



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA EXPRESIÓN DE MUCINAS
DE MEMBRANA Y RECEPTORES TIROSINA CINASA EN
LÍNEAS CELULARES DE CARCINOMA DE CÉLULAS
ESCAMOSAS Y RABDOMIOSARCOMA *IN VITRO*.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

CIRUJANO DENTISTA

P R E S E N T A:

DIEGO ALBERTO BÁRCENAS LÓPEZ

TUTORA: DRA. MARÍA DOLORES JIMÉNEZ FARFÁN

ASESORES: Esp. DULCE DINORA URIBE ROSALES.
Dr. JUAN CARLOS C. HERNÁNDEZ GUERRERO.
Mtra. MARÍA CRISTINA TREJO SOLÍS (INNN, SSA).

MÉXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RESUMEN

Introducción. Las mucinas se encuentran presentes en los diferentes epitelios mucosos y las alteraciones en su expresión han sido observadas en diversos carcinomas. Por otro lado, no existen reportes previos sobre la expresión de mucinas en neoplasias de origen mesenquimatoso. Las mucinas de membrana pueden interactuar con distintos tipos de receptores tirosina cinasa, activando así vías de señalización como la MAPK, PI3K, STAT. Esta activación puede favorecer la proliferación, mayor potencial invasivo, inhibición de la apoptosis, entre otras. **Objetivo.** El presente estudio compara el patrón de expresión de mucinas de membrana y receptores tirosina cinasa (RTK's) en líneas celulares de carcinoma de células escamosas (CCE) y rhabdomyosarcomas (RMS) *in vitro*. Se emplearon tres líneas celulares de CCE de distinto sitio de origen: Cal-27 (lengua), FaDu (hipofaringe), A253 (glándula submandibular), y dos líneas de RMS de distinta tipo histológico: RD (embrionario) y RH30 (alveolar). Mediante las técnicas de inmunocitoquímica (ICQ) e inmunofluorescencia (IF) se realizó un análisis semicuantitativo de la expresión de MUC1, MUC3, MUC4, EGFR, erbB2, erbB3, erbB4 y c-Met, así como su patrón de distribución celular. **Resultados.** La expresión de mucinas incrementó en las células más aberrantes de las líneas celulares analizadas. MUC3 mostró una localización atípica (núcleo y nucléolo) en las líneas FaDu y RD. Asimismo, esta mucina colocalizó con los receptores erbB3 y erbB2, respectivamente. Destaca la expresión de MUC4 en las cinco líneas celulares. Los RTKs más expresados fueron EGFR, erbB2, erbB3 y c-Met, principalmente en las líneas FaDu, A253 y RD. **Conclusiones.** La presencia de mucinas de membrana en células neoplásicas de origen mesenquimatoso como los RMS es un hallazgo interesante, sobre todo por la elevada expresión de MUC3, dada su tendencia a asociarse con erbB2 y erbB3 para disparar señales moleculares más potentes. La presencia de MUC4 en células neoplásicas de CCE y RMS destaca por la relación que se ha observado con el menor grado de diferenciación y peor pronóstico de las lesiones.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	4
2.	ANTECEDENTES	5
2.1.	MUCINAS. GENERALIDADES.....	5
2.2.	MUCINAS DE MEMBRANA Y CÁNCER.	6
2.2.1	Mucinas en carcinomas.....	6
2.2.2.	Glicoconjugados en rabdomiosarcomas.....	9
2.3.	RTKS Y SUS IMPLICACIONES EN EL DESARROLLO DEL CÁNCER.....	9
2.3.1	Familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico (erbB).	9
2.3.2	Receptor c-Met.....	11
2.4.	INTERACCIÓN ENTRE MUCINAS Y RTKS.	13
3.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
4.	JUSTIFICACIÓN.....	16
5.	OBJETIVO	17
5.1.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
6.	HIPÓTESIS.....	18
7.	MATERIALES Y MÉTODO.	19
7.1	LÍNEAS CELULARES Y CONDICIONES DE CULTIVO.	19
7.2	INMUNOCITOQUÍMICA.....	19
7.3	INMUNOFLUORESCENCIA	20
8.	RESULTADOS.....	21
8.1.	EXPRESIÓN INMUNOCITOQUÍMICA DE MUCINAS.....	21
8.1.1	Carcinoma de células escamosas.....	21
8.1.2	Rabdomiosarcoma.....	21

8.2 EXPRESIÓN INMUNOCITOQUÍMICA DE RECEPTORES TIROSINA CINASA (RTK).	24
8.2.1 Carcinoma de células escamosas.	24
8.2.2 Rabdomiosarcomas	24
8.3 INMUNOFLUORESCENCIA.	27
8.3.1 Línea celular FaDu.	27
8.3.2 Línea celular RD.	28
9. DISCUSIÓN	30
10. CONCLUSIONES	35
11. PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN.....	37
12. REFERENCIAS.....	38

1. INTRODUCCIÓN

El epitelio de los órganos del tracto digestivo, respiratorio y genitourinario está constituido principalmente por mucinas. Esta capa proporciona lubricación, hidratación y protección frente a agresiones exógenas y endógenas. Las mucinas constituyen un grupo heterogéneo de glicoproteínas filamentosas de alto peso molecular que presentan un centro proteico al que se unen numerosas cadenas de carbohidratos, los cuales representan más de la mitad de su peso molecular.

Actualmente se reconoce que las mucinas participan en eventos de proliferación y diferenciación epitelial, modulación de la adhesión celular, señalización, así como en la protección contra agentes patógenos. Se ha evidenciado su participación en procesos patológicos como la fibrosis quística, asma y cáncer. La familia de mucinas o MUC se divide en dos grandes grupos: mucinas secretadas y mucinas de membrana. Estas últimas presentan dominios de unión a factores de crecimiento capaces de disparar vías de señalización asociadas con proliferación y muerte celular, así como invasión y metástasis en diferentes tipos de neoplasias.

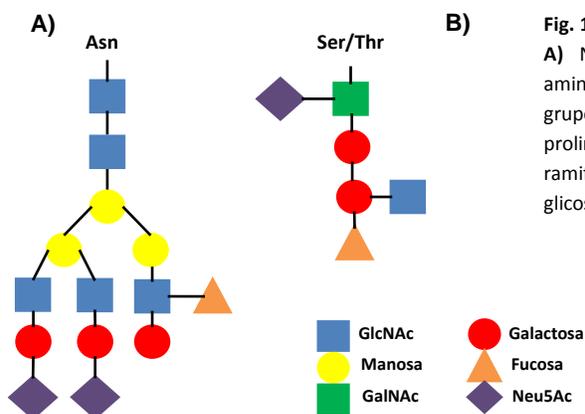
Dado que la expresión de las mucinas es más común en los epitelios, la expresión aberrante de moléculas tipo mucina en neoplasias de origen no epitelial no ha sido estudiada a profundidad. La relación de las mucinas con receptores tirosina cinasa (RTKs) evidenciada en carcinomas ha generado gran interés por entender la importancia biológica de esta relación y su posible efecto en la regulación de la proliferación, evasión de la muerte celular, invasión y metástasis. El conocimiento de la expresión simultánea de moléculas como las mucinas y RTK's en las neoplasias malignas desarrolladas en cabeza y cuello podrá contribuir en un mayor entendimiento acerca de su comportamiento biológico en la búsqueda de un mejor diagnóstico y pronóstico.

2. ANTECEDENTES

El grado de malignidad tumoral se define por algunas características particulares como la proliferación celular excesiva, motilidad e invasividad, la adhesión de las células tumorales al endotelio, la actividad lítica de la matriz extracelular, la angiogénesis y la resistencia a la apoptosis¹. Las glicoproteínas llamadas mucinas poseen funciones de barrera en los epitelios mucosos, participan en la comunicación intercelular y la transducción de señales que conducen a la proliferación y supervivencia celular. La alteración en la expresión de mucinas ha sido identificada ampliamente en diversos tipos de neoplasias².

2.1. Mucinas. Generalidades.

Las mucinas son el mayor componente en epitelios de tipo mucoso, principalmente los que están expuestos a condiciones hostiles como el tracto respiratorio y digestivo². Pertenecen a una familia de proteínas altamente glicosiladas (predominantemente O-glicosiladas) y contienen estructuras oligosacáridas muy complejas (**Figura 1**). Contienen un núcleo polipeptídico lineal denominado apomucina y una porción glicosilada que presenta carbohidratos como fucosa, galactosa, manosa, N-acetilglucosamina (GlcNAc), N-acetilgalactosamina (GalNAc) y ácido siálico (Neu5Ac)³.



Se cree que la condición más básica que las mucinas le otorgan a las células malignas es la de protección, misma que fisiológicamente proporcionan a los epitelios mucosos, con la cual construyen un microambiente molecular que les permite sobrevivir y crecer en sitios distantes². Se ha propuesto que las mucinas otorgan a las células tumorales propiedades antiadhesivas para separarse de su sitio de origen y evadir la respuesta inmune, así como propiedades adhesivas para colonizar otros sitios (**Figura 3**)¹⁰. Se ha demostrado que MUC1 puede mediar fenómenos de adhesión con la molécula ICAM-1¹¹ y otras observaciones muestran el decrecimiento de interacciones célula-célula y célula-sustrato. En algunos carcinomas, la pérdida de adhesión celular facilita que las mucinas lleguen a la circulación sanguínea, formando un cuadro muy útil de marcadores moleculares con aplicaciones clínicas¹².

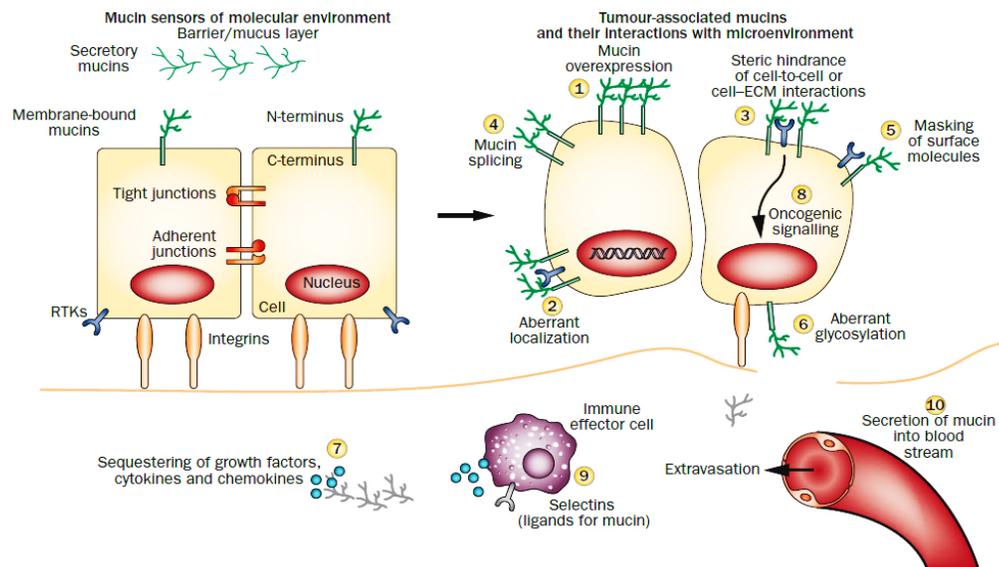


Fig. 3 Funciones de las mucinas en el desarrollo del cáncer. Además de sus funciones protectoras en condiciones fisiológicas, las células cancerosas expresan formas y cantidades aberrantes de mucinas, que les confieren propiedades antiadhesivas, interacciones célula-célula y célula-MEC, secuestro de factores de crecimiento, evasión de la respuesta inmune, y adhesión al endotelio en fenómenos de metástasis (Tomado y modificado de Kaur et al., 2013).

