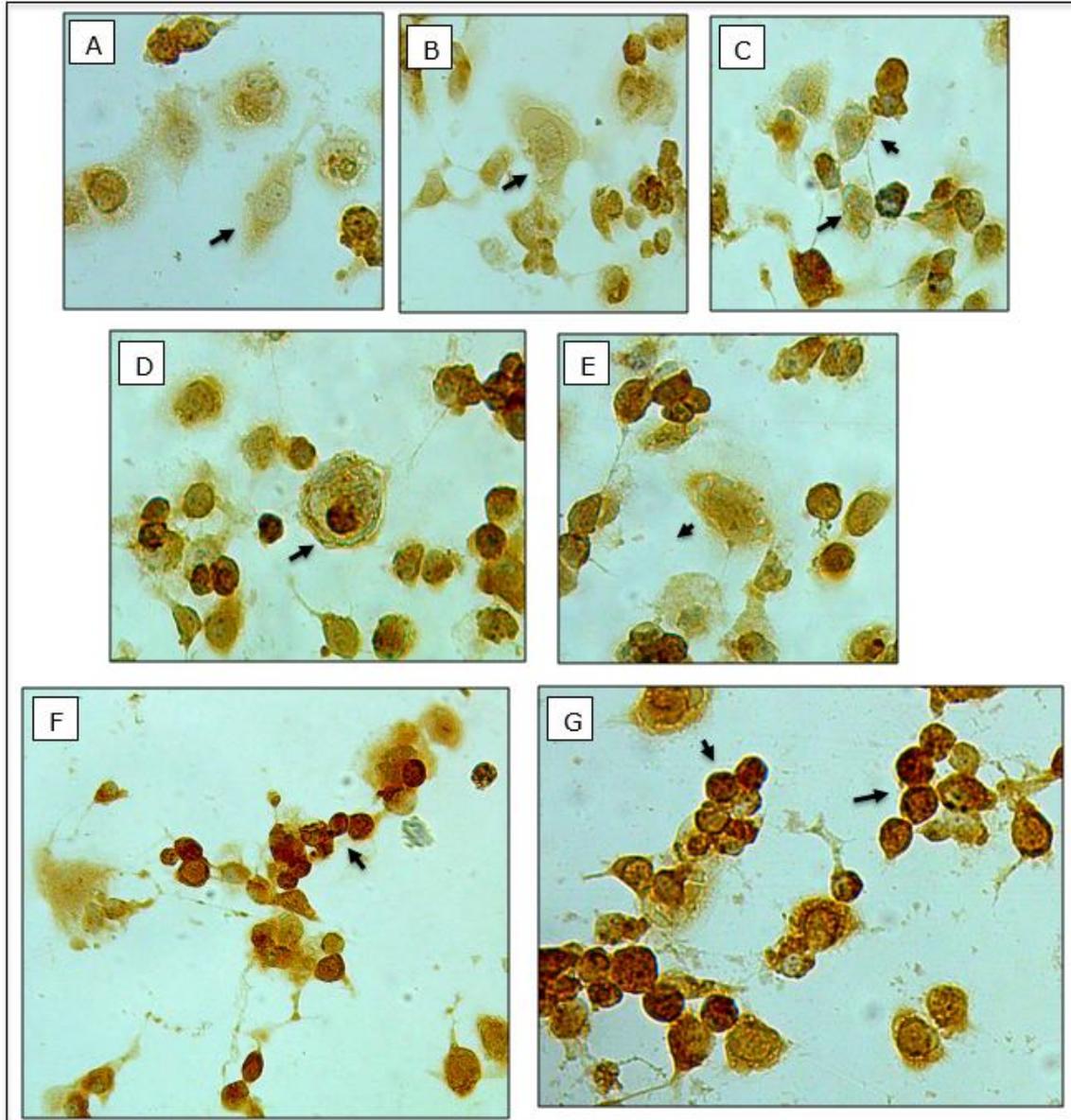
400 $\mu$ M, 800 $\mu$ M, 1600 $\mu$ M y 3200 $\mu$ M) microscopio de luz blanca Leica, objetivo 20X. (G) Las células MES-OV expresan el receptor HER2 como posible mecanismo de adaptación o supervivencia, (H) Relación concomitante entre la viabilidad (MTT) y la expresión de la proteína HER2 en diferentes concentraciones de cisplatino.

