



27

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

***Determinación de la presencia y fosforilación del receptor
HER2 en células de carcinoma cervical mediante la
técnica de Western Blot.***

Tesis

que para obtener el título de
Químico Farmacéutico Biólogo
presentan:

- América Rocío Santiago Pérez
- Xochitl Moreno Morales

Director: Dr. Julio Roberto Cáceres Cortés
Asesor: Dra. Isabel Soto Cruz.

Febrero de 2004



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.

*Determinación de la presencia y fosforilación del
receptor HER2 en células de carcinoma cervical
mediante la técnica de Western Blot.*

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Oncología de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer, FES Zaragoza, UNAM.

Este proyecto fue apoyado por CONACyT (27880-M)

Agradecemos el apoyo brindado para la realización de ésta tesis a nuestra asesora Dra. Isabel Soto Cruz y a nuestro director de tesis Dr. Julio Cáceres Cortés quienes nos dieron la oportunidad de realizar éste proyecto. Así mismo deseamos agradecer a la Maestra Rosaiva Rangel Corona, Dra. Teresa Corona Ortega, Dr. Jorge Flavio Mendoza Rincón, al Dr. Benny Weiss Steider, Dr. Alberto Monroy, Dra. Lourdes Mora y Dra. Martha Legorreta Herrera por las facilidades que nos dieron a lo largo de éste proyecto.

También deseamos expresar nuestro sincero agradecimiento a nuestros compañeros Arturo Valle y Miriam Nieves por el gran apoyo que nos brindaron durante nuestro trabajo, de la misma manera a todos y cada uno de nuestros compañeros que han trabajado con nosotros.

De igual forma agradecemos a la Q.F.B. Mercedes Zamudio, Q.F.B. Martha Patricia Orozco y Dra. Martha Legorreta quienes amablemente colaboraron con la revisión de ésta tesis.

Agradezco a dios.

A mis padres, hermanos (Gabriel Cuahutemoc Moreno, Israel Moreno), abuelita Cecilia, José Luis, tías, tíos y profesores por el haberme apoyado, aconsejarme durante todo este proceso de aprendizaje para mi formación profesional.

Gracias padres (Violeta Morales, Ruperto Moreno) por todo el apoyo, confianza que me haz otorgado desde que ya sabias que yo venia a este mundo, muchas gracias por todo y mi preparación académica.

Agradezco a Rocío Santiago Pérez por todo su apoyo, confianza, paciencia que me brindo durante el desarrollo de la tesis. Así como el haberme aceptado como su compañera de tesis. A sus padres y hermanos, a Tania y a su esposo por permitimos poder realizar este sueño maravilloso por su paciencia y apoyo hacia Rocío muchas gracias.

Agradezco a los profesores Dra. Isabel Soto Cruz, Dr. Julio Cáceres Cortes, Dra. Teresa Corona, Dra. Rosalva Rangel, Dr. Jorge Flavio y a muchos más por su apoyo y consejos que nos brindaron a Rocío y a mi muchas gracias. Así como todos los compañeros que estuvieron con nosotros en el laboratorio Arturo Valle, Miriam, Eric, Alejandro, Samuel, Claudia,... ..

A todos los compañeros y amigos que siempre han estado con migo muchas gracias por su apoyo y presencia.

Xochitl

Quiero agradecer a mis padres Celestino Santiago y Gloria Pérez quienes me apoyaron incondicionalmente durante toda mi carrera y quienes me impulsaron a seguir adelante para llegar a éste momento.

Además deseo dedicar éste trabajo a mi hija Tania Ivonne quien ha sido el motivo por el cual seguir adelante.

A mis hermanos Lorena, Isaac y Eduardo quienes siempre me ayudaron.

A Miguel, a mi tía Reyna, a Vianey, a mi abuelito Alfredo, a la memoria de mis tres abuelos Margarita, Soledad y Genaro.

A Eslendy y Jessy.

A Xóchitl con quien compartí el trabajo todo éste tiempo.

A todas aquellas personas que en algún momento me brindaron una palabra de aliento.

Rocío

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
MARCO TEÓRICO	
Generalidades de Cáncer	3
Cáncer de mama.....	4
Cáncer de cérvix.....	6
Factores de crecimiento y sus receptores.....	7
Estructura proteica de HER2.....	10
Expresión de HER2 en tejidos normales.....	11
Sobre-expresión de los receptores HER.....	12
Fosforilación en tirosina.....	13
Receptores de citocinas y transducción de señales	
Vía de señalamiento dependiente de <i>ras</i>	14
Vía de señalamiento <i>Jak/Stat</i>	15
Bloqueadores tirosina cinasa y desfosforilación de la tirosina.....	15
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	18
OBJETIVOS.....	19
HIPÓTESIS.....	19
POBLACIÓN.....	20
VARIABLES.....	20
MATERIAL.....	21
CRITERIOS.....	23
MÉTODOS.....	24
RESULTADOS.....	28
DISCUSIÓN.....	52
APORTACIONES.....	55
ANEXO1.....	56
BIBLIOGRAFÍA.....	60

RESUMEN

El receptor HER2/neu está altamente relacionado con el grado de malignidad en el cáncer de mama, pero también ha sido encontrado en carcinoma de ovario, matriz, estómago e intestino entre otros, por lo que el presente trabajo se realizó con la finalidad de analizar si la sobre-expresión de HER2 en células de carcinoma cervical está involucrada en el desarrollo de la enfermedad.

Partiendo del hecho de que es una proteína con actividad intrínseca de tirosina cinasa de la familia del receptor de crecimiento epidérmico (EGFR), consideramos que sería posible evitar o disminuir la autofosforilación del receptor usando fármacos inhibidores de la actividad de tirosina cinasa (tirfostinas) y así evaluar qué efecto tendría esto sobre la proliferación celular descontrolada característica de las células cancerosas.

Se realizaron ensayos para evaluar la proliferación celular de las líneas celulares de carcinoma cervicouterino CALO, HeLa e INBL, las cuales sobreexpresan el receptor HER2, cultivadas en presencia de las siguientes tirfostinas: 25, B42, B44, B46, B48, B50 y B56. La tirfostina B42 resultó ser un inhibidor muy efectivo de la proliferación celular a una concentración de 0.048 μ M.

Con la finalidad de determinar qué efecto tiene la tirfostina B42 sobre la fosforilación intrínseca de HER2, se cultivaron las células en presencia de la concentración que indujo mayor inhibición de la proliferación. Se inmunoprecipitó la proteína, se separó mediante electroforesis SDS-PAGE, y se determinó el efecto sobre la fosforilación mediante inmunoblot. Los resultados muestran que la tirfostina B42 inhibe la fosforilación del receptor. Estos resultados indican que la tirfostina B42 podría ser un posible candidato para desarrollar un tratamiento efectivo contra el cáncer cervicouterino.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama y el cervicouterino son dos de las principales causas de muerte en la mujer mexicana por lo que se han realizado infinidad de estudios sobre éstas neoplasias.

En las células de carcinoma mamario se ha detectado la sobre-expresión de un receptor de membrana llamado HER2, el cual es parte de una familia de receptores análogos al receptor del factor de crecimiento epidérmico, que están involucrados en la trasmisión de señales que controlan el crecimiento y diferenciación de las células normales. La sobre-expresión del receptor está asociada a la amplificación, del gen neu.

Aproximadamente entre el 20%-30% de los carcinomas de mama sobre-expresan el receptor HER2, y estos se asocian a un pronóstico desalentador en las pacientes ya que se encuentra ligado a un crecimiento tumoral más agresivo y alta actividad metastásica.

HER2 es un factor de crecimiento epidérmico que es activado mediante una cascada de reacciones llevadas a cabo por diferentes moléculas que forman parte de circuitos transductores de señales existentes en el citoplasma. Cuando se presenta una sobre expresión de factor de crecimiento como HER2 se induce un aumento en la tasa de crecimiento interrumpiendo el control de la proliferación, induciendo un proceso de transformación maligna.

El cáncer cervicouterino se encuentra asociado a la presencia del virus del papiloma humano (VPH) sobre todo a los tipos 16 y 18 y se ha observado que las células que proliferan en cultivos disminuyen su crecimiento en presencia de inhibidores de tirosina cinasa.

Debido a que la familia de receptores HER o ErbB2 son proteínas con actividad de tirosina cinasa se cree que algunos carcinomas cervicales sobre-expresan el receptor HER2 en alguna proporción.