Se ha reportado la sobreexpresión de MUC1 en diversos tipos de carcinomas, en particular displasias de mucosa oral, carcinoma *in situ* y carcinoma oral de células escamosas (COCE). En estas lesiones, el incremento en la expresión de MUC1 se relacionó con grados pobres de diferenciación celular¹³.

La expresión aberrante de MUC4 también ha sido reportada en adenocarcinoma pancreático con un incremento proporcional al crecimiento tumoral; a su vez, el silenciamiento de MUC4 disminuye su motilidad y potencial invasivo¹⁴. Se ha reportado una expresión elevada en tumores de glándulas salivales en relación con grados de diferenciación moderados y pobres. No obstante, algunos resultados contradictorios reportan menor tiempo de recidiva y peor tasa de sobrevivencia en pacientes negativos a la expresión de MUC4⁶. En el COCE se relacionó la expresión de MUC4 con estadios avanzados, metástasis en ganglios regionales y un mayor índice de mortalidad que anteceden a un peor pronóstico, criterios a considerarse en el diagnóstico oportuno de esta malignidad¹⁵.

La mucina 3 o MUC3 (codificada por 2 genes MUC3A, MUC3B) al igual que MUC1 y MUC4 contiene dominios homólogos a la familia del factor de crecimiento epidérmico (EGF) que lo relacionan con el crecimiento, motilidad, diferenciación y división celular². Su expresión también ha sido reportada en diversos carcinomas como el de mama, colon y glándula salival. En glándulas salivales se encontró una diferencia en su expresión, con predominio en el carcinoma de células acinares, pero negativa para otros subtipos como el carcinoma mucoepidermoide¹⁶. En carcinoma de mama se demostró una asociación entre su expresión (intensa y con localización membranar) y estadios avanzados (con infiltración en nódulos linfáticos), además de un incremento en su recurrencia y peor pronóstico¹⁷.

2.2.2. Glicoconjugados en rhabdomyosarcomas.

La información sobre la presencia de glicoconjugados en tumores de origen mesenquimatoso y con relación al grado de malignidad es muy escasa. Existen reportes sobre la presencia de MUC4 en fibrosarcomas de tipo epiteliode esclerosante, como un marcador clínico de elevada especificidad¹⁸. En rhabdomyosarcoma (RMS) humano, estudios con lectinas han demostrado la presencia de moléculas glicosiladas en la superficie celular¹⁹. Existen O-glicanos tipo mucina presentes en mioblastos unidos a la molécula NCAM (glicoproteína perteneciente a la familia de las inmunoglobulinas) en donde regulan funciones fisiológicas de diferenciación²⁰. También existen reportes acerca de la función fundamental en el proceso de metástasis y se ha reportado una relación entre la expresión de ácidos polisiálicos (un antígeno asociado a malignidad) unidos a NCAM y el incremento en sitios de metástasis, mediante la implantación de células de RMS humano en un modelo de ratón²¹. Inclusive, NCAM se ha hallado en el suero de pacientes con estadios avanzados de RMS y, mediante estudios inmunohistoquímicos se demostró una relación entre una expresión intensa y estadios avanzados de la enfermedad²². Debido a los pocos reportes existentes sobre la expresión de mucinas en neoplasias de origen mesenquimatoso, esto representa un área de estudio fértil que puede arrojar información relevante para el mejor entendimiento del comportamiento biológico de este tipo de lesiones.

2.3. RTKs y sus implicaciones en el desarrollo del cáncer.

2.3.1 Familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico (erbB).

La importancia del estudio de los receptores tirosina cinasa (RTK) radica en la capacidad que tienen de inducir una respuesta transcripcional específica por medio de una señal extracelular. Las células neoplásicas utilizan sistemas de transducción de

señales para su crecimiento y proliferación excesivos. Gran parte de estas rutas actúan por medio de factores de crecimiento (EGF, FGF, PDGF y VEGF) que se unen a un receptor que cuenta con un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular con actividad tirosina cinasa²³. La familia de RTKs del factor de crecimiento epidérmico (erbB) constituye una de las más estudiadas y con mayor relevancia clínica. Esta familia se compone de cuatro miembros: EGFR (erbB1), erbB2 (HER2, neu), erbB3 (HER3) y erbB4 (HER4). La activación de estos receptores se debe a su capacidad de formar homo y/o heterodímeros e inducir diversas cascadas de señalización celular como PI3K, MAPK, STAT y fosfolipasa C que regulan actividades de proliferación celular, motilidad, diferenciación y supervivencia²⁴. ErbB2 es el único receptor del cual no se conoce ligando específico, sin embargo, es el preferido para formar heterodímeros con los otros receptores (en especial con erbB3 que carece de actividad tirosina cinasa, pero que bajo estas condiciones es capaz de generar una señal intracelular potente)²⁵ (Figura 4)²⁴.

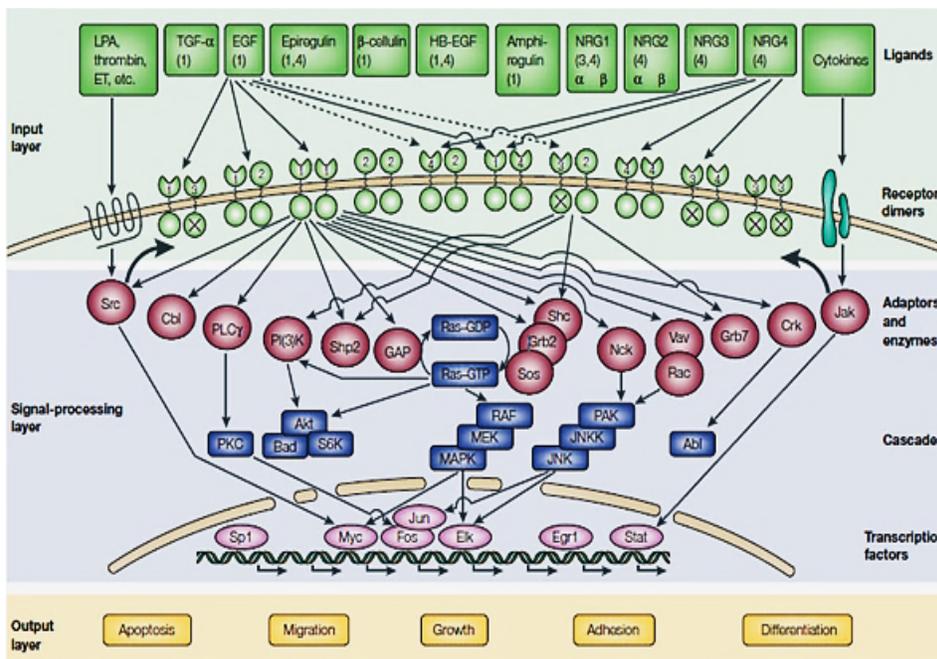


Fig. 4 Familia de receptores erbB con sus correspondientes ligandos, dímeros y algunas proteínas adaptoras y efectoras. No se conoce ningún ligando específico para erbB2, sin embargo posee un dominio de dimerización capaz de interactuar con los demás miembros, entre ellos erbB3, el cual tiene limitada actividad tirosina cinasa intrínseca (tomado y modificado de Yarden *et al.*, 2001).

Existe una amplia cantidad de información que demuestra una alteración en la expresión y activación de RTKs en carcinomas (pancreático, pulmonar, mamario y de cabeza y cuello), varios de ellos ampliamente reconocidos como blanco terapéutico en estadios tumorales avanzados^{26, 27, 28}.

El receptor EGFR es el más estudiado en carcinomas de cabeza y cuello. Los estudios sobre la expresión de EGFR y erbB2 en cortes histológicos de COCE (lengua, labio, encía y laringe) indican su marcada presencia desde estadios tempranos del desarrollo tumoral^{29, 30}. Algunos estudios difieren acerca de la utilización de los TKI's (inhibidores de tirosina cinasa) en líneas celulares de COCE de lengua y glándula salival debido a la resistencia tumoral observada³¹. Sin embargo, otros estudios no descartan su utilización efectiva en tumores de cabeza y cuello³².

A diferencia de los carcinomas, la información sobre el papel que desempeñan los RTKs en sarcomas y en especial la familia erbB es limitada. En líneas celulares de RMS humano (alveolar y embrionario) se ha reportado la expresión de EGFR, erbB2 y erbB3, destacando el incremento en el tipo embrionario^{33, 34, 35, 36}. Debido a que la vía MAPK depende de la fosforilación en cascada de ciertas proteínas, la activación de receptores como EGFR, erbB2 y c-Met se relacionan claramente con la transformación oncogénica, crecimiento tumoral y migración en ambos subtipos histológicos de RMS^{37, 38}.

2.3.2 Receptor c-Met.

c-Met (también llamado HGFR) es un RTK esencial en el desarrollo embrionario y la reparación de tejidos. Posee un dominio extracelular N-terminal unido a una α -hélice transmembranal y una porción C-terminal con actividad tirosina cinasa (**Figura 5**)³⁹. Se activa mediante un ligando específico -el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF)- y resulta en la homodimerización y fosforilación de sus residuos de tirosina, para activar

vías de señalización, como la MAPK, PI3K, STAT y β -catenina. Al igual que otros RTKs, la alteración en su expresión se ha asociado al desarrollo de una amplia variedad de tumores, tanto de origen epitelial como mesenquimatoso³⁹.

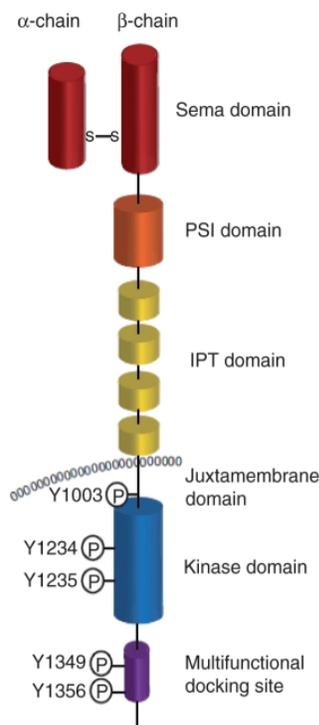


Fig.5 Estructura de c-Met. Posee una porción extracelular que contiene tres dominios: el dominio semaforina en el extremo N-terminal (que comprende las subunidades α y β), seguido del dominio plexina-semaforina-integrina (PSI), y el dominio de transcripción inmunoglobulina-plexina (IPT), unidos a una hélice transmembranal. Intracelularmente contiene dominios tirosina cinasa y sitios de andamiaje que interactúan con proteínas adaptadoras y efectoras de señales cuando se activa (tomado y modificado de Organ *et al.*, 2011).

Existen algunas evidencias de la expresión aberrante de c-Met en el RMS alveolar y embrionario. Esta sobreexpresión se relacionó con un mayor potencial invasivo en líneas celulares de tipo alveolar (el más agresivo y con peor pronóstico)³⁸. Por otra parte, su inhibición indujo la diferenciación de las células y afectó el potencial metastásico⁴⁰.