Se puede observar que hay variación en la intensidad de la tinción en células de la misma concentración indicando heterogeneidad en la expresión de la proteína (*Ver imagen 15*). Las concentraciones más bajas (200 $\mu$ M y 400 $\mu$ M) mostraron aumento significativo de la expresión débil (1 +); mientras, las concentraciones altas (800 $\mu$ Mol 1600 $\mu$ Mol y 3200 $\mu$ Mol) tuvieron aumento en la expresión fuerte (3 +).

### **6.3 Cambios morfológicos**

Se realizó un análisis de la morfología celular entre las diferentes concentraciones de la inmunocitoquímica usando microscopía de luz invertida. Se observan cambios morfológicos como aumento de tamaño, formación de vacuolas y pérdida de adherencia (*Ver figura 16*).

Además, se evaluó la relación del tamaño celular y la intensidad de expresión del receptor. Se observó que a medida que disminuye el tamaño de la célula aumenta su intensidad en la coloración, es decir, la cantidad de proteína HER2. Lo anterior podría asociarse a la sobreexpresión del receptor como medida de supervivencia celular.



*Figura 16. Morfología celular.* (A) Morfología normal, control; (B) vacuolas y aumento de tamaño, 200 $\mu$ mol; (C) vacuolas, 400 $\mu$ mol; (D) vacuolas, 800 $\mu$ mol; (E) vacuolas, 800 $\mu$ mol; (F) pérdida de adherencia 1600 $\mu$ mol; (G) pérdida de adherencia, 3200 $\mu$ mol. Fotografías tomadas por el autor.

## 7 DISCUSIÓN

El principal objetivo de este proyecto fue determinar y analizar la expresión de la proteína HER2 en la línea celular MES-OV de cáncer de ovario, tratadas con diferentes concentraciones de cisplatino. Este es un receptor epidermal que se expresa normalmente en las células epiteliales, y se caracteriza por participar en vías de señalización relacionadas con supervivencia, proliferación, diferenciación, angiogénesis e invasión celular.

Los resultados de esta investigación corroboran la línea celular MES-OV (cistoestenocarcinoma de ovario en estadio III) expresan el receptor HER2; esto concuerda con el estudio realizado por Ajani y cols. (67), quienes hallaron expresión de HER2 en 33 de 90 casos de CO por medio de la técnica IHC especialmente en estadios avanzados (III/IV) de CO. Ellos encontraron correlación entre aumento en la expresión del receptor y el estadio del cáncer, estando más aumentada la proteína HER2 en estadios avanzados.

A pesar que se ha descrito que el cisplatino se asocia a la disminución de las concentraciones intracelulares del glutatión mitocondrial (GSH) y grupos SH unidos a proteínas, lo que inhibe algunas deshidrogenasas y desencadena el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa y la formación de radicales libres, generando estrés oxidativo (38). En este estudio encontramos diferencias en la cantidad de células metabólicamente activas mediante la realización del ensayo de MTT. Se observó microscópicamente que a altas concentraciones de cisplatino se encontraban precipitados de tetrazolio, aunque en menor medida comparada con el control; lo cual indica metabolismo celular activo.

Este estudio muestra que el cisplatino podría inducir cambios moleculares o desvíos de señal relacionados con supervivencia celular, dado que se observó mayor intensidad en la coloración con la técnica de inmunocitoquímica a medida que aumenta la concentración de cisplatino. Esto sugiere cambios en la expresión de la proteína HER2. Estos resultados podrían estar relacionados con lo reportado por Calikuso y cols. (70), quienes encontraron que las células con alta expresión de HER2 muestran resistencia al cisplatino. Adicionalmente, correlacionan la expresión de HER2 con el pronóstico de pacientes con cáncer de pulmón de células pequeñas tratados con cisplatino.

Los resultados sugieren que las células tratadas con cisplatino expresan en mayor concentración la proteína HER2, ya que se observa un comportamiento dosis dependiente. Lo anterior, concuerda con la literatura ya que se ha descrito una correlación entre el nivel de expresión de HER2 y la utilidad del neoplásico. Por ejemplo, Siddik (73), evaluó el comportamiento de células de cáncer de estómago (NCI-N87) con alta expresión de HER2 por medio de la técnica MTT usando diferentes antineoplásicos y encontraron que el cisplatino inhibe la proliferación celular de acuerdo con el grado de expresión de HER2. Esto llevo a concluir que la quimioterapia basada en cisplatino y otros antineoplásicos (doxorubicina, cisplatino, Paclitaxel y 5-FU) debe ser evaluada para cada tipo de tumor dependiendo el grado de expresión de HER2.