Con el fin de demostrar éstas aseveraciones se utilizaron líneas celulares de cáncer cervical HeLa, CALO e INBL para aislar el receptor y determinarlo usando la técnica de Western Blot.

MARCO TEÓRICO

Generalidades de cáncer.

El cáncer representa un grupo de enfermedades caracterizadas por la multiplicación incontrolada y anárquica de ciertas células en el organismo. Estas células malignas son a menudo diferentes de las células normales. Presentan anomalías de estructura y de comportamiento según el tipo de células afectadas, se identifican porque están marcadas por la aparición en su superficie de ciertas sustancias particulares, llamadas "antígenos tumorales" que no existen en las células normales.

Una característica fundamental de casi todos los cánceres es que se originan a partir de una célula única debido a alteraciones en el DNA que provocan una proliferación celular desenfrenada. La mayoría de estas alteraciones implican cambios en la secuencia real del DNA. Estos pueden originarse como consecuencias de errores aleatorios de repetición, exposición a carcinógenos o defectos en los procesos de reparación del DNA₍₁₎.

Los cánceres son el producto de mutaciones que liberan a las células de los controles habituales de proliferación y de supervivencia. Una célula del organismo muta por una serie de accidentes al azar y adquiere la capacidad de proliferar sin los impedimentos normales. Su progenie hereda las mutaciones y da lugar a la formación de un tumor que puede crecer ilimitadamente.

Las mutaciones que dan lugar a células cancerosas afectan a dos amplias categorías de genes; los genes de proliferación; los cuales codifican proteínas que normalmente ayudan a estimular la división celular y los genes de antiproliferación; los cuales codifican proteínas que ayudan a aplicar los frenos que detienen el ciclo celular en los puntos de control₍₁₎.

Una mutación en un gen de proliferación hace que se sobre-exprese la proteína producida por el gen o aumente su actividad, dando como resultado una multiplicación celular excesiva. Entonces, el gen mutante se denomina oncogén mientras que el gen normal se conoce como protooncogen. Por el contrario, una mutación que inactiva un gen de antiproliferación puede liberar a la célula de los controles normales de la multiplicación celular, por lo que el resultado también es una proliferación celular excesiva. Por ello, con frecuencia, a los genes de antiproliferación presentes en las células normales se les denomina genes supresores de tumores.

En una célula diploide normal hay dos copias de cada gen supresor de tumores; generalmente, para que la célula pierda el control de la proliferación hace falta que se pierdan o se inactiven ambas copias del gen, de manera que generalmente una sola copia es suficiente para regular normalmente el ciclo celular, por el contrario, para causar un efecto similar, es suficiente que una sola copia de un protooncogen mute a oncogen.

Las anomalías en la expresión, estructura o actividad de los productos del protooncogen contribuyen al desarrollo y mantenimiento del fenotipo maligno⁽²⁾.

Los genes mutados, pueden facilitar la producción de cáncer al estimular a las células a proliferar incluso en ausencia de las señales extracelulares apropiadas.

Es poco probable que la pérdida de un alelo pueda desarrollar una mutación ya que el alelo normal restante suele ser suficiente para mantener la función normal. Por lo tanto, la mayoría de las células de un individuo con una pérdida heredada de la función de un alelo supresor tumoral son funcionalmente normales, únicamente la célula que pierda o desarrolle una mutación en la copia restante tendrá un crecimiento incontrolado.

La tercera categoría de genes que contribuyen a la malignidad está formada por los genes de reparación del DNA. Cada división celular supone la copia de 6000 millones de pares de bases de DNA. La polimerasa de DNA tiene una tasa definida de errores y muchas influencias ambientales pueden dañar el DNA; como consecuencia, los sistemas de reparación son esenciales para proteger la integridad del genoma. Cuando los propios sistemas de reparación son afectados como resultado de una mutación heredada o adquirida, la tasa de acumulación de mutaciones a lo largo del genoma se eleva a medida que se producen divisiones celulares. Según el grado en que estas mutaciones afecten a oncogenes y genes supresores de tumores, aumentará la probabilidad de padecer neoplasias malignas⁽¹⁾.

Las células normales se transforman en cancerosas porque sufren alteraciones en el genoma que se transmiten a las sucesivas generaciones celulares y que se expresan mediante un conjunto de alteraciones secundarias tanto estructurales como funcionales. Para que aparezca el cáncer deben producirse mutaciones que afecten a diversas vías. Con frecuencia se encuentra afectado el punto de control G₁ del ciclo celular y la expresión de telomerasa una característica frecuente de los cánceres. A menudo se detecta sobre-expresión de factores de crecimiento y sus receptores. Es frecuente la activación del protooncogen ras u otras alteraciones que conducen a una cascada de cinasas MAP, los cambios en el citoesqueleto y la ausencia de inhibición del crecimiento por contacto⁽¹⁾.

La concentración de un antígeno normal aumenta en los tumores, a estos antígenos se les denomina "antígenos asociados al tumor" (AAT). La alteración antigénica es a veces más drástica porque ocurre un cambio cualitativo que se manifiesta por la aparición de un nuevo antígeno extraño al huésped, a estos neoantígenos se les denomina "antígenos específicos de tumor" (AET) y en algunas ocasiones se encuentran en estructuras intracelulares, como el citoplasma o el núcleo y otras en estructuras de la nueva superficie celular⁽¹⁾.

Cáncer de mama

El cáncer de mama representa una proliferación maligna de las células epiteliales que revisten los conductos o lobulillos mamarios. Es una enfermedad

clonal, ello quiere decir que una sola célula transformada es el resultado final de una serie de mutaciones somáticas (adquiridas) o de la línea germinal (heredadas) capaz de expresar todo el potencial maligno en una serie de sucesos que se producen de forma secuencial y aleatoria, por lo tanto, puede existir por un largo periodo como enfermedad no invasora o como enfermedad invasora pero no metastásica⁽³⁾.

Es probable que solo aproximadamente el 10 % de los cánceres de mama humanos estén relacionados de forma directa con mutaciones de la línea germinal. Esta área ha experimentado una notable evolución con la identificación de varios genes responsables de los casos familiares. La primera mutación identificada fue la mutación de la línea germinal del gen supresor de tumores p53⁽³⁾.

Aproximadamente el 40 % de los cánceres de mama humanos presentan una mutación adquirida del gen p53⁽³⁾.

En el trastorno provocado por estas mutaciones, denominado síndrome de Li-Fraumeni, las mutaciones heredadas del gen p53 aumentan la incidencia de cáncer de mama, osteosarcomas y otros tumores malignos⁽³⁾.

Otro probable gen supresor de tumor es el BRCA-1 que se ha identificado en el locus cromosómico 17q21, este gen codifica una proteína con dominio de dedos de zinc y su producto puede, por lo tanto, funcionar como factor de transcripción. Las mujeres que heredan un alelo mutado de este gen de cualquiera de sus progenitores tienen un riesgo aproximado del 85 al 90 % de padecer cáncer de mama a lo largo de su vida⁽⁴⁾.

Un tercer gen, denominado BRCA-2, que se ha localizado en el cromosoma 11, se asocia con un aumento de la incidencia de cáncer de mama⁽⁴⁾.

Por otro lado, en casos esporádicos de cáncer de mama parecen haberse perdido otros genes de actividad supresora de tumores, como se pone de manifiesto por la pérdida de heterocigosidad. Finalmente, el oncogén dominante llamado *c-erb-b2* (también llamado HER2-neu o gen neu) está implicado en la cuarta parte de los casos de cáncer de mama humano. El producto de este gen, un miembro de la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico denominado erbB2(HER2-neu), se expresa de forma excesiva en muchos casos de cáncer de mama debido a una amplificación del gen neu y esta sobre-expresión puede transformar el epitelio mamario humano, dando lugar al proceso maligno⁽⁵⁾. La proteína HER2 es un miembro de la familia del receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico de tipo I y, al igual que éste posee actividad intrínseca de tirosina cinasa, aunque su posible ligando no ha sido identificado⁽⁶⁾. La amplificación del oncogene neu o la sobre-expresión de la proteína HER2 se ha encontrado en el 20-30 % de los tumores⁽⁷⁾, se ha mostrando incremento en el número de copias del gen de 2 a más de 100 veces del número normal⁽⁸⁾, aunque la sobre-expresión no siempre es resultado de la amplificación, en algunos casos se debe a irregularidades transcripcionales o postrcripcionales⁽⁶⁾.