En cáncer de cabeza y cuello es cada vez más claro que el sistema HGF/c-Met tiene un papel muy importante en el potencial metastásico. Se ha detectado su presencia en múltiples sitios, principalmente en lengua, piso de boca y labio⁴¹. En carcinoma de lengua se encontró una relación entre c-Met y el estadio tumoral, invasividad y metástasis a

nódulos linfáticos^{42, 43}. En otro estudio, c-Met se observó en células metastásicas localizadas en ganglios linfáticos, asociando esta expresión a tumores altamente invasivos⁴⁴.

2.4 Interacción entre mucinas y RTKs.

La importancia de las mucinas de membrana en células tumorales se debe a su gran versatilidad, ya que se involucran en funciones de protección, además de su posible interacción con RTKs. La mayoría de las mucinas de membrana poseen dominios homólogos a EGF, por lo que se cree pueden interactuar con receptores erbB e inducir una amplia variedad de respuestas **(Figura 6)**⁴⁵.

MUC4 puede asociarse con erbB2 gracias a su gran facilidad para dimerizar. Este complejo es capaz de reclutar PI3K para activar erbB3, el cual es conocido por generar una señal muy potente junto con erbB2^{45,46,47}.

MUC1 ha sido asociada principalmente con EGFR en carcinoma pancreático y mamario. Promueve su fosforilación en respuesta a la unión de sus ligandos, lo que desencadena vías como la MAPK^{45, 48, 49}. Por otra parte, se ha observado la asociación entre MUC1 y c-Met en CCE oral y faríngeo con distintos grados de diferenciación⁵⁰, así como el efecto sobre la capacidad de migración de estas células bajo condiciones de inhibición específica⁵¹.

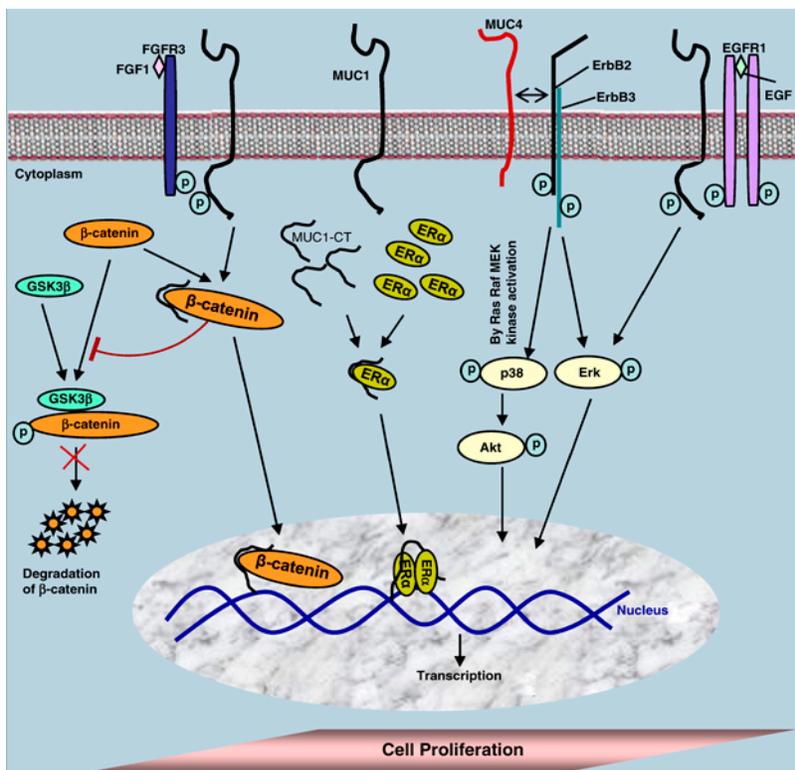


Fig. 6 Algunos mecanismos relacionados entre MUC1, MUC4 y erbB's en la proliferación del cáncer. MUC1 a través de su dominio carboxilo terminal interactúa con EGFR e incrementa la proliferación celular vía Erk. Mediante su dominio C-terminal puede traslocar a núcleo mediante β-catenina. MUC4 interactúa principalmente con erbB2 a través de su dominio homólogo extracelular para activar Erk y Akt. Ambas mucinas se han asociado a eventos antiapoptóticos (tomado y modificado de Bafna *et al.*, 2010).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México, los carcinomas de cabeza y cuello presentan una incidencia aproximada de 2.5% y una mortalidad de casi 1.5% del total de las malignidades⁵². De ellas, el más común es el carcinoma de células escamosas (CCE). Por otra parte, la información sobre la incidencia de rhabdomyosarcomas (RMS) es escasa. Se trata de una de las neoplasias de tejidos blandos más común en niños y adolescentes, representando un 7% de todas las neoplasias malignas en menores de 20 años⁵³.

El CCE oral presenta tres grados de diferenciación, mientras que el RMS presenta tres variantes histológicas. El grado de diferenciación y subtipo histológico son parámetros a considerar al momento del diagnóstico y pronóstico de las neoplasias. A pesar de que se tiene conocimiento sobre la expresión aberrante de mucinas de membrana y su interacción con receptores tirosina cinasa en neoplasias de tipo epitelial, la información de su presencia en sarcomas es insuficiente, por lo que en el presente estudio se plantea investigar si el grado de diferenciación o variante histológica está relacionado con la expresión simultánea de mucinas de membrana y receptores tirosina cinasa (c-Met y familia erbB) en líneas celulares de CCE oral y faríngeo, así como en células de RMS alveolar y embrionario.

4. JUSTIFICACIÓN

El pronóstico y calidad de vida de los pacientes diagnosticados con carcinoma de células escamosas en cabeza y cuello, así como con rhabdomyosarcoma es pobre. Sumado a ello, el diagnóstico tardío y la baja efectividad de los tratamientos empleados generan la necesidad de comprender mejor el comportamiento biológico de estas lesiones, con el fin de encontrar marcadores útiles que permitan realizar diagnósticos oportunos y más precisos. El presente trabajo aporta evidencias acerca de la expresión simultánea de marcadores moleculares glicoproteicos como las mucinas de membrana y los receptores tirosina cinasa erbB y c-Met en lesiones cancerosas de origen epitelial y mesenquimatoso desarrolladas en cabeza y cuello.

5. OBJETIVO

Comparar el patrón de expresión de las mucinas de membrana MUC1, MUC3 y MUC4 y receptores tirosina cinasa c-Met y erbB (EGFR, erbB2, erbB3 y erbB4) en carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello (lengua, hipofaringe y glándula salival) y rabdomiosarcomas (alveolar y embrionario) *in vitro*.

5.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar el patrón de distribución y localización celular de las mucinas de membrana MUC1, MUC3 y MUC4 y, receptores tirosina cinasa c-Met y familia erbB (EGFR, erbB2, erbB3 y erbB4) en líneas de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (oral, hipofaringe y glándula salival) con distinto grado de diferenciación, así como en rabdomiosarcoma (alveolar y embrionario) mediante inmunotinción.

6. HIPÓTESIS

La expresión de las glicoproteínas de membrana MUC1, MUC3 y MUC4 y receptores tirosina cinasa c-Met y familia erbB (EGFR, erbB2, erbB3 y erbB4) está relacionada con el grado de diferenciación del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (oral, hipofaríngeo y de glándula salival) y el subtipo histológico del rhabdomiosarcoma (alveolar y embrionario) *in vitro*.

7. MATERIALES Y MÉTODO.

7.1 Líneas celulares y condiciones de cultivo.

Se utilizaron las líneas celulares Cal-27 (CCE de lengua, bien diferenciado), FaDu (CCE hipofaríngeo, moderadamente diferenciado), A253 (CCE de glándula submandibular, pobremente diferenciado), RD (RMS embrionario) y RH30 (RMS alveolar) de ATCC. Las células fueron sincronizadas y se mantuvieron en una incubadora HECCELL a 37°C, en una atmósfera húmeda, 5% de CO₂, DMEM+SFB10%, con antibiótico-antimicótico y cultivadas en condiciones de esterilidad. Se utilizaron las líneas celulares MCF7 (cáncer de mama carcinoma ductal invasor) como control positivo de mucinas y RTKs.

7.2 Inmunocitoquímica.

Las células fueron cultivadas en DMEM suplementado con 10% SFB, antibiótico, antimicótico e incubadas en las condiciones arriba descritas hasta obtener una monocapa (90%). Las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 1h. Se realizó la recuperación antigénica (buffer de citratos 10 mM, pH 6). Se bloqueó la actividad de la peroxidasa endógena con H₂O₂ al 3% durante 10 min y se incubó con albúmina/PBS 0.1% durante 20 min a temperatura ambiente. Se realizaron lavados con PBS 1x y posteriormente se incubaron con los anticuerpos primarios anti-MUC1, anti-MUC3, anti-MUC4, anti-Met, anti-erbB1, anti-erbB2, anti-erbB3 y anti-erbB4 (dilución 1:300, Sta. Cruz Biotechnology, CA) durante una hora a 4°C en cámara húmeda. Después se realizaron lavados con PBS y se incubaron con un anticuerpo secundario biotilado del sistema Multilink (Dako North America, Inc, Carpinteria, CA) durante 30 min a temperatura ambiente seguido de la incubación con estreptavidina+HRP durante 30 minutos. Se continuó con el revelado con 3'3' diaminobencidina (Dako North America, Inc, Carpinteria,

CA). Las laminillas fueron contrateñidas con hematoxilina de Harris para después montarse con resina hidrofóbica Entellan.

7.3 Inmunofluorescencia

Las células fueron cultivadas en DMEM suplementado con 10% SFB, antibiótico, antimicótico e incubadas bajo las condiciones anteriormente mencionadas hasta obtener una monocapa (90%). Las células se fijaron con paraformaldehído al 4% (500 μ l) a 4°C por 1h. Se realizó la recuperación antigénica con buffer de citratos 10 mM, pH 6 en ebullición por 15 min. Se incubó con albúmina/PBS 0.1% durante 20 min a temperatura ambiente, realizando lavados con PBS 1x y posteriormente se incubó con los anticuerpos primarios anti-MUC1, anti-MUC3, anti-erbB2 y anti-erbB3 solo en las líneas tumorales FaDu y RD (dilución 1:200, Sta. Cruz, CA). Esta incubación se realizó durante 2h en cámara húmeda a temperatura ambiente. Después se realizaron lavados con PBS 1X y se incubó con un anticuerpo secundario con fluorocromo (anti-mouse FITC o anti-rabbit TRITC, dilución 1:200) de Jackson ImmunoResearch durante 1h a temperatura ambiente. Se realizaron lavados con PBS 1x y se montaron las muestras con Vectashield DAPI (Vector). El análisis de triple marcaje se realizó con un microscopio invertido Nikon Diaphotmicroscope (Nikon, Japan) equipado con un sistema de epiluminiscencia y un sistema confocal (Bio-Rad, MRC-1024, Watford, UK). Las imágenes fueron guardadas en una amplificación de 40x y se capturaron en tres canales (verde para FITC, rojo para TRITC y azul para DAPI). Las imágenes se traslaparon usando el ConfocalAssistant 4.02. En el traslape, una imagen en amarillo se interpretó como una colocalización entre los dos marcadores.

8. RESULTADOS

La expresión semicuantitativa y localización celular de las mucinas de membrana MUC1, MUC3, MUC4 y los receptores tirosina cinasa c-Met y familia erbB (EGFR, erbB2, erbB3 y erbB4) se determinó mediante inmunocitoquímica.