De acuerdo con el mecanismo de acción del cisplatino, la formación de aductos de ADN desregula el ciclo celular deteniendo la replicación y transcripción; y por ende, las vías de transducción de señales involucradas en el proliferación, diferenciación y respuesta de estrés celular. St. Germain y cols. (68) demostraron que las vías celulares MAKP y la proteína supresora tumoral p53, presentan funciones claves en el mecanismo de apoptosis y citotoxicidad inducida por cisplatino. Ellos observaron que la línea celular SKOV-3 de ovario presentaba resistencia al cisplatino en concentraciones de 10 $\mu$ M, por disminución en factores pro-apoptóticos. Lo anterior podría asociarse a los resultados encontrados en esta investigación ya que los cambios en la expresión de la proteína HER2 medidos por IHC en células MES-OV mostraron que las células pueden inducir vías de señalización con el objetivo de activar mecanismos de supervivencia.

La sobreexpresión de HER2 se ha visto asociada a mecanismos de resistencia al cisplatino en diferentes canceres como el cáncer gástrico (69), de pulmón, de mama, ovario (4,70,71), entre otros. Diferentes estudios asocian la expresión de HER2 con el pronóstico. Calikusu y cols. (70), relacionan el mal pronóstico con la sobreexpresión de HER2 mediado por una resistencia intrínseca a los agentes citotóxicos que aumentan dicha expresión. Sin embargo, en este estudio se observa una relación directamente proporcional entre la concentración de cisplatino y la expresión de HER2, lo cual podría desencadenar resistencia al medicamento. El estudio realizado por Tuefferd y cols. (4), no encontró correlación entre la quimio resistencia y la expresión de

HER2 en el cáncer. Sin embargo, estos posibles cambios en la expresión de HER2 detectados por ICH deben corroborarse o evaluarse por técnicas “Gold standard” como el Western Blot.

Según Moasser (75), HER2 induce transformación celular mediante diferentes mecanismos como mayor actividad quinasa que desencadena en desregulación de la polaridad y adhesión celular. Esto se correlaciona con cambios morfológicos encontrados en las células MES-OV sometidas a diferentes concentraciones de cisplatino. Adicionalmente, se encontró que estos cambios morfológicos estaban acompañados con un cambio en la expresión del receptor HER2, lo que sugiere que la proteína HER2 participa en mecanismos de supervivencia celular en células tratadas con cisplatino.

Se ha observado amplificación y sobreexpresión de HER2 en algunos tipos de cáncer de ovario epitelial (66); y se ha reportado que HER2 se encuentra sobreexpresado entre un 20-30% de los casos en CO al momento del diagnóstico(74), por lo cual la evaluación de cambios en la expresión de HER2 en la línea celular MES-OV de CO nos permite postular que uno de los mecanismos de resistencia en los pacientes con CO es la activación de vías de señalización de pro-supervivencia que involucre la proteína HER-2

Según Furrer y cols. (69), los diferentes heterodímeros formados con HER2 tienen una lenta internalización, que conlleva a una estimulación prolongada de las vías, y en consecuencia a un crecimiento celular aberrante. Dicha activación aberrante observada en gran medida por la sobreexpresión de la proteína, induce cambios proliferativos que aumenta la invasión y tumorigenicidad de las células epiteliales de mama durante las etapas tempranas de la transformación celular (72). Lo cual correlaciona la sobreexpresión celular del receptor con los cambios morfológicos observados en esta investigación como posible mecanismo para la supervivencia celular.

La familia de proteínas Bcl-2, la proteína supresora tumoral p53 y las vías de señalización intracelular activadas por proteínas quinasas como la PI3K, determinan la supervivencia celular (73,74). Siddik (73) sugiere que la principal causa de resistencia mediada por la expresión de HER2 se asocia a la inactivación de proteínas pro-apoptóticas como Bad y esta forma sé que

disminuye la citotoxicidad celular causada por el cisplatino. Además, menciona que la vías de señalización PI3K/AKT y MAPK se integran para inducir supervivencia o muerte celular dependiente de los factores que se estimulen corriente abajo. Cambios en la expresión de HER2 encontrados en este trabajo podrían estar asociados a mecanismos de supervivencia adoptados por la célula cuando es tratada con cisplatino.