Cáncer de cérvix

El cáncer cervicouterino es la primera causa de muerte en mujeres mexicanas. La etiología de esta neoplasia no está bien definida, pero se han reconocido ciertos factores de riesgo, es mucho más frecuente entre las mujeres que están en edad reproductiva que en las posmenopáusicas y se presume que la actividad sexual incrementa la frecuencia del padecimiento en forma importante, sobre todo entre las mujeres que inician su vida sexual antes de los 16 años de edad⁽⁸⁾.

En América latina se ha registrado una mayor incidencia de cáncer cervicouterino entre los 35 y los 65 años y se ha encontrado mayor riesgo si el primer parto ocurre antes de los 20 años de edad y aumenta en las mujeres que han tenido más de tres parejas sexuales⁽⁹⁾.

Las neoplasias preinvasoras se clasifican en tres grupos principales: Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) grado I (displasia leve), Neoplasia Intraepitelial grado II (displasia moderada) y neoplasia intraepitelial grado III (displasia grave y/o carcinoma *in situ*)⁽¹⁰⁾.

Por otro lado se ha establecido que el virus de papiloma humano (VPH) tiene un papel etiológico importante en el surgimiento del cáncer cervicouterino. El DNA del virus del papiloma humano se encuentra en prácticamente todos los cánceres cervicales y lesiones precursoras. Estudios epidemiológicos indican que la infección con éste virus es el factor de mayor riesgo en las lesiones intraepiteliales escamosas y los cánceres invasivos. De los 70 tipos de VPH, solo 23 han sido asociados a la infección cervical, los tipos de alto riesgo son los 16, 18, 31, y 35⁽¹¹⁾.

Las infecciones por VPH son más frecuentes en los carcinomas cervicales que en las displasias, lo mismo que la expresión de oncoproteínas, aunque no existe una relación directa entre éstos dos hechos⁽¹²⁾.

Las oncoproteínas virales E6 y E7 las cuales son codificadas por los virus 16/18 pueden immortalizar a las células epiteliales del exocervix. La proteína E7 se enlaza a la proteína supresora de tumor Rb liberando el factor de transcripción E2F, el cual transactiva algunos genes aumentando la proliferación celular y el progreso anormal del ciclo celular, además la proteína E6 forma un complejo con la proteína supresora de tumor p53 y la proteína asociada E6 E6AP, dando como resultado la degradación de p53 por la vía proteolítica ubiquitina. La inactivación de p53 interrumpe muchos procesos celulares, incluyendo la detención del ciclo celular en la fase G1, el proceso de reparación del DNA y la activación de la apoptosis, dando como resultado la transformación al fenotipo maligno⁽¹³⁾.

El oncogene E5 del VPH 16 es incapaz de transformar los queratinocitos por sí solo, pero incrementa la eficiencia de la immortalización celular por E6/E7. La proteína E5 inhibe la regulación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en presencia del ligando. Las células transformadas sobre-expresan el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y como consecuencia el receptor se autofosforila debido a la constante estimulación autócrina⁽¹⁴⁾.

Estos eventos moleculares desestabilizan el genoma celular y eventualmente permiten la transformación celular y por ende el desarrollo de cáncer cervical⁽¹⁴⁾.

La sobre-expresión de las tirosina cinasas ya sea debido a una mutación o amplificación génica produce la formación de un tumor. La sobre actividad de éstas proteínas causan un crecimiento anormal y transformación celular. Sin embargo, los inhibidores selectivos específicos de tirosina cinasa pueden actuar como agentes anticancerosos muy efectivos⁽¹⁵⁾.

La actividad incrementada del EGFR nos sugiere que los inhibidores de la actividad de cinasa del EGFR pueden ser usados como bloqueadores de su crecimiento. Tales inhibidores, si tienen éxito, pueden prevenir la transformación maligna de las células epiteliales infectadas con el VPH-16. Bassal y colaboradores han demostrado previamente que los inhibidores de la actividad de cinasa del receptor para el factor de crecimiento epidérmico son efectivos en el bloqueo del crecimiento de queratinocitos psoriáticos donde el crecimiento incrementado es también predominantemente manejado por sistemas EGFR. Ellos también han mostrado recientemente que las tirfostinas AG494 y AG555, las cuales bloquean la actividad Cdk2, disminuyen el crecimiento de las células inmortalizadas, sobre todo en células que sobre-expresan el EGFR. El bloqueador de cinasa del EGFR AG1478 y el inhibidor de la actividad Cdk2 llamado AG555, inhiben la proliferación de los queratinocitos humanos inmortalizados por el VPH-16, e inducen en ellos el proceso de la apoptosis⁽¹⁶⁾.

Estos hallazgos son significativos porque sugieren que las tirfostinas pueden suprimir el crecimiento de las células inmortalizadas por el VPH-16 y de células cancerosas por tres mecanismos: Inhibición del progreso del ciclo celular, inducción de diferenciación e inducción de apoptosis⁽¹⁶⁾.

Factores de crecimiento y sus receptores

Se han descrito más de 40 factores de crecimiento. Muchos factores de crecimiento no hematopoyéticos median sus efectos por medio de receptores que contienen una proteína intrínseca tirosina cinasa⁽¹⁷⁾.

Los receptores del factor de crecimiento epidérmico humano clase I llamados (HER/erbB) por sus siglas en inglés constituyen una familia de cuatro receptores de superficie celular involucrados en la transmisión de señales que controlan el crecimiento celular normal y su diferenciación⁽¹⁷⁾.

Todos los miembros de esta familia HER1 (EGFR), HER2(neu), HER3 y HER4 son proteínas de membrana de una sola cadena que tienen una secuencia homóloga entre sí. La característica estructural de éste grupo de proteínas incluye: un dominio extracelular al cual se enlaza el ligando que contiene regiones ricas en cisteína y posibles sitios de glicosilación, una región transmembranal anfipática y una región corta intracelular yuxtamembranal, un dominio tirosina cinasa y un extremo carboxilo el cual contiene los sitios de fosforilación⁽¹⁷⁾.

HER1, HER2 y HER4 tienen un alto grado de homología (aproximadamente el 80%) en el dominio tirosina cinasa en comparación con HER3, que tiene

sustituciones en cuatro residuos aminoácidos importantes lo cual sugiere que éste último tiene poca o nula actividad enzimática⁽¹⁷⁾.

Algunos otros dominios estructurales además de la región tirosina cinasa juegan un papel importante en la transducción de señales de HER2. Las porciones ricas en cisteína de la región extracelular probablemente forman enlaces disulfuro, dando como resultado una estructura secundaria y terciaria característica, lo cual permite interacciones con los ligandos u otros receptores. La región yuxtamembranal contiene un sitio en el cual se lleva a cabo la fosforilación de la proteína cinasa C (PKC), lo que promueve la actividad tirosina cinasa. Las regiones carboxilo terminal de los receptores de tirosina cinasa muestran poco grado de homología en la secuencia, quizás permitiendo cierto grado de especificidad en la señalización⁽¹⁷⁾.

El sello característico para la activación de éste grupo de receptores es la fosforilación en residuos de tirosina específicos, partiendo del extremo carboxilo terminal de la molécula⁽¹⁷⁾.

Los receptores se encuentran localizados en la membrana celular. Interactúan con diversos ligandos, todos con una secuencia común de 50-55 aminoácidos con el EGF, incluyendo seis residuos de cisteína⁽¹⁸⁾.

Se conocen varios ligandos específicos para HER1, HER3 y HER4, pero aún no se conoce alguno específico para HER2, sin embargo, el enlace al ligando de cualquiera de los tres primeros induce rápida dimerización ya sea homo- o heterodimerización, pero mostrando cierta preferencia por unirse al receptor HER2⁽¹⁹⁾.

La formación de dímeros está mediada por la alta estabilidad del complejo formado entre un ligando y dos receptores comparado con el receptor monomérico, además, la dimerización activa los dominios catalíticos y permite que uno de los receptores fosforele los residuos de tirosina del otro receptor. La fosforilación crea sitios de enlace específicos para Src o dominios de enlace de fosfotirosina que contiene proteínas. El reclutamiento de éstas proteínas activa algunas vías de transducción de señales que producen la respuesta de la célula hacia el ligando⁽²⁰⁾, y la activación de los receptores HER por medio de su actividad tirosina cinasa da como resultado, la transducción de señales al núcleo lo que provoca una activación génica y división celular⁽²¹⁾.