8.1. Expresión inmunocitoquímica de mucinas.

8.1.1 Carcinoma de células escamosas.

En la línea celular Cal-27 (carcinoma de lengua) se observa la expresión moderada de MUC1 y MUC4 con un patrón granular en el citoplasma de células en proliferación (**Fig. 7A, C**). Sin embargo, la expresión es negativa para MUC3 (**Fig. 7B**). En la línea celular FaDu (carcinoma hipofaríngeo) se observa expresión perinuclear de MUC1 y MUC4 de manera moderada e intensa, respectivamente (**Fig. 7D y 7F**). La expresión de MUC3 es intensa en citoplasma (**Fig. 7E**), núcleo y membrana celular (**Fig. 8A**). En la línea celular A-253 (adenocarcinoma de glándula submandibular), MUC1 y MUC3 se expresa levemente en citoplasma (**7G y 7H**), y MUC4 de forma moderada también en citoplasma (**Fig. 7I**).

8.1.2 Rabdiosarcoma.

La línea celular RD (RMS embrionario) presenta expresión leve de MUC1 en citoplasma (**Fig. 7J**). A su vez, MUC3 también se expresa en núcleo y citoplasma (**Fig. 7K y 7B**). MUC4 se expresa de forma moderada en citoplasma y a nivel perinuclear (**Fig. 7L**). En la línea celular RH30 (RMS alveolar) se observa un marcaje leve de MUC1 y MUC3 en citoplasma (**Fig. 7M y 7N**). MUC4 se expresa de forma intensa en citoplasma, membrana (**Fig. 7O**).

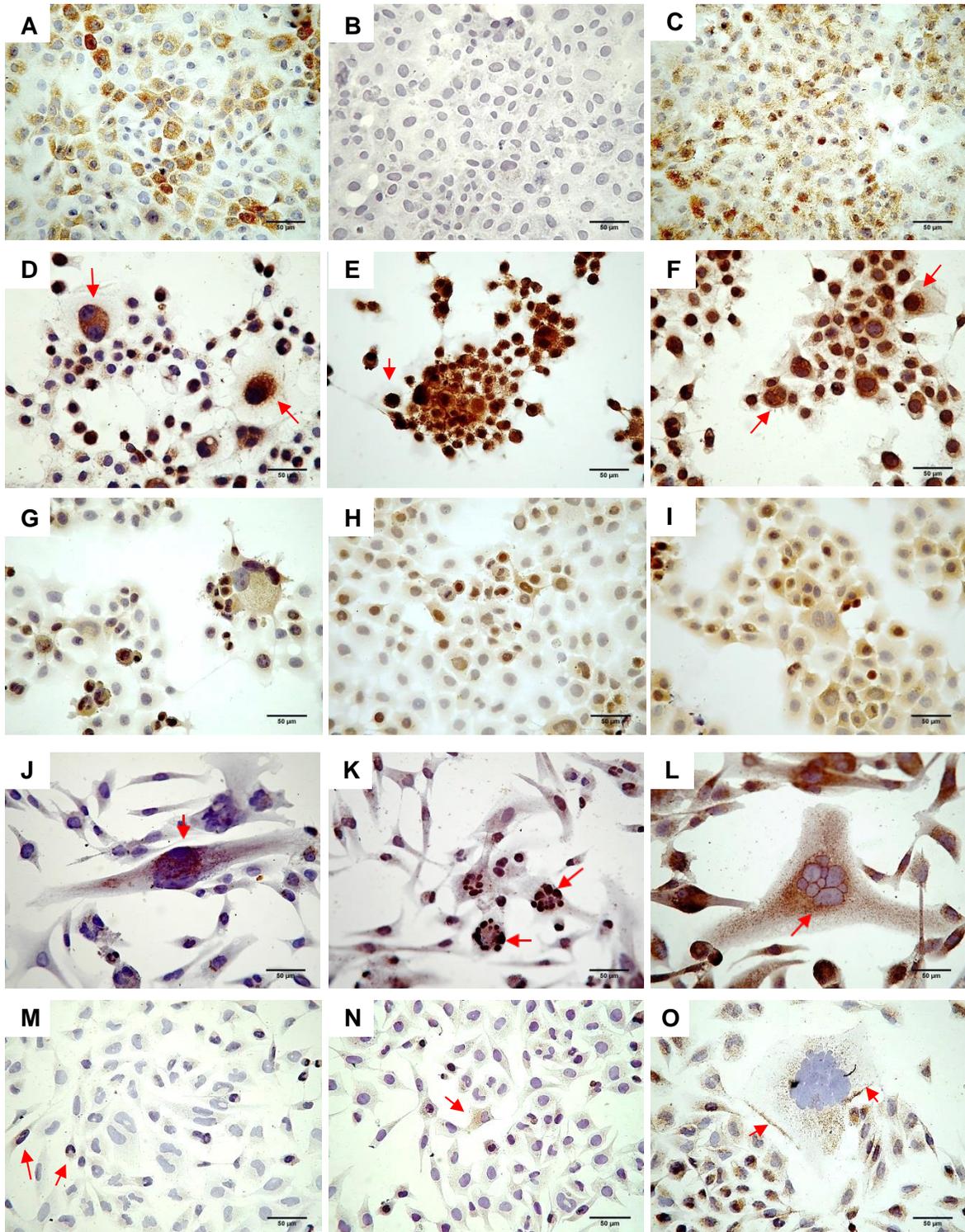


Fig 7. Expresión inmunocitoquímica de mucinas de membrana en líneas celulares de carcinoma de células escamosas y rabdomyosarcoma. Cal-27: Expresión de MUC1 y MUC4 en citoplasma (A, C); no hay expresión de MUC3 (B). **FaDu:** Expresión de MUC1 y MUC4 con localización citoplasmática y perinuclear (D, F); MUC3 se observa en núcleo, membrana y citoplasma (E). **A253:** Presencia de MUC1, MUC3 y MUC4 en citoplasma (G, H, I). **RD:** Presencia perinuclear y citoplasmática de MUC1 y MUC4 (J, L); MUC3 se expresa en núcleo (K). **RH30:** Leve expresión de MUC1 y MUC3 (M, N); expresión intensa de MUC4 en citoplasma y en membrana celular en una posición polarizada (O) (40x. Escala gráfica=50 µm).

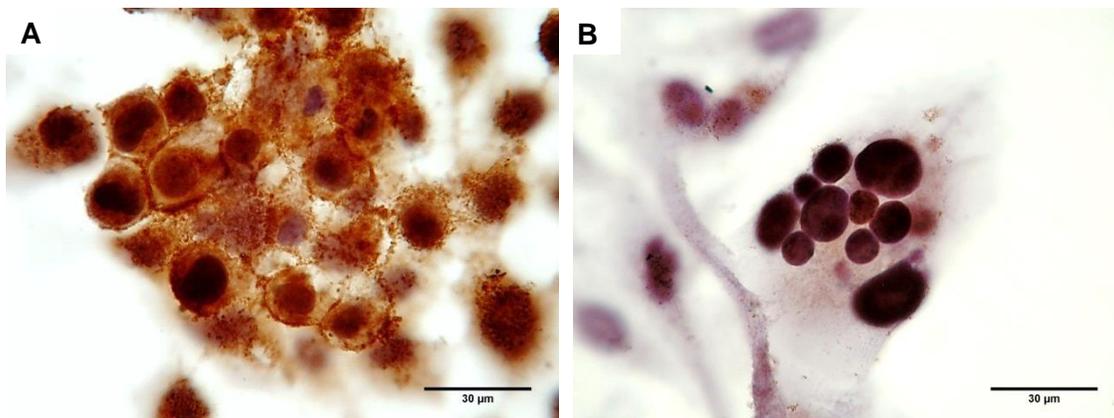


Fig. 8 Expresión inmunocitoquímica de MUC3. Expresión membranal y nuclear en FaDu (A); expresión nuclear de MUC3 en células RD (B) (100x. Escala gráfica=30µm).

TABLA 1. Grado de expresión de MUC1, MUC3 y MUC4 en líneas celulares de carcinoma de células escamosas (Cal-27, FaDu y A253) y rhabdomioma (RD, RH30).

	MUCINAS					
	MUC1		MUC3		MUC4	
	N	C	N	C	N	C
Cal-27	-	++	-	-	-	++
FaDu	-	++ (Pn)	+++	+++ (M)	-	+++ (Pn)
A253	-	+	-	+	-	++
RD	-	+ (Pn)	+	+ (Pn)	-	+++ (Pn)
RH30	-	+	-	+	-	+++ (M)

(N) Núcleo; (C) Citoplasma; (M) Membrana; (Pn) Perinuclear.
 (-) Negativo, (+) Leve; (++) Moderada; (+++) Intensa.

8.2 Expresión inmunocitoquímica de receptores tirosina cinasa (RTK).

8.2.1 Carcinoma de células escamosas.

En la línea celular Cal-27 se observa expresión intensa de EGFR (membrana y citoplasma) y erbB2 (citoplasma) (**Fig. 9A y 9D**). ErbB3 se expresa de forma intensa en citoplasma (**Fig. 9G**) mientras que erbB4 y c-Met se expresan de moderadamente en citoplasma (**Fig. 9J y 9M**). Cabe señalar que esta línea celular presenta numerosas mitosis aberrantes por campo analizado, y la presencia de los cinco marcadores evaluados es más evidente en células en mitosis. En FaDu, los receptores EGFR y erbB3 se expresan de forma intensa en citoplasma, núcleo y nucléolo (**Fig. 9B y 9H**). erbB4 y c-Met mostraron un marcaje intenso solo en citoplasma (**Fig. 9K y 9N**), mientras que erbB2 se expresa moderadamente en citoplasma (**Fig. 9H**). El marcaje es compatible con células de mayor tamaño y multinucleadas. En la línea celular A253, se presentó expresión intensa de EGFR (membrana, citoplasma) (**Fig. 9C**), erbB4 y c-Met (citoplasma) (**9L y 9O**); erbB2 de forma moderada en un citoplasma (**Fig. 9F**) al igual que erbB3, pero este último expresado en citoplasma, núcleo y nucléolo (**Fig. 9I**).

8.2.2 Rabdomiosarcomas

En la línea celular RD se observa expresión moderada de EGFR (membrana) (**Fig. 10A**), erbB4 y c-Met en citoplasma (**Fig 10G y 10I**). Se observa marcaje intenso en citoplasma con erbB2 y erbB3, pero este último expresado además en núcleo y nucléolo (**Fig. 10C y 10E**). Por otra parte, RH30 presenta positividad moderada para los receptores EGFR, erbB2, erbB4 y c-Met (**Fig. 10B, 10D, 10H y 10J**), mientras que erbB3 presenta marcaje leve (**Fig. 10F**); en RH30 los cinco RTK's se expresaron en citoplasma.