Se ha descrito que este receptor está asociado al mal pronóstico en cáncer de ovario, ya que representa un papel clave en la patogénia y la quimio-resistencia (72). La importancia de tener claro si el receptor se sobreexpresa o no en las células tumorales se basa en que una célula con sobreexpresión de HER2 cuenta con una ventaja frente a la proliferación celular que la hace diferente a las células no tumorales (76). Teniendo en cuenta que la quimioterapia basada en cisplatino es la más utilizada en pacientes con CO en estadios avanzados, y que la posibilidad de recaída en estos pacientes es alta; se puede hipotetizar que el antineoplásico induce la sobreexpresión de HER2 y por consiguiente podría estar relacionado con la quimio-resistencia, el mal pronóstico y baja sobrevida de las pacientes.

En esta investigación, se utilizó la técnica de inmunocitoquímica como medida de tamizaje de expresión de la oncoproteína HER2 en línea celular MES-OV de cáncer de ovario. Aunque existen muchas alternativas para la detección de proteínas como el western blot, PCR, citometría de flujo, entre otras; la IHC es una técnica que se caracteriza por ser específica, de bajo costo y fácil de realizar, a pesar de ser poco sensible (35).

## 8 CONCLUSIONES

- ✓ Se encontró que la línea celular MES-OV de ovario presenta expresión de la proteína HER2 de forma heterogénea. En células MES-OV sin tratamiento 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 como formación de vacuolas, pérdida de adherencia y polaridad celular que se podrían atribuir a posibles mecanismos de apoptosis o supervivencia celular.

## 9 RECOMENDACIONES

Los resultados de esta investigación proporcionan un hallazgo importante, ya que es muestra de que cambios en la expresión del receptor HER2 podrían estar asociados a un mecanismo de supervivencia celular en la línea celular MES-OV tratadas con cisplatino. Sin embargo, estos resultados se deben corroborar con técnicas más robustas que permitan confirmar que el cisplatino induce cambios en la expresión de esta proteína. Diseccionar mecanismos por los cuales el cisplatino podría inducir cambios en la expresión de la proteína HER2, como también las vías de señalización que se activan cuando aumenta su expresión.

Se recomienda analizar el comportamiento de la expresión celular de HER2 frente a otros neoplásicos utilizados en el CO como el carboplatino que presenta menor toxicidad que el cisplatino o el Paclitaxel que es de un grupo diferente. Además, es importante analizar si estos cambios son debidos solo a aumento en la expresión o por la inducción de amplificación del gen.

Por otro lado, teniendo en cuenta las características estructurales de HER2, es importante analizar la expresión de HER3 junto con la de HER2, el cual también se ha visto asociado con la sobreexpresión y el desarrollo tumoral.

## REFERENCIAS

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012: Globocan 2012. *Int J Cancer*. 1 de marzo de 2015;136(5):E359-86.
2. Brett M. R, Jennifer B. P, Thomas A. S, Brett M. R, Jennifer B. P, Thomas A. S. Epidemiology of ovarian cancer: a review. *Cancer Biol Med*. 2017;14(1):9-32.
3. Zhao D, Zhang F, Zhang W, He J, Zhao Y, Sun J. Prognostic Role of Hormone Receptors in Ovarian Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Gynecol Cancer*. enero de 2013;23(1):25-33.
4. Tuefferd M, Couturier J, Penault-Llorca F, Vincent-Salomon A, Broët P, Guastalla J-P, et al. HER2 Status in Ovarian Carcinomas: A Multicenter GINECO Study of 320 Patients. Huang S, editor. *PLoS ONE*. 7 de noviembre de 2007;2(11):e1138.
5. Dr. Josep M<sup>a</sup>. del Campo. Cancer de ovario [Internet]. 2017 [citado 24 de marzo de 2018]. Disponible en: <https://www.seom.org/en/info-sobre-el-cancer/ovario?start=4>.
6. What Are the Risk Factors for Ovarian Cancer? [Internet]. American Cancer Society. 2016 [citado 10 de abril de 2018]. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-ovario/causas-riesgos-prevencion/factores-de-riesgo.html>
7. Webb PM, Jordan SJ. Epidemiology of epithelial ovarian cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. mayo de 2017;41:3-14.
8. Gómez-De Rueda F, Gordon-Santiago Mm, Tena-Sempere Me. Comparación del comportamiento sérico de HE4 y CA125 como marcadores tumorales de cáncer epitelial ovárico. Análisis de doce casos clínicos. *Rev OFIL* 2017. 28 de mayo de 2016;27(1):7.
9. Korkaya H, Wicha MS. HER2 and Breast Cancer Stem Cells: More than Meets the Eye. *Cancer Res*. 15 de junio de 2013;73(12):3489-93.
10. Carretero Marián. Nuevas perspectivas en el tratamiento del cáncer de mama. *OFFARM Revista de la Oficina de Farmacia* [Internet]. junio de 2002 [citado 26 de marzo de 2018];VOL 21(NÚM 6). Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-nuevas-perspectivas-el-tratamiento-del-13033522>
11. Colomer R, Montero S, Ropero S, Menéndez J.A., et al. El oncogén Her2 como ejemplo del progreso diagnóstico y terapéutico en el cáncer de mama. *Rev Senología y patol mam*. enero de 2001;14(1):14:8-19.
12. Schechter AL, Stern DF, Vaidyanathan L, Decker SJ, Drebin JA, Greene MI, et al. The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature*. 1 de diciembre de 1984;312(5994):513-6.