El receptor HER1 es activado por 6 ligandos: factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformado α ($TGF\alpha$), ampregulina, factor de crecimiento parecido al EGF enlazante de heparina, betacelulina y epiregulina. HER3 y HER4 se unen a neuregulinas (NGFs), una familia de diversos péptidos estructurales.

HER2 es un co-receptor para muchos ligandos diferentes y es frecuentemente transactivado por los ligandos parecidos al FCE, dando como resultado la formación de heterodímeros HER1-HER2. Las neuregulinas, pueden inducir la formación de heterodímeros HER2-HER3 y HER2-HER4, pero no se conoce un ligando que promueva la formación de homodímeros HER2, lo que sugiere que no existe un ligando que se una directamente a HER2⁽³⁾.

Existe una jerarquía que prefiere a HER2 como compañero de interacción. Un examen de la estructura de los ligandos ayuda a explicar esta preferencia.

Los ligandos de los receptores HER tienen un sitio de alta afinidad localizado en el extremo N-terminal del ligando, el cual se enlaza con una gran afinidad a el primer receptor facilitando a su vez el enlace a un segundo receptor en el extremo C-terminal de baja afinidad del ligando con una alta especificidad⁽²²⁾.

La bivalencia del ligando permite la diversidad de señales a través del reclutamiento selectivo de homo- y heterodímeros de los receptores HER y la preferencia por HER2 como compañero, lo que ayuda a explicar la oncogenicidad de HER2⁽²³⁾.

La neuregulina-1 (NDF) parece ser una molécula bivalente con dos sitios de enlace para los receptores HER: un sitio de alta afinidad y escasa especificidad (N-terminal) y un sitio de baja afinidad con extensa especificidad (C-terminal) ⁽²³⁾.

El sitio de alta afinidad enlaza primero su sitio específico (HER3 o HER4), al mismo tiempo, el sitio de baja afinidad es "inmovilizado" en la membrana plasmática, la afinidad operacional del dímero se incrementa y el receptor que se enlaza al brazo inmovilizado de baja afinidad del ligando es HER2⁽³⁾.

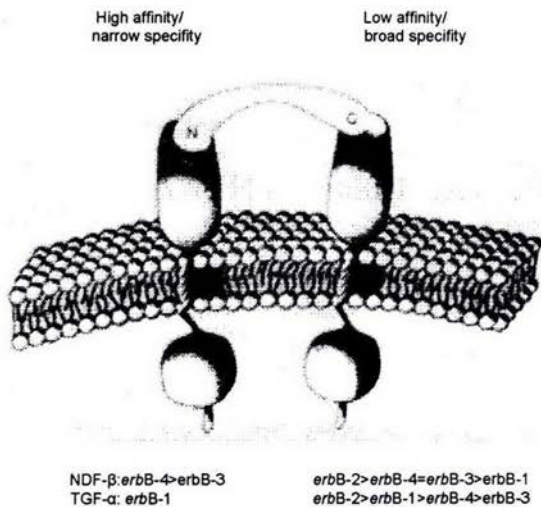


Figura ij). Dimerización de dos receptores HER.

Como resultado de ésta heterodimerización, el receptor HER2 es capaz de participar en la transducción de señales en ausencia de un ligando específico. Esta posibilidad de enlazarse con HER2 se incrementa por la sobre-expresión de HER2 en células humanas cancerosas⁽³⁾.

Los heterodímeros generan señales más potentes que los homodímeros y si estos contienen a HER2 tienen una alta potencia para enlazar al ligando así como para enviar señales, debido a dos razones: los heterodímeros se caracterizan por

una velocidad de disociación del ligando relativamente lenta a diferencia de HER1 cuya velocidad de endocitosis inducida por un ligando es alta⁽³⁾.

Por esta razón, las señales enviadas por combinaciones de receptores que contienen a HER2 son relativamente prolongadas y dan como resultado un aumento de la activación de señales, como la ruta MAPK. El heterodímero más potente es HER2-HER3, ésta combinación es la más mitogénica y HER3 es el compañero predominante de HER2 en las células cancerosas⁽³⁾.

El receptor HER3 tiene solamente un dominio cinasa débilmente activo por lo que los homodímeros HER3 son completamente inactivos⁽³⁾.

Estructura proteica de HER2

El receptor HER2 codificado por el gen neu, un protooncogene localizado en el brazo largo del cromosoma 17,⁽³⁾ es una glicoproteína transmembranal de 1255 aminoácidos con un peso molecular de 185 kDa también llamado p185^{HER}.

La estructura proteica completa de HER2 es muy similar al receptor del factor de crecimiento epidérmico⁽²⁴⁾.

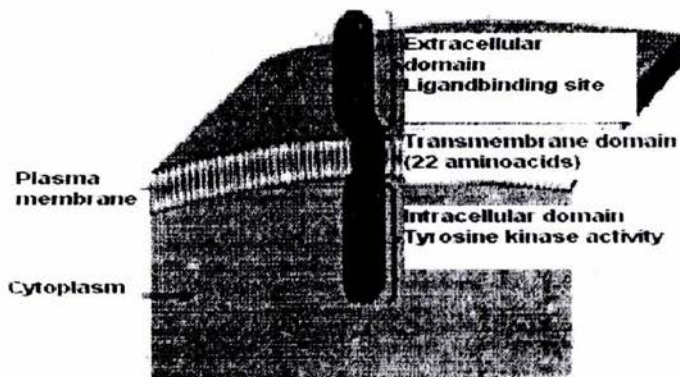


Figura ii). Estructura de la proteína HER2 y su topología transmembranal.

La secuencia del DNAC, de HER2 comprende 640 aminoácidos en el dominio extracelular incluyendo una alta proporción de residuos de cisteína agrupados en dos regiones hidrofílicas, facilitando una conformación específica necesaria para la transducción de señales a través de enlaces intra o interdisulfuro. La homología del 43% con el dominio extracelular del EGFR define la especificidad del enlace del ligando. El EGF y TGF α sólo podrían enlazarse al EGFR pero no a HER2. El dominio extracelular se ancla a la membrana plasmática por una región transmembranal de 23 residuos de aminoácidos hidrofóbicos. La región membranal contiene el sitio de la mutación puntual (Val 664 \rightarrow Glu) que activa a HER2 dando como resultado una

transformación celular. De cualquier forma, ninguna mutación similar ha sido observada regularmente en la región transmembranal de HER2 y el EGFR. La región transmembranal es seguida por una secuencia en su mayor parte de residuos básicos, una característica común en muchas proteínas membranales. El residuo de treonina 691 en esta región yuxtamembral es equivalente a una treonina 654 encontrada en el EGFR que es el sitio de fosforilación para la proteína cinasa C (PKC). En el dominio citoplásmico hay una extensión de 250 aminoácidos que es homóloga al dominio catalítico de la proteína tirosina cinasa codificada por la familia del gen src. Esta región contiene un residuo lisina 757 junto con 15 residuos de una secuencia que funciona como parte del sitio de unión de ATP el cual es esencial para la actividad de cinasa, la lisina 757 de HER2 parece equivalente al sitio de unión del ATP, la lisina 721 en el EGFR. El dominio tirosina cinasa de HER2 es idéntico en un 82% al EGFR. Una región de 60 aminoácidos debajo del dominio cinasa de HER2 comparte 55% de su identidad con EGFR. Se ha demostrado que ésta región del EGFR está involucrada en la internalización del receptor. El extremo carboxilo terminal de HER2 tiene 198 aminoácidos, incluyendo algunos sitios de autofosforilación de tirosina que sirven como un sitio de anclaje para los substratos celulares. Esta región es la menos homóloga entre HER2 y el resto de los miembros de la familia HER. Es posible que el carboxilo terminal de las proteínas HER adopte una estructura importante para la especificidad de la transducción de señales mediadas por receptores con actividad de cinasa⁽¹⁹⁾.

Expresión de HER2 en tejidos normales.