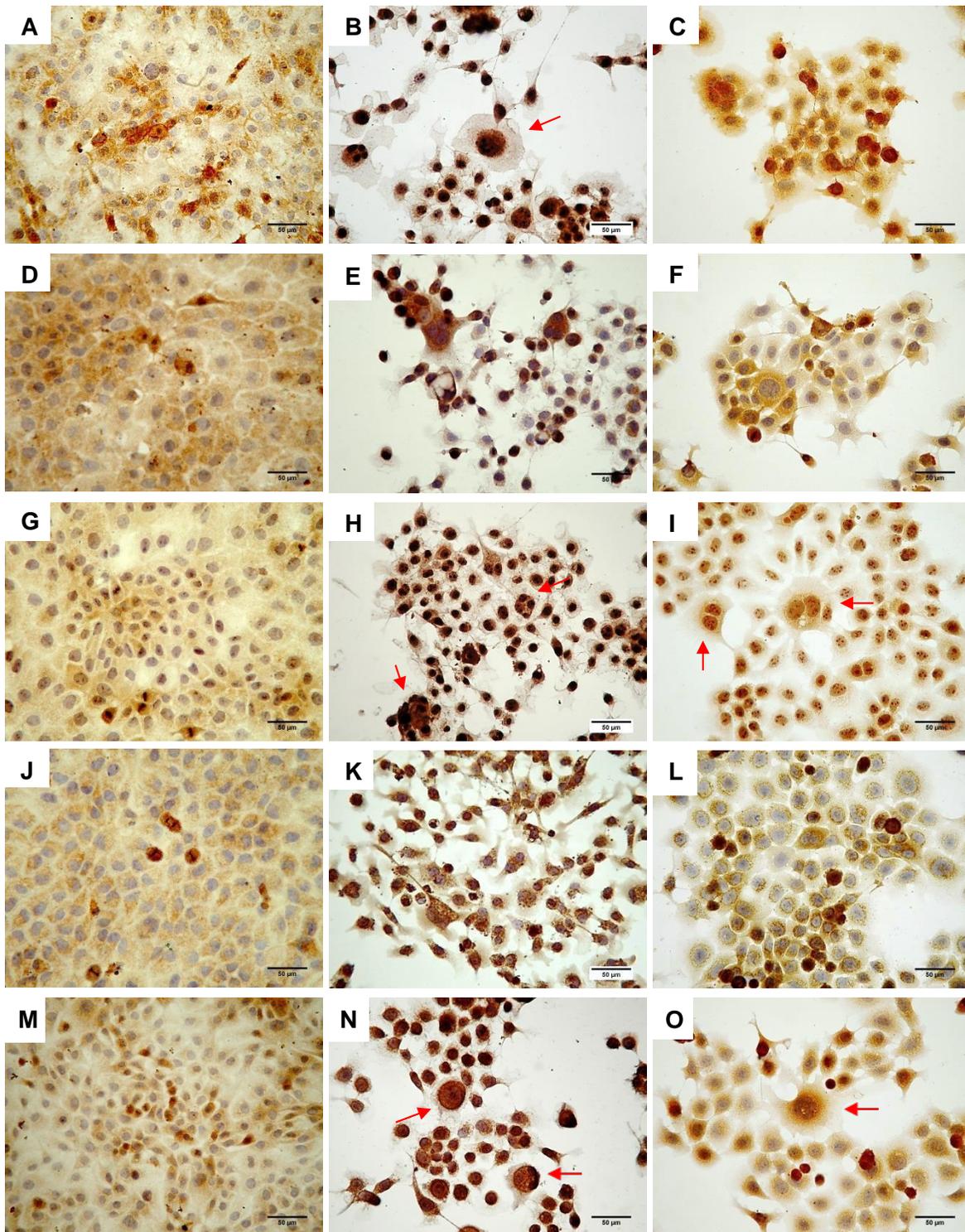


Fig 9. Expresión inmunocitoquímica de receptores tirosina quinasa en líneas celulares de carcinoma de células escamosas. Marcaje membranar y citoplasmático para EGFR (A) y solo citoplasmático en erbB2, erbB4 y c-Met en Cal-27 (D, G, J, M). Expresión citoplasmática de erbB2 y erbB4 en FaDu (E, K); EGFR y erbB3 presenta expresión nuclear y perinuclear (B, H), mientras que c-Met se expresa en citoplasma y en perinúcleo (N). A253 presenta expresión en membrana y citoplasma de EGFR (C), mientras que erbB2, erbB4 y c-Met se observan solo en citoplasma (C, F, L, O); erbB3 se observa nuclear y perinuclear (I). (40x. Escala gráfica=50 µm).

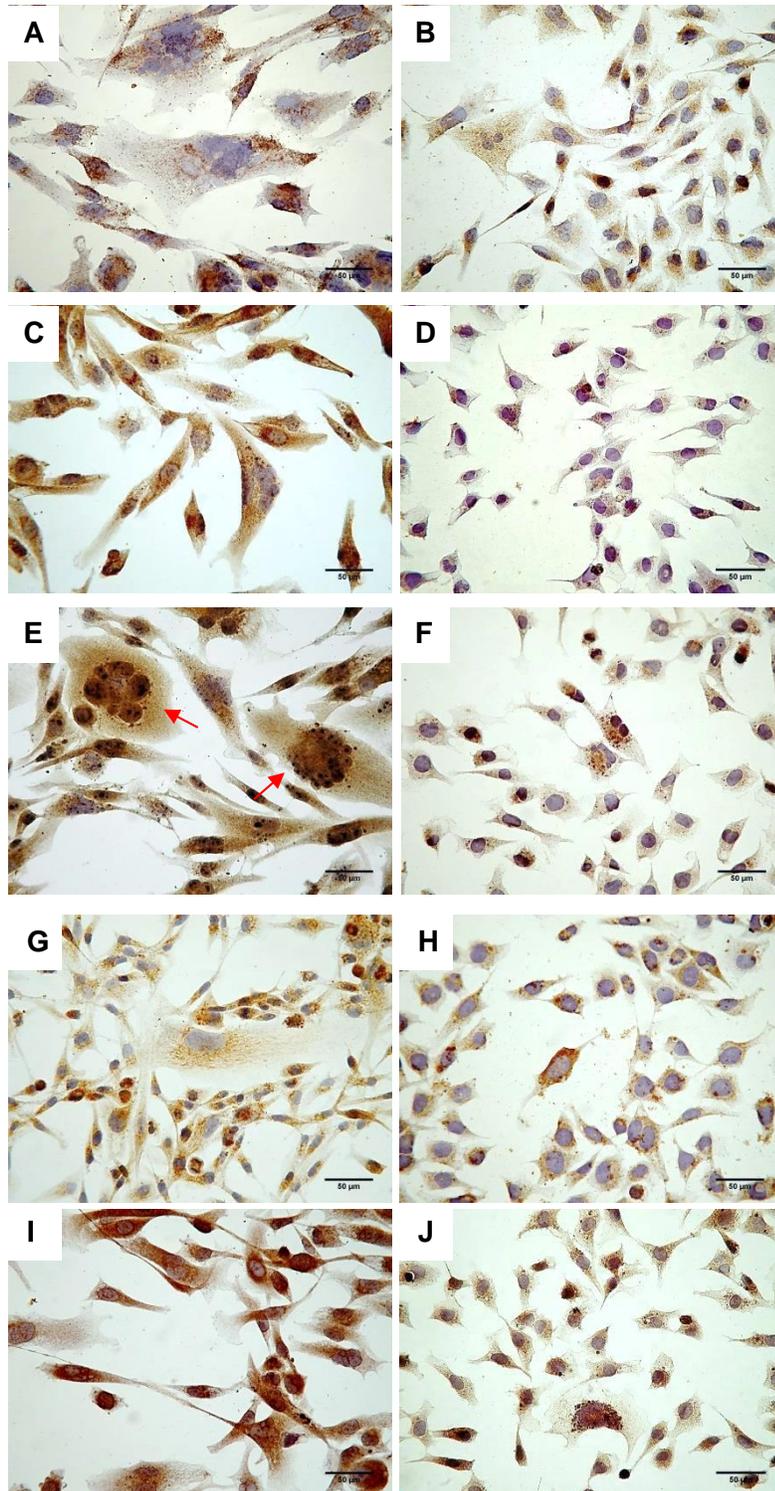


Fig 10. Expresión inmunocitoquímica de receptores tirosina cinasa en líneas celulares de rhabdiosarcoma. En RD, EGFR se expresa en membrana y citoplasma (**A**) mientras que erbB2, erbB4 y c-Met se expresan solo en citoplasma (**C, G, I**); erbB3 se expresa intensamente en núcleo y citoplasma (**E**). RH30 expresa los cinco RTKs (EGFR, erbB2, erbB3, erbB4, c-Met) en citoplasma (**B, D, F, H, J**). (40x. Escala gráfica=50 µm).

TABLA 2. Expresión de EGFR, erbB2, erbB3, erbB4 y c-Met en líneas celulares de carcinoma de células escamosas (Cal-27, FaDu y A253) y rhabdomyosarcoma (RD y RH30).

	RECEPTORES TIROSINA CINASA									
	EGFR		erbB2		erbB3		erbB4		c-Met	
	N	C	N	C	N	C	N	C	N	C
Cal-27	-	+++ (M)	-	+++	+++	+++	-	++	-	++
FaDu	+++	+++ (Pn)	-	++	+++	+++ (Pn)	-	+++	-	+++ (Pn)
A253	-	+++ (M)	-	++	+++	+++ (Pn)	-	+++	-	+++ (Pn)
RD	-	++ (M)	+++	+++	+++	+++ (Pn)	-	++	-	+++
RH30	-	++	-	++	-	+	-	++	-	++ (Pn)

(N) Núcleo; (C) Citoplasma; (M) Membrana; (Pn) Perinuclear.
 (-) Negativo, (+) Leve; (++) Moderada; (+++) Intensa.

8.3 Inmunofluorescencia.

Dado que las líneas celulares FaDu y RD mostraron mediante inmunocitoquímica una localización aparentemente intranuclear (**Tablas 1 y 2**), se decidió corroborar la ubicación específica de MUC1, MUC3 y erbB3 en FaDu y, MUC3 y erbB2 en RD mediante inmunofluorescencia. El objetivo fue visualizar la expresión en cuanto a localización y probable colocalización.

8.3.1 Línea celular FaDu.

Al igual que los resultados obtenidos mediante inmunocitoquímica, se observa el marcaje citoplasmático y perinuclear de MUC1 (**Fig. 11B**). Los núcleos se contratiñeron con DAPI (**Fig. 11A**). La expresión de MUC3 (**Fig. 12B**) y erbB3 se observa en núcleo (**Fig. 12C**).

La colocalización de los dos marcadores nos permite confirmar su presencia nuclear (MUC3 = cian; erbB3=magenta) (**Fig. 12D**).

8.3.2 Línea celular RD.

Se observa presencia citoplasmática y nuclear de MUC3 (**Fig. 13B**), al igual que erbB2 (**Fig. 13C**). Mediante traslape de imágenes se confirma la presencia de MUC3 en núcleo (color cian) (**Fig. 13D**) y colocalización nuclear de MUC3 (verde) y erbB2 (rojo) (**Fig. 13E**).

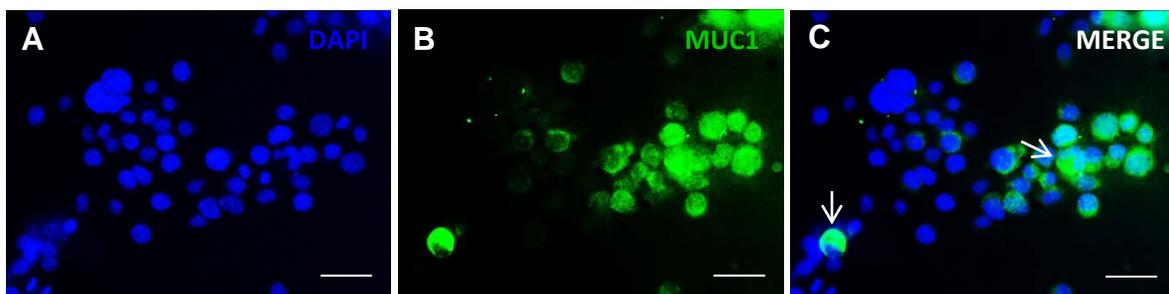


Fig. 11 Inmunofluorescencia con doble marcaje en la línea celular FaDu. Contrateñido nuclear con DAPI (**A**). Expresión citoplasmática (**B**) y perinuclear (**C**) de MUC1. (40x. Escala gráfica=50µm).