13. Padhy LC, Shih C, Cowing D, Finkelstein R, Weinberg RA. Identification of a phosphoprotein specifically induced by the transforming DNA of rat neuroblastomas. *Cell*. abril de 1982;28(4):865-71.
14. Berchuck A, Kamel A, Whitaker R, Kerns B, Olt G, Kinney R, et al. Overexpression of HER-2/neu is associated with poor survival in advanced epithelial ovarian cancer. *Cancer Res*. 1 de julio de 1990;50(13):4087-91.
15. Estado del HER2 [Internet]. Breastcancer.org. 2016 [citado 15 de marzo de 2018]. Disponible en: <https://www.breastcancer.org/es/sintomas/diagnostico/her2>
16. Wang D, Zhu H, Ye Q, Wang C, Xu Y. Prognostic Value of KIF2A and HER2-Neu Overexpression in Patients With Epithelial Ovarian Cancer: *Medicine (Baltimore)*. febrero de 2016;95(8):e2803.
17. Luo H, Xu X, Ye M, Sheng B, Zhu X. The prognostic value of HER2 in ovarian cancer: A meta-analysis of observational studies. Sun L-Z, editor. *PLOS ONE*. 30 de enero de 2018;13(1):e0191972.
18. Torre LA, Trabert B, DeSantis CE, Miller KD, Samimi G, Runowicz CD, et al. Ovarian cancer statistics, 2018: *Ovarian Cancer Statistics, 2018*. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 29 de mayo de 2018 [citado 28 de junio de 2018]; Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.3322/caac.21456>
19. Plagens-Rotman K, Chmaj-Wierzchowska K, Pięta B, Bojar I. Modifiable lifestyle factors and ovarian cancer incidence in women. *Ann Agric Environ Med* [Internet]. 1 de marzo de 2017 [citado 28 de junio de 2018]; Disponible en: <http://aaem.pl/abstracted.php?level=5&ICID=1233565>
20. Ministerio de Salud y Protección Social - Instituto Nacional de Cancerología, ESE. PLAN DECENAL PARA EL CONTROL DEL CANCER EN COLOMBIA, 2012-2021 [Internet]. 2012 [citado 10 de agosto de 2018]. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/Documentos%20y%20Publicaciones/Plan%20Decenal%20para%20el%20Control%20del%20C%C3%A1ncer.pdf>
21. Cáncer en cifras [Internet]. Instituto Nacional de Cancerología- ESE Colombia (sf). [citado 19 de abril de 2018]. Disponible en: [http://www.cancer.gov.co/cancer\\_en\\_cifras](http://www.cancer.gov.co/cancer_en_cifras)
22. Mora Padilla E, Gutiérrez Rodríguez E. Características de las pacientes con cáncer de ovario en el Hospital de San José, Bogotá D.C., 2009-2013. *Repert Med Cir*. 2016;25(1):15-21.
23. ONLINE ANALYSIS, PREDICTION [Internet]. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2012: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. 2018 [citado 22 de julio de 2018]. Disponible en: [http://globocan.iarc.fr/Pages/burden\\_sel.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/burden_sel.aspx)