El entendimiento de las funciones biológicas de HER2 se basa en las observaciones de células transformadas aunque poco se sabe acerca del rol en la regulación del crecimiento celular normal y el desarrollo del tejido. En estudios realizados en tejido humano se ha encontrado que HER2 se expresa en epitelio secretor como el de glándulas mamarias, glándulas salivales, páncreas, intestino, tracto gastrointestinal, ovarios, tiroides y en la piel. La expresión inicial de HER2 en mamíferos sugiere un papel biológico que involucra el crecimiento del tejido y desarrollo en mamíferos⁽¹⁹⁾. Todas las células normales contienen dos copias del gen neu y producen niveles bajos de HER2⁽²⁵⁾ lo cual contribuye al crecimiento celular normal, y lo que provoca anomalías es la amplificación del gen; ésta amplificación se ha detectado entre el 10 al 34% de los carcinomas de mama invasivos⁽²⁶⁾.

HER2 es un receptor de membrana con actividad de tirosina cinasa y juega un papel crucial en la transformación oncogénica y la tumorigénesis por su interacción con otros miembros de la familia HER para permitir las señales intracelulares.

Se ha identificado la sobre-expresión del receptor HER2 en varios de tipos de cáncer, incluyendo carcinoma de mama, vejiga, páncreas, pulmón, ovario, endometrio, colon, riñón, cabeza y cuello, estómago y próstata⁽²⁷⁾.

La amplificación del gen *neu* es el mecanismo más común que causa sobre-expresión de la proteína HER2 y parece ser un evento temprano en el desarrollo de cáncer. En el cáncer de mama, ovario y gástrico, la incidencia de la amplificación de dicho gen se relaciona con la sobre-expresión de la proteína HER2 y su RNAm. Por ejemplo, más del 90 % de los carcinomas mamarios HER2 positivos muestran una amplificación del gen *neu*, mientras que solo un pequeño porcentaje muestran sobre-expresión pero no amplificación⁽²⁸⁾.

Se ha propuesto que en algunos casos la sobre-expresión de la proteína HER2 sea el resultado de una irregularidad transcripcional o postranscripcional. En cánceres que no sean de mama, ovario o estómago, el nivel de la amplificación del gen *neu* es usualmente mucho menor que la sobre-expresión de HER2⁽⁶⁾.

Se ha demostrado que un estado HER2 positivo, el cual es detectado en el 20-30% de las pacientes con carcinoma mamario, predice una supervivencia reducida⁽⁸⁾.

Todas las células normales y la mayor parte de las células de carcinoma mamario tienen dos copias del gen *neu* y producen niveles bajos de su proteína correspondiente HER2. Los mecanismos de la amplificación del gen *neu*, la sobre-expresión de la proteína HER2 y la activación del receptor son procesos complejos, pero dan como resultado la fosforilación del receptor, internalización y activación de una compleja cascada de señales. La activación de HER2 frecuentemente involucra la formación de heterodímeros con los otros receptores HER (HER1, HER3 o HER4) que son enlazados a sus ligandos específicos. El mecanismo primario para la alteración de HER2 en cáncer de mama es un incremento en el número de copias génicas (amplificación)⁽³⁾.

Sobre-expresión de los receptores HER.

La sobre-expresión del receptor HER2 ha sido observada en una gran variedad de tumores, no solo de mama, sino también de uretra, páncreas, pulmón, ovario, endometrio, colon, riñón, cabeza y cuello, estómago, esófago y próstata⁽²⁹⁾.

La estructura de la proteína HER2 cuando se encuentra sobre-expresada parece ser la misma que en células normales ya que no se han identificado cambios mutacionales en el producto del gen *neu* en carcinomas humanos, sin embargo, cuando éste gen está amplificado, los niveles de la proteína aumentan hasta cien veces⁽³⁰⁾.

La secuencia de la transformación oncogénica parece ser el resultado de una amplificación inicial del gen *neu*, el cual genera más de dos copias génicas normales en la célula epitelial; usualmente, en el estado amplificado se observan más de diez copias génicas. Los factores específicos que inducen la amplificación del gen no han sido aclarados completamente⁽³¹⁾.

La amplificación del gen conduce al incremento de la transcripción de este, los niveles del RNAm y el consecuente incremento de la síntesis de la proteína HER2, por consecuencia la proteína HER2 se sobre-expresa en la superficie celular. Los

niveles de HER2 se encuentran de 10 a 100 veces más en la superficie de las células de carcinoma mamario HER2 positivo, comparada con células epiteliales mamarias en estado normal⁽³¹⁾.

La sobre-expresión de la proteína en la superficie celular probablemente conduce a un aumento en la formación de dímeros. Esto da como resultado un crecimiento celular irregular y transformación oncogénica que en algunos casos desencadena en cáncer viable⁽³¹⁾.

El hallazgo de que HER3 tiene niveles elevados de fosfotirosina, implica que en tumores HER2 positivos, éste contribuye al crecimiento maligno al reclutar otros receptores HER particularmente HER3⁽²⁵⁾.

La amplificación y sobre-expresión de HER2 se puede explicar por el equilibrio molecular que cambia de monómero a dímero a medida que aumenta la cantidad de proteína HER2. Esto da como resultado un incremento de la actividad tirosina cinasa y una señal celular inapropiada que conduce a la transformación⁽¹⁰⁾. Además, la sobre-expresión de la forma protooncogénica de HER2 puede ser activada por una truncación aminoterminal y la sobre-expresión de HER2 afecta tanto su propia regulación como la del EGFR, por lo que su expresión también aumenta⁽³²⁾.

Por otra parte, como ya se ha señalado anteriormente, la sobre-expresión y activación del protooncogen HER2/neu juega un papel muy importante en la formación de un cáncer, pero además una disminución de la expresión de un inhibidor de cinasa dependiente de ciclina (cdk) llamado p27 se relaciona con éste hecho, dado que es un gen supresor de tumor⁽³³⁾, y se ha encontrado que en la mayoría de los casos una sobre-expresión del gen neu va acompañada de una disminución del gen p27.

La disminución de p27 es causada por un aumento en la degradación mediada por ubiquitina y la vía HER2/MAPK está involucrada en el descenso de la estabilidad de p27⁽³³⁾.

Fosforilación en tirosina

La activación de los receptores del factor de crecimiento epidérmico permite la fosforilación y la activación de múltiples mensajes secundarios en las células normales. El descontrol de estas redes intracelulares es un hecho común en muchos procesos malignos.

La substitución de un solo aminoácido en la región transmembranal de la molécula, permite la dimerización del receptor e incrementa su fosforilación basal en tirosina. Esto coincide con el incremento de la actividad enzimática de cinasa y la fosforilación de algunos blancos intracelulares⁽³³⁾.

En células cancerosas humanas, que sobre-expresan el receptor HER2, éste dimeriza espontáneamente debido al gran número de moléculas presentes y debido a esto, las células cancerosas tienen altos niveles de fosforilación⁽³³⁾.

La activación de los receptores de tirosina cinasa es la fosforilación en sitios tirosina del extremo carboxilo terminal del receptor. De hecho, la transducción de

señales por éstos receptores requiere de actividad tirosina cinasa y autofosforilación en tirosina. En células cancerosas, una sobre-expresión de HER2 incrementa la fosforilación en tirosina a niveles más altos que cualquier otro sustrato celular y el grado de fosforilación de HER2 generalmente conlleva efectos de transformación celular⁽³³⁾.

Los sitios específicos de tirosina en el extremo carboxilo terminal de HER2 han sido identificados y éstos pueden ser importantes para la transducción de señales⁽³³⁾.

Receptores de citocinas y transducción de señales.

La proteína con actividad de tirosina cinasa (PTK por sus siglas en inglés) es una proteína con la capacidad de catalizar la fosforilación de los residuos de tirosina en otras proteínas; la fosforilación, ya sea en tirosina o en la serina y treonina es un mecanismo común de regulación de la función proteica. Muchas de las PTK deben fosforilarse ellas mismas antes de volverse activas. Cuando una citocina se enlaza, las subunidades componentes de su receptor se aproximan físicamente entre sí, junto con su PTK vinculada en el citoplasma. Las agrupaciones de PTK permiten que estas enzimas se fosforilen y se activen entre sí, así como otras proteínas en el citoplasma⁽³⁴⁾.