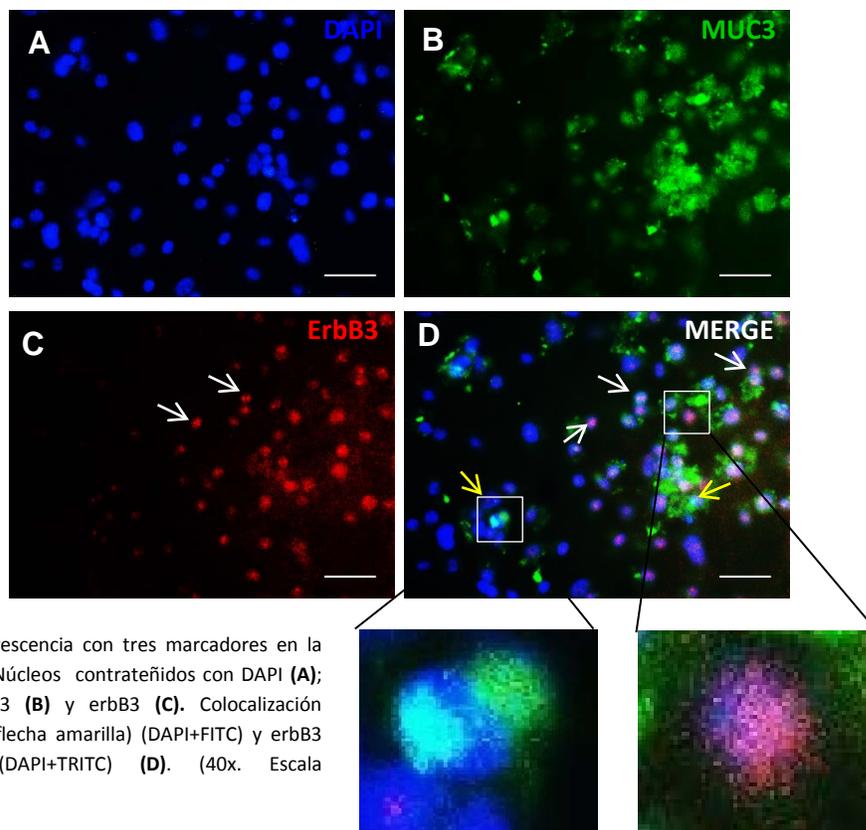
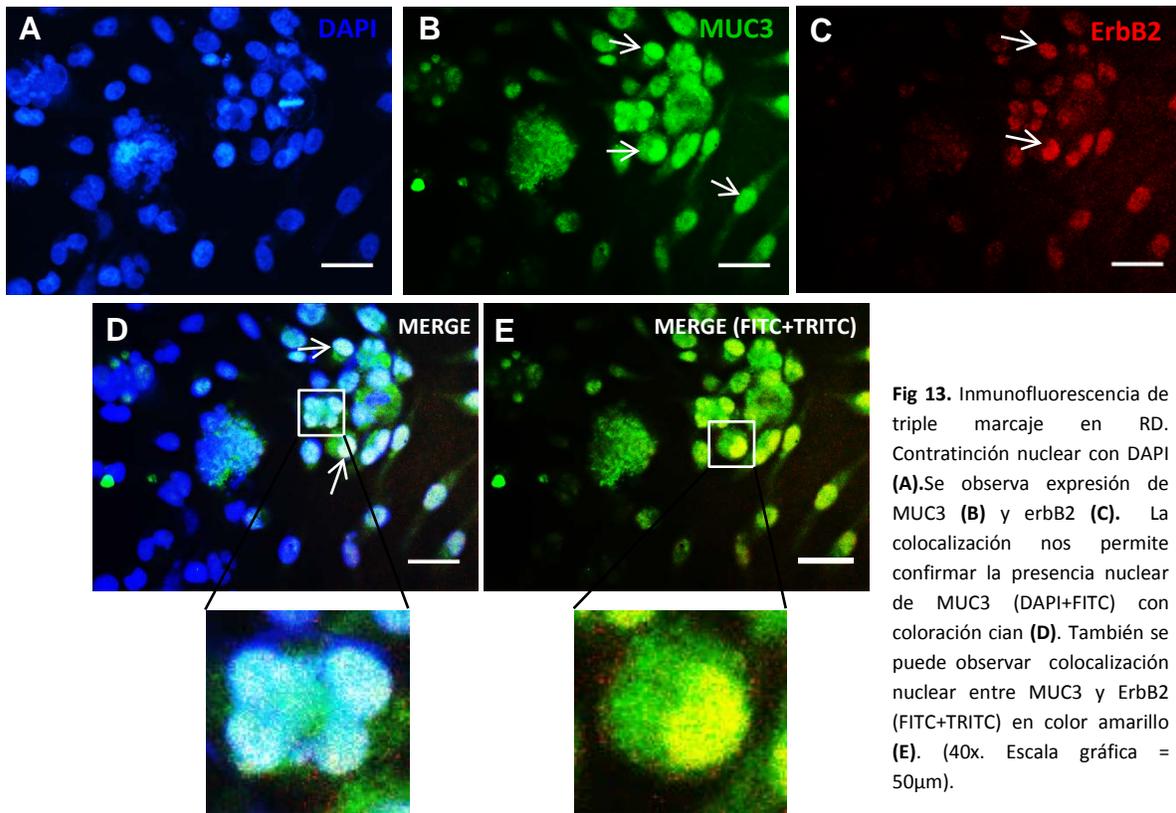


Fig. 12 Inmunofluorescencia con tres marcadores en la línea celular FaDu. Núcleos contrateñidos con DAPI (**A**); expresión de MUC3 (**B**) y erbB3 (**C**). Colocalización nuclear de MUC3 (flecha amarilla) (DAPI+FITC) y erbB3 (flecha blanca) (DAPI+TRITC) (**D**). (40x. Escala gráfica=50µm).



9. DISCUSIÓN

El presente estudio comparó la expresión de mucinas de membrana y receptores tirosina cinasa en líneas celulares tumorales de origen epitelial y mesenquimatoso, y la relación con el sitio de localización y las variantes histológicas que presentan. Se emplearon tres líneas celulares de carcinoma de células escamosas (CCE) de diferente sitio de origen: Cal-27 (lengua), FaDu (hipofaringe) y A253 (glándula salival) así como las líneas celulares RD (embrionario) y RH30 (alveolar) que representan las dos variantes histológicas más comunes de rabdomiosarcoma (RMS). Las alteraciones en la expresión de glicoconjugados como las mucinas ha sido ampliamente reportada en carcinomas, sin embargo, este estudio representa el primer reporte sobre la presencia de mucinas de membrana en neoplasias de origen no epitelial.

Posiblemente la mucina que más se ha estudiado es MUC1, a la cual se le atribuyen propiedades adhesivas, antiadhesivas y de interacción con ligandos por medio de su porción extracelular. Además, su dominio intracelular C-terminal es capaz de interactuar con moléculas de señalización como β -catenina, y proteínas adaptadoras como GRB2/SOS, entre otras^{8, 54}. Existen estudios en carcinomas de cabeza y cuello (incluyendo COCE) y displasias de mucosa oral, que correlacionan la expresión de MUC1 con estadios moderados y pobres de diferenciación^{13, 56}. En nuestro estudio, el patrón de expresión y localización es similar en las tres líneas de carcinoma de células escamosas (CCE). En este sentido, la mayor expresión se observó en las células más aberrantes. Cabe destacar el intenso marcaje en la periferia nuclear, en células de gran tamaño y multinucleadas de la línea celular FaDu. Asimismo, destaca el patrón de expresión y localización de MUC1 y EGFR observado en la misma línea. Este hallazgo es interesante, dado que es la primera vez que se describe este tipo de colocalización en CCE. Se ha

reportado que la distribución de MUC1, especialmente la porción C-terminal o cola citoplasmática puede interactuar con otras proteínas, como el mismo receptor EGFR y su ligando EGF, pudiendo internarse al núcleo a través de un tráfico retrógrado para favorecer la transcripción, gracias a su capacidad de interactuar con moléculas como la RNA polimerasa y con genes como CCND1 y 2⁵⁵.

Por otra parte, MUC3 a diferencia de MUC1 ha sido poco estudiada. Hay evidencias de su expresión en algunos tipos de carcinoma de glándulas salivales¹⁶. En el presente estudio se reporta la presencia de MUC3 en citoplasma de células A253, línea que proviene de un adenocarcinoma de glándula submandibular. Sin embargo, la presencia de MUC3 en FaDu llama la atención, debido a la intensidad del marcaje en núcleo, citoplasma y membrana. Existen estudios que revelan que la localización de MUC3 en membrana celular se asocia con recidiva local y peor pronóstico¹⁷. Aunado a lo anterior, se sabe que el gen hMUC3 puede codificar tanto proteínas solubles como ancladas a la membrana celular y puede sufrir escisión proteolítica de forma similar a como lo hace MUC1, y su interacción con proteínas nucleares facilitaría su internalización⁵⁷, por lo que la expresión nuclear en FaDu es relevante por el comportamiento biológico que puede conferirle a la célula. Por su parte, la línea celular RD presenta expresión leve de MUC3 pero también destaca su localización nuclear y nucleolar, por lo que podría formar parte de un mecanismo de escisión similar al descrito anteriormente⁵⁷. A su vez, MUC3 posee un dominio C-terminal con una secuencia de aminoácidos similar a MUC1 que puede ser reconocida por dominios SH2 de proteínas adaptadoras y de esta forma, se cree que puede ser traslocado al núcleo unido a otras proteínas de señalización como β -catenina y los receptores erbB^{54, 57}. Es sabido que los cuatro receptores de la familia erbB pueden actuar como promotores directos o reguladores negativos de la transcripción génica formando dímeros entre ellos, o con otras proteínas como las mucinas^{48, 55, 58, 60, 61}.

Por su parte, se sabe que MUC4 se expresa en diversos tejidos epiteliales adultos y en células poco diferenciadas de embriones y fetos^{5, 62}, pero las alteraciones en su expresión también han sido ampliamente reportadas en el desarrollo de neoplasias malignas de páncreas, mama, pulmón, entre otras¹⁴. Su presencia en COCE se ha relacionado con grados pobres de diferenciación y mayor potencial de invasión y metástasis^{6, 15}. En el presente estudio, MUC4 fue la más expresada en las tres líneas celulares de CCE analizadas, con un patrón de distribución e intensidad de expresión similar (moderada) en Cal-27 y A253 (citoplasmática). En tejidos con función glandular exócrina, la expresión de mucinas como MUC4 suele ser intensa, y una menor expresión en tumores de glándula salival lo relacionan con un peor pronóstico⁶³.