24. Redondo Sánchez A, Castelo Fernández B, Gómez Raposo C, Cruz Castellanos P. Cáncer de ovario. Med - Programa Form Médica Contin Acreditado. mayo de 2017;12(34):2024-35.
25. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell. marzo de 2011;144(5):646-74.
26. Vargas AN. Natural history of ovarian cancer. Ecancermedicallscience. 2014;8:465.
27. Kurman RJ, Shih I-M. The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. Am J Surg Pathol. marzo de 2010;34(3):433-43.
28. Taranto F. Cáncer de ovario, protocolo de estudio y tratamiento. Archivos de Ginecología y Obstetricia. 2015;53(3):20-31.
29. Baselga J, Swain SM. Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. Nat Rev Cancer. julio de 2009;9(7):463-75.
30. Ng A, Barker N. Ovary and fimbrial stem cells: biology, niche and cancer origins. Nat Rev Mol Cell Biol. octubre de 2015;16(10):625-38.
31. Ottevanger PB. Ovarian cancer stem cells more questions than answers. Semin Cancer Biol. junio de 2017;44:67-71.
32. Hennessy BT, Coleman RL, Markman M. Ovarian cancer. The Lancet. octubre de 2009;374(9698):1371-82.
33. Junqueira LCU, Carneiro J, González M, Mezzano G. Histología básica: texto y atlas. 2015.
34. American Cancer Society. Pruebas para el cáncer de ovario [Internet]. American Cancer Society. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-ovario/deteccion-diagnostico-clasificacion-por-etapas/como-se-diagnostica.html>
35. Colonia A, Rivera J, Orozco J, Marin D. HER-2: Un marcador molecular usado en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento del cáncer de mama. 2015. 21(1):31-7.
36. American Cancer Society. Tratamiento del cáncer ovárico epitelial invasivo según la etapa [Internet]. American Cancer Society. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-ovario/tratamiento/segun-la-etapa.html>
37. Roche. Tratamiento del cáncer de ovario [Internet]. Roche, pacientes. Disponible en: <https://rochepacientes.es/tratamiento-del-cancer-de-ovario/>
38. Dasari S, Bernard Tchounwou P. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. Eur J Pharmacol. octubre de 2014;740:364-78.
39. Lyu H, Han A, Polsdofer E, Liu S, Liu B. Understanding the biology of HER3 receptor as a therapeutic target in human cancer. Acta Pharm Sin B. julio de 2018;8(4):503-10.

40. Victor A. McKusick. LEUCEMIA ERITROBLÁSTICA AVIAN V-ERB-B2 VIRAL ONCOGENE HOMOLOG 2; ERBB2 [Internet]. 2016 [citado 31 de agosto de 2018]. Disponible en: <http://omim.org/entry/164870#contributors>
41. Gazdar AF, Shigematsu H, Herz J, Minna JD. Mutations and addiction to EGFR: the Achilles 'heal' of lung cancers? *Trends Mol Med.* octubre de 2004;10(10):481-6.
42. Sledge GW, Pegram MD. «Vertical» Inhibition of HER2 Yields Horizontal Gains in the Clinic. *Clin Cancer Res.* 15 de junio de 2015;21(12):2663-5.
43. Cho H-S, Mason K, Ramyar KX, Stanley AM, Gabelli SB, Denney DW, et al. Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature.* febrero de 2003;421(6924):756-60.
44. Burgess AW, Cho H-S, Eigenbrot C, Ferguson KM, Garrett TPJ, Leahy DJ, et al. An Open-and-Shut Case? Recent Insights into the Activation of EGF/ErbB Receptors. *Mol Cell.* septiembre de 2003;12(3):541-52.
45. Hynes NE, MacDonald G. ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Curr Opin Cell Biol.* abril de 2009;21(2):177-84.
46. Olayioye MA. NEW EMBO MEMBERS' REVIEW: The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J.* 3 de julio de 2000;19(13):3159-67.
47. ERBB2 [Internet]. The human protein atlas. [citado 28 de agosto de 2018]. Disponible en: [https://www.proteinatlas.org/ENSG00000141736-ERBB2/tissue#gene\\_information](https://www.proteinatlas.org/ENSG00000141736-ERBB2/tissue#gene_information)
48. Tania Lahera Sánchez T, González Hernández OJ. El receptor del factor de crecimiento epidérmico y su papel en el desarrollo tumoral. *Rev haban cienc méd.* junio de 2010;9(2):172-80.
49. Anido Folgueira J. Nuevos mecanismos de tumorigenesis del protooncogén HER2. Implicaciones terapéuticas en cáncer de mama [Internet] [Doctoral]. [Bienio]: Universidad de Barcelona; 2006 [citado 29 de agosto de 2018]. Disponible en: [http://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/41897/1/JAF\\_TESIS.pdf](http://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/41897/1/JAF_TESIS.pdf)
50. Alberts B. *Molecular biology of the cell.* Sixth edition. New York, NY: Garland Science, Taylor and Francis Group; 2015. 1 p.
51. Sun Y, Liu W-Z, Liu T, Feng X, Yang N, Zhou H-F. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. *J Recept Signal Transduct Res.* 2015;35(6):600-4.
52. De Luca A, Maiello MR, D'Alessio A, Pergameno M, Normanno N. The RAS/RAF/MEK/ERK and the PI3K/AKT signalling pathways: role in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches. *Expert Opin Ther Targets.* abril de 2012;16 Suppl 2:S17-27.