Los eventos que se producen después de la activación de la PTK conducen a respuestas celulares específicas que varían entre distintas citocinas, receptores y tipos de células. Las vías de señalamiento modulan la transcripción de genes particulares después de la activación de PTK, éste señalamiento se realiza en el núcleo por dos vías: ras y Jak/Stat⁽³⁴⁾.

Vía de señalamiento dependiente de ras

HER2 es un receptor de membrana que al ser activado conduce a una cascada de fosforilación de cinasas citoplásmicas (incluyendo *ras* y *raf*) lo que incrementa la transcripción proteica y el crecimiento celular⁽³⁵⁾ y es una de las vías bien caracterizadas de las proteínas tirosina cinasas⁽¹⁴⁾.

La vía dependiente de *ras* puede desencadenarse por diversos receptores de citocinas, así como por ciertas moléculas de adhesión y por otros receptores de superficie cuando entran en contacto con los ligandos apropiados. El señalamiento en estas vías se puede iniciar por proteínas citosólicas llamadas cinasas de la familia *src*, cuyo nombre se debe a que estas tienen regiones de homología con la oncoproteína *src*. Estas cinasas contienen dominios de proteínas especializados llamados dominios SH2, los cuales les permiten interactuar con otras proteínas que contiene residuos fosforilados de tirosina. Cuando un receptor de citocina enlaza al ligando, las subunidades del receptor se fosforilan y pueden enlazarse de inmediato con una cinasa de la familia *src*. Esta interacción conduce al enlace de otras proteínas en el interior de la membrana celular y se forma un complejo de

señalamiento de componentes múltiples. Este complejo activa a proteínas de la familia ras. La hidrólisis de GTP a GDP induce un cambio estructural que de algún modo desencadena la activación de la cinasa raf, esto a su vez, activa a las proteína cinasas llamadas Mek y a la proteína cinasa relacionada con mitosis, las cuales se fosforilan y activan entre sí. Una vez activa la MAPK, migra al interior del núcleo donde fosforila a las proteínas reguladoras de la transcripción que controlan genes específicos. Entre los efectos de la activación de MAPK se encuentra el aumento de la proliferación celular, activación de genes y cambios en la organización (34).

Vía de señalamiento Jak/Stat.

La familia de las cinasas Janus consta de cuatro enzimas conocidas como Jak1, Jak2, Jak3 y Tyk2. El enlace de la citosina aproxima a las subunidades del receptor y permite que las proteínas Jak se fosforilen y activen entre sí. Los sustratos primarios de las Jak activadas son una familia de factores de transcripción llamados proteínas Stat. Estas contienen dominios SH2 y por lo tanto se unen a un receptor activado cuando sus cinasas se vuelven activas. Como consecuencia los factores Stat se fosforilan y esto hace que se dimericen y en seguida se trasladen al interior del núcleo donde actúan para promover directamente la expresión de genes específicos. Hay cuando menos seis proteínas Stat conocidas, cada una de las cuales actúa sobre genes distintos (34).

También puede producirse comunicación cruzada entre la vía dependiente de ras lo que sugiere que las Stat también pueden ser fosforiladas por las proteínas MAPK. Distintas citocinas se fijan a receptores de estructuras similares los cuales activan a los mismos tipos de moléculas de señalamiento. En contraste, como muchas citocinas señalan a través de subunidades receptoras y vías de señalamiento comunes, puede predecirse que la pérdida de una subunidad particular o cinasa de señalamiento tendrá un efecto mucho más profundo (34).

Bloqueadores tirosina-cinasa y desfosforilación de la tirosina.

Los inhibidores que bloquean la actividad tirosina cinasa y los caminos de señalamiento que activan pueden marcar la pauta para el desarrollo de fármacos.

Algunos inhibidores sintéticos como las tirfostinas, compuestos análogos a la tirosina, son inhibidores selectivos de tirosina cinasa.

Las tirfostinas también sinergizan con anticuerpos contra el EGFR o HER2 para bloquear el crecimiento de células humanas que sobre expresan HER2 y/o EGFR.

La actividad del receptor tirosina cinasa da como resultado altos niveles de autofosforilación y fosforilación del sustrato.

La fosforilación en tirosina en las células es un proceso dinámico reversible. Las proteínas tirosinofosfatasas (PTP5) son responsables de remover los fosfatos de los residuos de tirosina (desfosforilación)⁽¹⁶⁾.

Las tirfostinas pueden suprimir el crecimiento de las células inmortalizadas y células cancerosas por tres mecanismos: inhibición del progreso del ciclo celular, inducción de diferenciación, e inducción de apoptosis⁽³⁶⁾.

La fosforilación en tirosina es importante en muchos sistemas de transducción de señales de membrana. Las tirfostinas son una serie de compuestos orgánicos simples que han demostrado inhibir la actividad de las proteínas tirosina cinasas. Estas moléculas son derivados de un núcleo benziledenemalononitrilo, se asemejan a la molécula de tirosina y tienen escasas propiedades hidrofóbicas las cuales les permiten atravesar la membrana celular⁽¹⁶⁾.

Más de 110 tirfostinas han sido sintetizadas a la fecha y se ha probado su actividad inhibidora en varios sistemas tirosina cinasa. Algunas propiedades físicas de varias tirfostinas se muestran en la siguiente tabla.

Tirfostina	Formula Empírica	Peso molecular	Punto de fusión	Rotación óptica en MeOH
Tirfostina 1	C ₁₁ H ₈ N ₂ O	184.2	117	
Tirfostina 25	C ₁₀ H ₆ N ₂ O ₃	202.2	245	
Tirfostina B42	C ₁₇ H ₁₄ N ₂ O ₃	294.3	215	
Tirfostina B44(-)	C ₁₈ H ₁₆ N ₂ O ₃	308.3	135	-90.5°
Tirfostina B46	C ₁₉ H ₁₈ N ₂ O ₃	322.4	165	
Tirfostina B48	C ₁₆ H ₁₂ N ₂ O ₃	280.3	258	
Tirfostina B50(+)	C ₁₈ H ₁₆ N ₂ O ₃	308.3	135	+90.5°
Tirfostina B56	C ₂₀ H ₂₀ N ₂ O ₃	336.4	180	

Tabla 1. Propiedades físicas de las tirfostinas.

Muchas tirfostinas tienen características inhibitorias selectivas y distintas, haciendo de estos compuestos una herramienta útil para la investigación de la actividad tirosina cinasa y proliferación celular⁽³⁶⁾. En la figura 3 se presenta la estructura química de algunas de ellas.

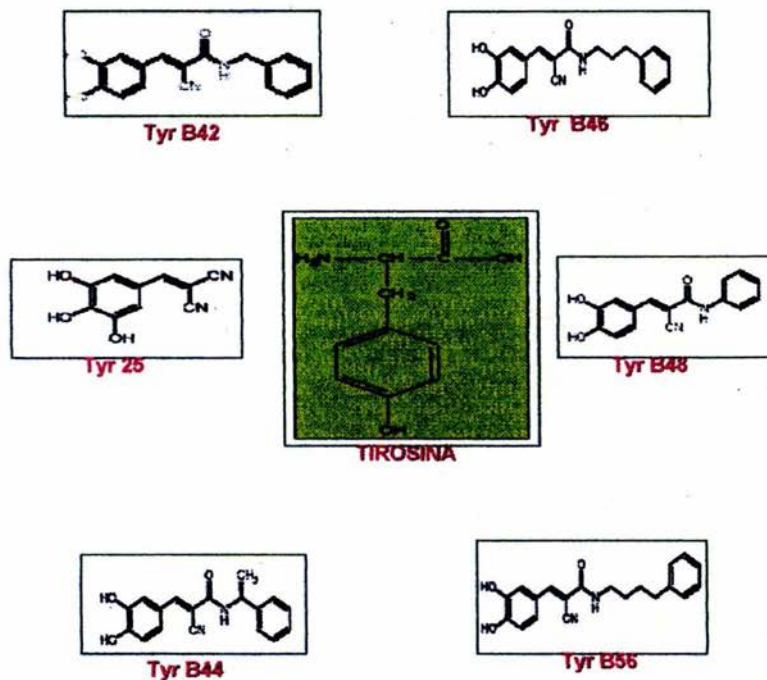


Figura iii). Estructura química de la tirosina y de las tirfostinas 25, B42, B44, B46, B48 y B56

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer de cérvix es una de las enfermedades más comunes en México, por tal motivo es importante la investigación básica para buscar una posible erradicación de la enfermedad.