Por otra parte, FaDu presentó una localización de MUC4 perinuclear y fue ligeramente mayor que A253. La localización observada podría estar relacionada con actividad en el retículo endoplásmico rugoso, debido a la síntesis, almacenamiento y maduración de esta proteína, lo cual coincide con los múltiples núcleos y nucléolos presentes en esta línea celular que denotan una gran actividad proliferativa y de síntesis de proteínas. En un estudio previo se reportó que a menor grado de diferenciación de COCE la expresión de MUC4 era más intensa, lo que coincide con nuestros resultados⁶⁴.

En resultados previos del Laboratorio de Inmunología, se ha evidenciado que la expresión de MUC4 en mioblastos C2C12 es considerablemente menor que lo observado en las líneas empleadas de RMS. De acuerdo a lo anterior, la expresión de MUC4 parece ser importante en el comportamiento biológico de las células musculares inmaduras normales. Estudios previos indican que las propiedades antiadhesivas de MUC4 inhiben el contacto célula-célula (debido en gran medida a su tamaño mayor a 500 kD) y promueven la activación de vías como ERK⁶⁵. Curiosamente, la expresión de MUC4 fue

marcadamente intensa en aquellas células de RMS con más aberraciones, mismas que habían perdido el contacto con las células vecinas.

Otra cualidad de MUC4, es su facilidad para interactuar con RTKs y formar diversos heterodímeros mediante sus dominios extracelulares similares a EGF, y promover la proliferación celular a través de distintas vías. Específicamente, el heterodímero MUC4/erbB2 ha sido ampliamente reportado en carcinomas^{46, 47}. La expresión simultánea de erbB2 y MUC4 en las líneas de CCE analizadas en el presente estudio, reafirman la importancia de ambas moléculas, no solo por su capacidad de dimerizar²⁵, sino como probables potenciadores de funciones biológicas comunes. En un estudio previo se demostró mediante inmunoprecipitación otra asociación, entre EGFR y MUC4 en la línea Cal-27⁶⁴, relación que no había sido reportada hasta el momento en ningún tipo de neoplasia. A su vez, en las líneas de RMS empleadas en nuestro estudio, la incrementada expresión de MUC4 en ambas podría obedecer a una mayor capacidad proliferativa.

Anteriormente se describió la importancia de erbB2 y erbB3, cuyo heterodímero genera una de las señales intracelulares más potentes. Estos receptores también son capaces de formar un tetrámero que involucra MUC4/erbB2/erbB3/neuregulina que puede inducir vías como la MAPK y PI3K, que puede generar resistencia a fármacos inhibidores de erbB2⁶⁶. En nuestro estudio, las cinco líneas celulares de CCE y RMS expresaron en general un marcaje moderado e intenso de erbB2 y erbB3. En RMS, estos dos receptores fueron expresados con mayor intensidad en células RD en comparación de RH30, que interesantemente corresponde al subtipo embrionario, considerado el menos agresivo. Su expresión marcadamente nuclear podría tener implicaciones más bien relacionadas con el potencial proliferativo, más que de invasión o metástasis. Particularmente RH30 mostró

mayor expresión de otros receptores erbB que también son potenciales moléculas para formar heterodímeros, cuya acción no requeriría forzosamente la presencia de erbB3.

Por su parte, el receptor c-Met juega un papel muy importante en fenómenos de invasión en el desarrollo del cáncer. Se sabe que en condiciones fisiológicas participa en procesos tales como la reparación de tejidos y se encuentra frecuentemente activando las vías MAPK, PI3K y STAT³⁹. c-Met ha sido evidenciado en COCE^{41, 42, 43} y en RMS^{38, 40} relacionándolo con un peor pronóstico. En nuestro estudio, la expresión de c-Met se observó en todas las líneas de CCE y RMS con grados moderados a intensos, pero es ligeramente más expresado en la línea RD y en células aberrantes. Es importante recalcar su capacidad de interacción con otras proteínas, al igual que los receptores erbB. Existen reportes sobre su interacción con EGFR⁶⁷ y en reportes previos se ha determinado su interacción con MUC1 y la relación con el potencial invasivo⁵⁰.

10. CONCLUSIONES

Han pasado más de tres décadas desde la aparición de los primeros reportes sobre la efectividad de fármacos inhibidores de RTKs. Desde entonces se ha aportado abundante información sobre la relación de los RTKs con la agresividad tumoral y pronóstico de vida de los pacientes. A su vez, la importancia de los glicoconjugados en el cáncer ha sido también objeto de estudio para el diagnóstico de esta enfermedad.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio, las mucinas de membrana MUC1, MUC3 y MUC4, así como los receptores tirosina cinasa erbB1, erbB2, erbB3, erbB4 y c-Met se presentan en las tres líneas celulares de carcinoma de células escamosas analizadas. Estas líneas representan tres grados distintos de diferenciación celular (de acuerdo al tumor original). Sin embargo, esto no parece ser relevante y más bien podría estar relacionado con la zona anatómica. Lo anterior resulta de lo observado en la línea celular con mayores aberraciones (FaDu) y que corresponde a un carcinoma de células escamosas de hipofaringe, la cual presentó la expresión más intensa de los distintos marcadores. Asimismo, destaca que MUC3 y MUC4, reconocidas por presentarse normalmente en intestino delgado y, tráquea y pulmón respectivamente, hayan sido las más expresadas en este tipo de carcinoma de células escamosas. Por otra parte, en el caso de los RMS, la presencia de mucinas de membrana MUC1, MUC3 y MUC4 y receptores tirosina cinasa erbB1, erbB2, erbB3, erbB4 y c-Met fue evidente en todos los casos en la línea RD y RH30, que corresponden a los subtipos embrionario y alveolar. Sin embargo, se destaca la elevada expresión de MUC3 y MUC4 a nivel nuclear y perinuclear en RD y RH30, respectivamente.

El presente estudio aporta información sobre la presencia de mucinas de membrana y RTKs, así como destaca la presencia de mucinas en neoplasias de origen no epitelial

como los rabdomiosarcomas, lo cual constituye el primer reporte en su tipo. Dada la complejidad de los mecanismos que emplean las células cancerosas para resistir las terapias, los hallazgos obtenidos en este estudio pretenden servir como base y formar parte del conocimiento necesario en futuras investigaciones para el mejor entendimiento de las neoplasias desarrolladas en cabeza y cuello.

11. PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN

- Realizar ensayos de Western Blot para corroborar la presencia de las moléculas estudiadas en el presente estudio.

Agradecimientos.

Este trabajo fue apoyado mediante el proyecto DGAPA-PAPIIT 217912 y SEP-CONACyT 167474.

12. REFERENCIAS

1. Ono M, Hakomori S. Glycosylation defining cancer motility and invasiveness. *Glycoconj J* 2004; 20:71-78.
2. Hollingsworth MA, Swanson BJ. Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4(1):45-60.
3. Bansil R, Stanley E, LaMont JT. Mucin biophysics. *Annu Rev Physiol* 1995; 57:635-57.
4. Gésime JM, Acevedo AM, Lalaguna F. Las mucinas salivales y sus implicaciones en la reología de la saliva humana y los sustitutos salivales. *Acta Odont. Venez* 2009; 47(2): 446-452.
5. Gendler SJ. MUC1, the renaissance molecule. *J Mammary Gland BiolNeoplasia* 2001; 6(3):339-53.
6. Hwang I, Kang YN, Kim JY, Do YR, Song HS, Park KU. Prognostic significance of membrane-associated mucins 1 and 4 in gastric adenocarcinoma. *ExpTher Med* 2012; 4(2):311-316.
7. Barnett AM, Roy NC, McNabb WC, Cookson AL. The interactions between endogenous bacteria, dietary components and the mucus layer of the large bowel. *Food Funct*. 2012; 3(7):690-9.
8. Schroeder JA, Adriance MC, Thompson MC, Camenisch TD, Gendler SJ. MUC1 alters beta-catenin-dependent tumor formation and promotes cellular invasion. *Oncogene* 2003; 22(9):1324-32.
9. Brockhausen I. Mucin-type O-glycans in human colon and breast cancer: glycodynamics and functions. *EMBO Rep* 2006; 7(6):599-604.
10. Kaur S, Kumar S, Momi N, Sasson AR, Batra SK. Mucins in pancreatic cancer and its microenvironment. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 201; 10(10):607-20
11. Hayashi T, Takahashi T, Motoya S, Ishida T, Itoh F, Adachi M, et al. MUC1 mucin core protein binds to the domain 1 of ICAM-1. *Digestion* 2001; 63 Suppl 1:87-92.
12. Jiménez-Martínez MC, Trejo-Márquez H, Herrera-Sánchez A, Romero-Ibarra JL, Chávez R, Lascurain R, et al. Alteraciones de la glicosilación en enfermedades humanas. *RevInstNalEnfRespMex* 2002, 15(1):39-47.

13. Nitta T, Sugihara K, Tsuyama S, Murata F.. Immunohistochemical study of MUC1 mucin in premalignant oral lesions and oral squamous cell carcinoma: association with disease progression, mode of invasion, and lymph node metastasis. *Cancer* 2000. 15; 88(2):245-54.
14. Chaturvedi P, Singh AP, Moniaux N, Senapati S, Chakraborty S, Meza JL, et al. MUC4 mucin potentiates pancreatic tumor cell proliferation, survival, and invasive properties and interferes with its interaction to extracellular matrix proteins. *Mol Cancer Res* 2007; 5(4):309-20.
15. Hamada T, Wakamatsu T, Miyahara M, Nagata S, Nomura M, Kamikawa Y et al. MUC4: a novel prognostic factor of oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2012; 130(8):1768-76.
16. Lee JH, Lee JH, Kim A, Kim I, Chae YS. Unique expression of MUC3, MUC5AC and cytokeratins in salivary gland carcinomas. *PatholInt* 2005; 55(7):386-90.
17. Rakha EA, Boyce RW, Abd El-Rehim D, Kurien T, Green AR, Paish EC, et al. Expression of mucins (MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5AC and MUC6) and their prognostic significance in human breast cancer. *Mod Pathol*. 2005; 18(10):1295-304.
18. Doyle LA, Wang WL, Dal Cin P, Lopez-Terrada D, Mertens F, Lazar AJ, et.al. MUC4 is a sensitive and extremely useful marker for sclerosing epithelioid fibrosarcoma: association with FUS gene rearrangement. *Am J Surg Pathol* 2012; 36(10):1444-51.
19. Su PY, Liu YT, Chang HY, Huang SW, Wang YF, Yu CK, et al. Cell surface sialylation affects binding of enterovirus 71 to rhabdomyosarcoma and neuroblastoma cells. *BMC Microbiol* 2012; 12:162.
20. Suzuki M, Angata K, Nakayama J, Fukuda M. Polysialic acid and mucin type o-glycans on the neural cell adhesion molecule differentially regulate myoblast fusion. *J Biol Chem* 2003; 278(49):49459-68.
21. Daniel L, Durbec P, Gautherot E, Rouvier E, Rougon G, Figarella-Branger D. A nude mice model of human rhabdomyosarcoma lung metastases for evaluating the role of polysialic acids in the metastatic process. *Oncogene* 2001; 20(8):997-1004.
22. Glüer S, Schelp C, von Schweinitz D, Gerardy-Schahn R. Polysialylated neural cell adhesion molecule in childhood rhabdomyosarcoma. *Pediatr Res* 1998; 43(1):145-7.

23. Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins: Patología estructural y funcional. 6a edición, McGraw-Hill Interamericana. 2000, p. 98-101.
24. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2(2):127-37.
25. Baselga J, Swain SM. Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. *Nat Rev Cancer* 2009;9(7):463-75.
26. Patrick C, Gautam M, Christensen J, Salgia C. c-Met: Structure, functions and potential for therapeutic inhibition. *Cancer and Metastasis Rev* 2003; 22: 309-325.
27. Colombo M, Corsi F, Foschi D, Mazzantini E, Mazzucchelli S, Morasso C, et al. HER2 targeting as a two-sided strategy for breast cancer diagnosis and treatment: Outlook and recent implications in nanomedical approaches. *Pharmacol Res.* 2010; 62(2):150-65.
28. Clauditz TS, Gontarewicz A, Lebok P, , Tsourlakis MC, Grob TJ, Münscher A et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) in salivary gland carcinomas: potentials as therapeutic target. *Oral Oncol* 2012; 48(10):991-6.
29. Dragomir LP, Mărgăritescu C, Florescu A, Olimid AD, Dragomir M, Popescu MR. The immunoeexpression of EGFR and Her2/neu in oral squamous carcinoma. *Rom J Morphol Embryol* 2012; 53(3):597-601.
30. Ongkeko WM, Altuna X, Weisman RA, Wang-Rodriguez J. Expression of protein tyrosine kinases in head and neck squamous cell carcinomas. *Am J Clin Pathol.* 2005;124(1):71-6.
31. Box C, Mendiola M, Gowan S, Box GM, Valenti M, Brandon AD, et al. A novel serum protein signature associated with resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in head and neck squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer* 2013 . pii: S0959-8049(13)00213-X
32. Huang Y, Yu T, Fu X, Chen J, Liu Y, Li C, et al. EGFR inhibition prevents in vitro tumor growth of salivary adenoid cystic carcinoma. *BMC Cell Biol* 2013; 14:13.

33. Ricci C, Landuzzi L, Rossi I, De Giovanni C, Nicoletti G, Astolfi A *et al.* Expression of HER/erbB family of receptor tyrosine kinases and induction of differentiation by glial growth factor 2 in human rhabdomyosarcoma cells. *Int J Cancer.* 2000; 87(1):29-36.
34. Ganti R, Skapek SX, Zhang J, Fuller CE, Wu J, Billups CA, *et al.* Expression and genomic status of EGFR and ErbB-2 in alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma. *Mod Pathol.* 2006; 19(9):1213-20.
35. Armistead PM, Salganick J, Roh JS, Steinert DM, Patel S, Munsell M, *et al.* Expression of receptor tyrosine kinases and apoptotic molecules in rhabdomyosarcoma: correlation with overall survival in 105 patients. *Cancer.* 2007; 110(10):2293-303.
36. Grass B, Wachtel M, Behnke S, Leuschner I, Niggli FK, Schäfer BW *et al.* Immunohistochemical detection of EGFR, fibrillin-2, P-cadherin and AP2beta as biomarkers for rhabdomyosarcoma diagnostics. *Histopathology.* 2009; 54(7):873-9.
37. Cen L, Arnoczky KJ, Hsieh FC, Lin HJ, Qualman SJ, Yu S, *et al.* Phosphorylation profiles of protein kinases in alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma. *Mod Pathol.* 2007; 20(9):936-46.
38. Rees H, Williamson D, Papanastasiou A, Jina N, Nabarro S, Shipley J, *et al.* The MET receptor tyrosine kinase contributes to invasive tumour growth in rhabdomyosarcomas. *Growth Factors.* 2006; 24(3):197-208.
39. Organ SL, Tsao MS. An overview of the c-MET signaling pathway. *Ther Adv Med Oncol.* 2011; 3(1 Suppl):S7-S19.
40. Miekus K, Lukasiewicz E, Jarocha D, Sekula M, Drabik G, Majka M, *et al.* The decreased metastatic potential of rhabdomyosarcoma cells obtained through MET receptor downregulation and the induction of differentiation. *Cell Death Dis.* 2013; 4:e459.
41. Freudsperger C, Alexander D, Reinert S, Hoffmann J. Prognostic value of c-Met expression in oral squamous cell carcinoma. *Exp Ther Med.* 2010 ; 1(1):69-72.
42. Kim CH, Koh YW, Han JH, Kim JW, Lee JS, Baek SJ, *et al.* c-Met expression as an indicator of survival outcome in patients with oral tongue carcinoma. *Head Neck.* 2010; 32(12):1655-64.

43. Lim YC, Han JH, Kang HJ, Kim YS, Lee BH, Choi EC, et al. Overexpression of c-Met promotes invasion and metastasis of small oral tongue carcinoma. *Oral Oncol.* 2012; 48(11):1114-9.
44. Cortesina G, Martone T, Galeazzi E, Olivero M, De Stefani A, Bussi M, et al. Staging of head and neck squamous cell carcinoma using the MET oncogene product as marker of tumor cells in lymph node metastases. *Int J Cancer.* 2000; 89(3):286-92.
45. Bafna S, Kaur S, Batra SK. Membrane-bound mucins: the mechanistic basis for alterations in the growth and survival of cancer cells. *Oncogene.* 2010; 29(20):2893-904.
46. Jonckheere N, Skrypek N, Merlin J, Dessein AF, Dumont P, Leteurtre E, et al. The mucin MUC4 and its membrane partner ErbB2 regulate biological properties of human CAPAN-2 pancreatic cancer cells via different signalling pathways. *PLoS One.* 2012;7(2):e32232.
47. Jepson S, Komatsu M, Haq B, Arango ME, Huang D, Carraway CA, et al. Muc4/sialomucin complex, the intramembrane ErbB2 ligand, induces specific phosphorylation of ErbB2 and enhances expression of p27(kip), but does not activate mitogen-activated kinase or protein kinaseB/Akt pathways. *Oncogene.* 2002 ; 21(49):7524-32.
48. Li Y, Ren J, Yu W, Li Q, Kuwahara H, Yin L, et al. The epidermal growth factor receptor regulates interaction of the human DF3/MUC1 carcinoma antigen with c-Src and beta-catenin. *J Biol Chem.* 2001; 276(38):35239-42.
49. Merlin J, Stechly L, de Beaucé S, Monté D, Leteurtre E, van Seuningen I, et al. Galectin-3 regulates MUC1 and EGFR cellular distribution and EGFR downstream pathways in pancreatic cancer cells. *Oncogene.* 2011; 30(22):2514-25.
50. Viveros-Amador C. Probable asociación de MUC1 y C-Met en relación a eventos de proliferación y apoptosis en carcinoma de células escamosas oral y faríngeo *in vitro*. Tesis de maestría. México. 37 págs. DEPel de la Facultad de Odontología UNAM, 2011 .
51. Uchida D, Kawamata H, Omotehara F, Nakashiro Ki, Kimura-Yanagawa T, Hino S, et al. Role of HGF/c-met system in invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma cells *in vitro* and its clinical significance. *Int J Cancer.* 2001; 93(4):489-96.

52. Globocan.iarc.fr/ [Internet]. International agency for research on cancer. World Health Organization, 2008. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp>
53. Ognjanovic S, Linabery AM, Charbonneau B, Ross JA. Trends in childhood rhabdomyosarcoma incidence and survival in the United States, 1975-2005. *Cancer*. 2009; 115(18):4218-26.
54. Wen Y, Caffrey TC, Wheelock MJ, Johnson KR, Hollingsworth MA. Nuclear association of the cytoplasmic tail of MUC1 and beta-catenin. *J Biol Chem*. 2003; 278(39):38029-39.
55. Bitler BG, Goverdhan A, Schroeder JA. MUC1 regulates nuclear localization and function of the epidermal growth factor receptor. *J Cell Sci*. 2010; 123(Pt 10):1716-23.
56. Rabassa ME, Croce MV, Pereyra A, Segal-Eiras A. MUC1 expression and anti-MUC1 serum immune response in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC): a multivariate analysis. *BMC Cancer*. 2006; 6:253.
57. Williams SJ, Munster DJ, Quin RJ, Gotley DC, McGuckin MA. The MUC3 gene encodes a transmembrane mucin and is alternatively spliced. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999; 261(1):83-9.
58. Giri DK, Ali-Seyed M, Li LY, Lee DF, Ling P, Bartholomeusz G, et al. Endosomal transport of ErbB-2: mechanism for nuclear entry of the cell surface receptor. *Mol Cell Biol*. 2005; 25(24):11005-18.
59. Li LY, Chen H, Hsieh YH, Wang YN, Chu HJ, Chen YH et al. Nuclear ErbB2 enhances translation and cell growth by activating transcription of ribosomal RNA genes. *Cancer Res*. 2011; 71(12):4269-79.
60. Andrique L, Fauvin D, El Maassarani M, Colasson H, Vannier B, SéitéP. ErbB3 (80 kDa), a nuclear variant of the ErbB3 receptor, binds to the Cyclin D1 promoter to activate cell proliferation but is negatively controlled by p14ARF. *Cell Signal*. 2012; 24(5):1074-85.
61. Sundvall M, Korhonen A, Vaparanta K, Anckar J, Halkilahti K, Salah Z et al. Protein inhibitor of activated STAT3 (PIAS3) protein promotes SUMOylation and nuclear sequestration of the intracellular domain of ErbB4 protein. *J Biol Chem*. 2012 Jun; 287(27):23216-26.
62. Moniaux N, Varshney GC, Chauhan SC, Copin MC, Jain M, Wittel UA, et al. Generation and characterization of anti-MUC4 monoclonal antibodies reactive with normal and cancer cells in humans. *J Histochem Cytochem*. 2004; 52(2):253-61.

63. Alos, L., Lujan, B., Castillo, M., Nadal, A., Carreras, M., Caballero et al. (2005) Expression of membrane-bound mucins (MUC1 and MUC4) and secreted mucins (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6 and MUC7) in mucoepidermoid carcinomas of salivary glands. *Am. J. Surg. Pathol.* 29, 806–813.
64. Ríos-Magallanes AD. Asociación de MUC4 con el receptor erbB1 en relación a eventos de proliferación y apoptosis en carcinoma oral de células escamosas. Tesis de maestría. México. 50 págs. DEPeI de la Facultad de Odontología, UNAM, 2013.
65. Pino V, Ramsauer VP, Salas P, Carothers Carraway CA, Carraway KL. Membrane mucin Muc4 induces density-dependent changes in ERK activation in mammary epithelial and tumor cells: role in reversal of contact inhibition. *J Biol Chem.* 2006; 281(39):29411-20. Epub 2006 Aug 4.
66. Nagy P, Friedländer E, Tanner M, Kapanen AI, Carraway KL, Isola J, et al. Decreased accessibility and lack of activation of ErbB2 in JIMT-1, a herceptin-resistant, MUC4-expressing breast cancer cell line. *Cancer Res.* 2005; 65(2):473-82.
67. Jo, M. Stolz DB, Esplen JE, Dorko K, Michalopoulos GK, Strom SC. Cross-talk between epidermal growth factor receptor and c-Met signal pathways in transformed cells. *J Biol Chem,* 2000. 275(12): p. 8806-11.

La reproducción parcial o total del presente documento constituye la violación a la Ley Federal de Derechos de Autor (Diario Oficial de la Federación, modificado el 10 de junio de 2013). La cita del presente documento deberá redactarse como sigue:

Bárcenas-López Diego Alberto. Estudio comparativo de la expresión de mucinas de membrana y receptores tirosina cinasa en líneas celulares de carcinoma de células escamosas y rabdomiosarcoma *in vitro*. Tesis de Licenciatura. México. 45 págs. Facultad de Odontología UNAM, 2013.