53. Martini M, De Santis MC, Braccini L, Gulluni F, Hirsch E. PI3K/AKT signaling pathway and cancer: an updated review. *Ann Med.* septiembre de 2014;46(6):372-83.
54. Pinzón CE, Serrano ML, Sanabria MC. Papel de la vía fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K/Akt) en humanos. *MayAug* 2009 [Internet]. 7(2). Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1692-72732009000200007](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-72732009000200007)
55. Osaki M, Oshimura M, Ito H. PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis Int J Program Cell Death.* noviembre de 2004;9(6):667-76.
56. Bast RC, Hennessy B, Mills GB. The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation. *Nat Rev Cancer.* junio de 2009;9(6):415-28.
57. Mishra R, Hanker AB, Garrett JT. Genomic alterations of ERBB receptors in cancer: clinical implications. *Oncotarget* [Internet]. 26 de diciembre de 2017 [citado 29 de septiembre de 2018];8(69). Disponible en: <http://www.oncotarget.com/fulltext/22825>
58. Sun Z, Shi Y, Shen Y, Cao L, Zhang W, Guan X. Analysis of different HER-2 mutations in breast cancer progression and drug resistance. *J Cell Mol Med.* diciembre de 2015;19(12):2691-701.
59. Petrelli F, Tomasello G, Barni S, Lonati V, Passalacqua R, Ghidini M. Clinical and pathological characterization of HER2 mutations in human breast cancer: a systematic review of the literature. *Breast Cancer Res Treat.* noviembre de 2017;166(2):339-49.
60. Wen W, Chen W (Sting), Xiao N, Bender R, Ghazalpour A, Tan Z, et al. Mutations in the Kinase Domain of the HER2/ERBB2 Gene Identified in a Wide Variety of Human Cancers. *J Mol Diagn.* septiembre de 2015;17(5):487-95.
61. Chmielecki J, Ross JS, Wang K, Frampton GM, Palmer GA, Ali SM, et al. Oncogenic alterations in ERBB2/HER2 represent potential therapeutic targets across tumors from diverse anatomic sites of origin. *The Oncologist.* enero de 2015;20(1):7-12.
62. José Luis Quirós-Alpizar,<sup>1,2</sup> Isabel Arce-Jiménez<sup>1</sup>, Gabriel Torrealba-Acosta<sup>1</sup>, Ernesto Jiménez-Montero<sup>1,3</sup> y, Raquel Barrientos-Cordero. Detección del receptor tipo 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (her2/neu): inmunohistoquímica en carcinomas de mama. *Enero-Marzo 2015.* 57(1):23-8.
63. Koeppen HKW, Wright BD, Burt AD, Quirke P, McNicol AM, Dybdal NO, et al. Overexpression of HER2/neu in solid tumours: an immunohistochemical survey. *Histopathology.* febrero de 2001;38(2):96-104.
64. MES-OV (ATCC ® CRL-3272™) [Internet]. ATCC. 2016 [citado 8 de agosto de 2018]. Disponible en: [https://atcc.org/en/Products/Cells\\_and\\_Microorganisms/By\\_Tissue/Ovary/CRL-3272.aspx#characteristics](https://atcc.org/en/Products/Cells_and_Microorganisms/By_Tissue/Ovary/CRL-3272.aspx#characteristics)

65. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, et al. Cell Viability Assays. En: Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K, Grossman A, Arkin M, Auld D, et al., editores. Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004 [citado 31 de marzo de 2019]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
66. 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>
67. 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.
68. 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.
69. Huang D, Duan H, Huang H, Tong X, Han Y, Ru G, et al. Cisplatin resistance in gastric cancer cells is associated with HER2 upregulation-induced epithelial-mesenchymal transition. *Sci Rep* [Internet]. abril de 2016 [citado 10 de mayo de 2019];6(1). Disponible en: <http://www.nature.com/articles/srep20502>
70. 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>
71. Zidan J. EGFR and HER2 expression in ovarian cancer compared to clinical and pathological features of the patients. *J Clin Oncol*. 20 de mayo de 2016;34(15\_suppl):e23254-e23254.
72. 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.
73. Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*. octubre de 2003;22(47):7265-79.
74. Zhu X, Zhu H, Luo H, Zhang W, Shen Z, Hu X. Molecular mechanisms of cisplatin resistance in cervical cancer. *Drug Des Devel Ther*. junio de 2016;1885.