Las líneas celulares de cáncer cervical HeLa, CALO e INBL presentan en su membrana celular receptores con actividad tirosina cinasa como el receptor HER2/neu por lo tanto, el bloqueo de éstos receptores por medio de la utilización de inhibidores de tirosina cinasa llamados tirfostinas, puede llevar a la disminución del crecimiento *in vitro* de estas líneas celulares.

Para ello, se utilizan ensayos de proliferación celular que permitan seleccionar la tirfostina que tenga mayor actividad inhibidora, para evaluar posteriormente el estado de fosforilación del receptor HER2 antes y después de la exposición a los inhibidores, utilizando las técnicas de Western Blot e Inmunofluorescencia.

OBJETIVOS

- * Determinar la presencia y estado de fosforilación del receptor HER2 en las líneas celulares de cáncer cervical HeLa, CALO e INBL por medio de las técnicas de Western Blot e inmunofluorescencia.
- * Inhibir la fosforilación de HER2 por medio de inhibidores de tirosina-cinasa (Tirfostinas)
- * Determinar la inhibición de la proliferación celular en células de carcinoma cervical posterior al bloqueo de la actividad tirosina-cinasa de HER2 por medio de inhibidores (Tirfostinas) en cultivos *in vitro*.

HIPÓTESIS

Al exponer células de cáncer cervicouterino cultivadas *in vitro* a inhibidores de la actividad tirosina cinasa (tirfostinas), disminuye su crecimiento debido al bloqueo de moléculas activadas por fosforilación en tirosina, como el receptor HER2.

POBLACIÓN

Se utilizaron células de tejido epitelial cervical cultivadas *in vitro*, de las líneas CALO, INBL y HeLa.

La línea celular HeLa deriva de un tumor cervical del año 1952, HeLa son las siglas de Helen Lane, mujer de cuyo epitelio se obtuvieron las células cervicales.

Las líneas celulares CALO (estadío clínico III B) e INBL (estadío clínico IV B) fueron establecidas en el Laboratorio de Diferenciación Celular y Cáncer de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Son células infectadas con el virus de papiloma humano tipo 16_(3E).

VARIABLES INDEPENDIENTES

- Concentración celular
- Temperatura de cultivo
- Concentración de CO₂
- Humedad y tipo de medio de cultivo
- Concentración de tirfostinas

VARIABLES DEPENDIENTES

- Proliferación celular

MATERIAL

Material biológico

- Línea celular CALO
- Línea celular INBL
- Línea celular HeLa
- Línea celular MCF-7
- Línea celular U937
- Linfocitos humanos de sangre periférica
- Medio de cultivo RPMI
- Suero fetal de Bovino SFB (GIBCO)

Soluciones

- Solución PBS IX*
- Verseno*
- Buffer de corrida I*
- Buffer de transferencia II*
- Buffer gel concentrador*
- Buffer gel separador*
- TBS*
- TBS Tween*
- Solución reveladora*
- Solución fijadora*
- Dimetilsulfóxido*
- Cristal violeta 0.1 %*
- Glutaraldehído 1%*
- Ácido acético 10%*
- Buffer de elusión*
- Buffer de Laemmli 5X*
- Tirfostinas (Calbiochem)

**NOTA: El proceso de preparación está descrito en el ANEXO 1*

Equipo

- Placa de electrotransferencia (Pharmacia Biotech Sweden)
- Cámara de electroforesis (Atto)
- Incubadora (Forma Scientific ,USA)
- Campana de flujo laminar (VECCHI Ingenieros S.A, México)
- Purificador MilliQ (Millipak)
- Lector de placas (Bio-tek intruments ,INC)

- Microscopio Zeiss (Industria Cort Zeiss, México)
- América Optical (corporation, USA) LEICA DMIL
- Autoclave (PAESA mod 3000, México)
- Potenciómetro (CORNING pH meter 440)
- Ultracongelador REVCO Scientific INC ULT 2186-5-AT4, USA)

Material de cultivo

- Frascos de cultivo estériles (Nalge Nunc)
- Tubos de plástico estériles (Nalge Nunc)
- Pipetas de vidrio estériles (pyrex)
- Placas de 24 pozos (Nalge Nunc)
- Matraces erlenmeyer de 125 ml (pyrex)
- Matraces erlenmeyer de 250 ml (pyrex)
- Probetas de 100 ml (pyrex)

CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

Criterios de inclusión

Para las células utilizadas

- Estar libre de contaminantes microbiológicos (bacterias, hongos, etc) que interfieran con las determinaciones.
- Células viables.
- Células que crezcan *in vitro*.

Criterios de exclusión

- Células contaminadas con bacterias u hongos.
- Células no viables.

MÉTODOS

Cultivo celular

Las líneas celulares CALO, INBL, HeLa, y MCF-7 se cultivaron en medio RPMI suplementado con suero fetal de bovino (SFB) (GIBCO BRL, USA) a una concentración final del 10%. Los cultivos se mantuvieron en la incubadora (Forma Scientific, USA) a 37 °C, 5% de CO₂ y humedad a saturación.

Resiembra

Se retiró el medio de cultivo, se agregaron 4 ml de verseno (Anexo 1) y se incubó por 5 minutos. Se desprendieron las células y el contenido del frasco se transfirió a un tubo con 1 ml de medio RPMI-SFB 10%. Se centrifugó por 5 minutos y se lavó 2 veces con el mismo medio bajo las mismas condiciones. El botón celular se resuspendió en medio de cultivo y se colocaron 0.5 ml de esta suspensión a cada frasco que se resembró junto con 20 ml de medio RPMI-FBS10%.

Conteo celular

Las células se desprendieron y lavaron como se señaló arriba y se resuspendieron en una cantidad conocida de medio de cultivo, posteriormente se homogeneizaron perfectamente y se tomaron 20µl los cuales se colocaron en un tubo eppendorff con 180 µl de medio. De este tubo se tomaron 20µl y se colocaron en otro tubo con 20µl de azul tripano, se mezcló bien y se colocaron 20µl en el hemocitómetro para realizar el conteo celular en el microscopio óptico.

Congelación de células

Las células se desprendieron y lavaron como se describió anteriormente. El botón celular se resuspendió en medio de congelación (Anexo1) y se alicuotó en viales de congelación (1ml por cada vial), se colocaron los viales dentro del ultracongelador (REVCO) a -70°C y posteriormente se almacenaron en Nitrógeno líquido.

Descongelación

Se colocaron los viales en baño maría hasta que se descongelaron. Una vez transcurrido el tiempo se transfirió el contenido de los viales en un frasco con medio de cultivo a 37 °C y se colocó en la incubadora.

Inhibición de la proliferación

Se realizó un conteo celular y preparó una suspensión de 10,000 células/ml. En una placa de 96 pozos se colocaron alícuotas de 100µl por pozo y se incubaron por 24 horas a 37°C. Transcurrido este tiempo se retiró el medio de cultivo, se hizo una dilución seriada de las Tirofostinas (Anexo 2) y se colocaron 100µl/pozo de cada dilución en 3 pozos distintos para cada una. Se incubó por 120 horas. Después de este tiempo se midió la inhibición de la proliferación por la técnica de cristal violeta.

Técnica de Cristal Violeta

Se retiró el medio de los pozos y se fijaron las células con 70µl de glutaraldehído al 1% (Anexo 1) por 20 minutos, se lavó 3 veces con agua destilada y se dejó secar, posteriormente se agregaron 100µl de cristal violeta al 0.1% (Anexo1) y se incubó por 10 minutos en agitación tras lo cual se lavó 6 veces con agua destilada y nuevamente se dejó secar. Una vez seca, se agregaron 150µl de ácido acético al 10% (Anexo1) y se agitó por 20 minutos. Transcurrido ese tiempo se leyó a 570 nm en el lector de placas (Bio-Tek instrument, INC, USA).

Inmunoprecipitación

Se sembraron 2×10^6 células por cada frasco de cultivo de CALO, INBL, MCF-7 y mientras que para la línea celular HeLa se sembraron 4×10^6 células por cada frasco de cultivo. Se incubaron por 24 horas y una vez transcurrido ese tiempo se colocaron en 1 ml de buffer de lisis dentro de un tubo Eppendorf y se incubaron por 15 minutos en hielo; posteriormente las células se centrifugaron a 4°C por 15 minutos. Finalmente se cuantificó la cantidad de proteínas presentes en cada línea celular por el método de Lowry para inmunoprecipitar la misma cantidad de cada una de ellas.