## 10 ANEXOS

### 10.1 Anexo 1: Protocolo de inmunocitoquímica

A partir de una caja T-25 con las células confluentes <60%, previamente lavadas y tripsinizadas, se realiza el conteo celular por medio del colorante azul de tripán con la finalidad de determinar una densidad de 5000 células por campo. Se sembraron las células en láminas portaobjetos con campo de reacción con 30µL de medio Mc Coy suplementado con suero fetal bovino al 10% y se incubaron a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> durante 24 horas.

Se verifico el crecimiento de las células en monocapa con una confluencia <60%, se retiró el medio utilizado y se lavaron 2 veces con PBS 1X pH entre 7.2–7.4; posteriormente, se trataron con cisplatino en diferentes concentraciones. Las concentraciones utilizadas fueron 3200µmol, 1600µmol, 800µmol, 400µmol, 200µmol y 100 µmol. Se agregó 30ul de cisplatino a cada pozo a partir de diluciones seriadas y se incubo durante 24 horas a 37°C. La prueba se realizó por duplicado, se utilizaron células sin tratar como control positivo de expresión y se realizó una tinción sin anticuerpo primario como control del anticuerpo secundario. A continuación, se desarrolló el protocolo para la inmunocitoquímica.

1. Fijar: Agregar 30ul de metanol puro durante 30 minutos para fijar las células, dejar en cámara húmeda a 4°C.
2. Inhibir peroxidasa endógena: agregar 30ul de agua oxigenada al 0.4% durante 15 minutos a 4°C.
3. Lavar 3 veces con PBS 1X y dejar 5 minutos en agitación para garantizar el lavado de las células.
4. Bloqueo: agregar solución de bloqueo, SFB 3% en PBS 1X
5. Enjuagar el portaobjetos con PBS1X 2 veces y dejar 5 minutos para asegurar el lavado de las células y retirar la solución de bloqueo.

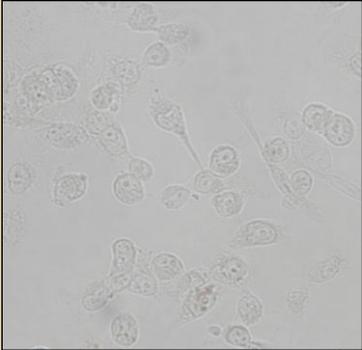
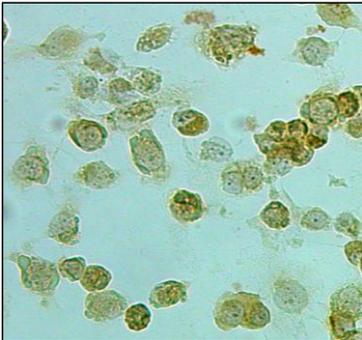
### *Protocolo de tinción*

6. Agregar 30ul del anticuerpo anti-ErbB2 conjugado con HRP, diluido 1:1000 en PBS1X. Incubar en cámara húmeda durante 45-60 minutos a 37°C.

Anticuerpo monoclonal de conejo Anti-ErbB2 Affibody® Molecule (HRP) abc31896, el cual es útil para la elaboración de la técnica inmunohistoquímica en tejidos fijados o congelados. Este anticuerpo tiene como propósito unirse al RTK sin ligando específico, HER2; usualmente expresado en células normales y cancerígenas.

7. Enjuagar el portaobjetos con PBS 1X y dejar 5 minutos para asegurar el lavado de las células
8. Añadir 30ul de anticuerpo secundario biotinilado e incubar durante 10 minutos. Enjuagar el portaobjetos con PBS 1X y dejar 5 minutos para asegurar el lavado de las células
9. Cromógeno DAB: (Añadir 1 gota de reactivo 3A, 1 gota del reactivo 3B y 1 gota del reactivo 3C del kit Histostain de amplio espectro (DAB) (Ref: 959643) en 1mL de H<sub>2</sub>O. Mezclar bien. Proteger de la luz y usar después de una hora) Añadir 30ul del cromógeno e incubar durante 3-5 minutos.
10. Enjuagar el portaobjetos con PBS 1X y dejar 5 minutos para asegurar el lavado de las células
11. Montaje: Anadir 30ul de Histomount al portaobjetos y montar con cubreobjetos. Leer en microscopio de luz (20X).

## 10.2 Anexo 2: Clasificación de acuerdo a expresión e intensidad

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	