Por otra parte, se colocaron 15 µl de proteína A agarosa y 15µl de proteína G agarosa en un tubo Eppendorf por cada línea celular, se lavaron 2 veces con 500µl de buffer de lisis (Anexo1), se agregaron 1.5µl de Ab anti-neu (Santa Cruz Biotechnology, USA) con 40µl de buffer de lisis y se incubaron 1 hora a 4°C con

agitación. Una vez transcurrido ese tiempo se lavaron las esferas dos veces con buffer de lisis y se agregó el lisado celular obtenido anteriormente, los tubos se incubaron por 16 horas a 4°C con agitación. Finalmente se lavaron las esferas 3 veces con buffer de lisis y se agregaron 20 µl de buffer de Laemmli reductor (Anexo1) por cada tubo, se colocaron en agua hirviendo por 5 minutos y se guardaron a -20°C.

Electroforesis

Es un método que permite la separación de proteínas mediante cargas eléctricas en geles de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio. Se usa un gel separador al 10 % (Anexo1) con acrilamida-bisacrilamida (Anexo1) y un gel concentrador 4% (Anexo1). Las muestras que se inmunoprecipitaron fueron colocadas en la placa de gel dentro de la cámara de electroforesis, además se colocó un marcador de pesos moleculares preteñidos (Gibco, USA) con un rango de 16 a 200 kDa. La cámara se llenó con buffer de corrida (Anexo 1) y se aplicó un voltaje de 85V.

Western Blot

Se colocó el gel de poliacrilamida sobre una membrana de nitrocelulosa previamente humedecida con buffer de transferencia pH 8.3 (Anexo1) en la placa de electrotransferencia, se aplicó una corriente de 125-150 mA durante 2 horas. Transcurrido ese tiempo se retiró el gel, se cortó la orilla de la membrana para separar los pesos moleculares y se bloqueó con albúmina bovina (Sigma, USA) al 1% en buffer TBS (Anexo 1) por 1 hora a temperatura ambiente.

Inmunoblot

Se incubó la membrana con el Ab anti-neu (Santa Cruz Biotechnology, USA) (1:500) durante 1.5 horas, se lavó 2 veces por 5 minutos con TBS-Tween (Anexo1) y 2 veces con TBS de la misma manera, posteriormente se incubó 1 hora con el Ab secundario (cabra anti-ratón conjugado con peroxidasa) (1:1000) y se lavó la como se señaló arriba; se agregó el sustrato de quimioluminiscencia (Pierce,USA) y se colocó sobre una película (Biomax,Kodak ,USA) por el tiempo requerido. Se retiró la membrana y la película se sumergió en la solución reveladora (revelador KodaK GBX CE) (Anexo 1), se enjuagó y se sumergió inmediatamente en la solución fijadora (Eastman Kodak) (Anexo1) por unos segundos, se dejó secar y se observó el resultado.

Inhibición de la fosforilación

Se cultivaron las células en igualdad de condiciones que las descritas anteriormente, posteriormente se adicionaron las cantidades de tirfostina requeridas (EC_{50}), se incubaron durante 24 horas y se lisaron e inmunoprecipitaron de la forma descrita anteriormente. Para realizar el Inmunoblot se utilizaron los anticuerpos PY20 + PY99 (Santa Cruz Biotechnology California) a una dilución 1:1000 y el mismo anticuerpo secundario (conejo anti ratón) a una dilución 1:2000. Después del revelado con quimioluminiscencia (Inmunoblot), se eluyeron los anticuerpos con el buffer de elución (Anexo1), se lavaron las membranas con TBS, se bloquean con TBS-BSA(1%) y se incubaron con anticuerpo anti-neu.

Inmunofluorescencia

Se colocaron 100 000 células por pozo en una placa de 24 pozos, se incubaron por 24 hrs, se lavaron 2 veces con 1 ml de BSA-1% a 4°C, se adicionaron 100 µl de Ab antineu (1:100) en PBS-BSA1 % y se incubaron a 4°C por 45 minutos en oscuridad; se lavó 2 veces con 1 ml de PBS-BSA1 % a 4°C. Se agregaron 100µl del Ab oveja anti-ratón biotinilado (1:100) en BSA-1% y se incubó por 45 minutos a 4°C en oscuridad, posteriormente se lavó 2 veces de la misma manera, se agregaron 100µl de estreptavidina (1:100) en PBS-BSA1% y se incubó por 30 minutos a 4°C en oscuridad. Pasado ese tiempo, se colocaron 200µl por pozo de solución PBS-Glicerol 9:1 y se observó al microscopio de fluorescencia con luz ultravioleta (Leica).

RESULTADOS

HER2 es un factor de crecimiento epidérmico. Esta proteína es activada mediante una cascada de reacciones llevadas a cabo por diferentes moléculas que forman parte de circuitos transductores de señal existentes en el citoplasma. Los segundos mensajeros transmiten la señal y finalmente ésta información se envía al núcleo, donde se ejecuta la orden de diferenciación y división celular. Cuando se presenta una sobre-expresión del factor de crecimiento como HER2 en la células se produce un aumento en la tasa de crecimiento interrumpiendo el control de la proliferación de las células e induciendo un proceso de transformación maligna.

En diversos estudios se ha observado la sobre-expresión de HER2 en cáncer de mama, lo cual se encuentra relacionado con el grado de malignidad celular. Cuando se bloquea la acción de HER2 se disminuye la tasa de crecimiento permitiendo entonces el control de la proliferación celular.

En nuestro laboratorio, se determino que HER2 se encuentra expresada hasta 50 veces más que en las células procedentes de carcinoma de cérvix, CALO, INBL así como en la línea HeLa⁽⁴⁰⁾. El primer objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de la proteína HER2 en lisados de las células CALO, INBL y HeLa posteriormente seleccionar el inhibidor adecuado y para ello se hicieron ensayos de inhibición de la proliferación celular con la técnica de cristal violeta utilizando las tirfostinas 25, B42, B44, B46, B48, B50 y B56. Se utilizaron estas tirfostinas ya que han mostrado una importante inhibición con el factor de crecimiento epidérmico (EGF), bloqueando la actividad tirosina-cinasa en particular la Tirfostina B42.

Para analizar el efecto de las tirfostinas sobre la proliferación celular, se incubaron cultivos de las líneas celulares CALO, INBL y HeLa en presencia de éstos inhibidores. Como se observa en las figuras (1-7) no todas las tirfostinas tienen el mismo poder inhibitor sobre las células tumorales cultivadas *in vitro* bajo las mismas condiciones.

Observamos un comportamiento similar que muestra que existe inhibición a determinadas concentraciones y dicha inhibición disminuye de manera proporcional a la concentración. Tales concentraciones llamadas EC_{50} (la menor concentración posible a la cual disminuya visiblemente la proliferación celular)⁽³⁶⁾ se muestran en la tabla 1.

En la figura 1 se observa el efecto de la tirfostina 25. Existe inhibición de la proliferación a una concentración de $12.5\mu\text{M}$ para la línea CALO (A) para HeLa (B) $25\mu\text{M}$; y para INBL(C) $6.25\mu\text{M}$. Se puede observar que para las tres líneas celulares se requieren diferentes concentraciones, de esta tirfostina para inhibir la proliferación celular.

Las tirfostinas son derivados de un núcleo benziledenemalononitrilo que tienen ciertas propiedades hidrofóbicas que les permiten atravesar la membrana celular pero que a su vez presentan diferencias importantes en su estructura química que explican el distinto comportamiento experimental como se describe posteriormente. La tirfostina 25 además de tener el núcleo benziledenemalononitrilo, en las posiciones 3 y 4 presenta radicales hidroxilo, los cuales brindan una mayor polaridad y permiten la formación de puentes de hidrógeno.

La tirfostina B42 en cambio, muestra un comportamiento diferente como se puede observar en la figura 2. En las líneas celulares CALO, HeLa e INBL se requieren altas concentraciones ($50\mu\text{M}$) para la inhibición de la proliferación. A medida que ésta disminuye su actividad inhibidora disminuye, pero si la concentración disminuye aún más ($0.048\mu\text{M}$) su actividad inhibidora aumenta. Para la tirfostina B42 obtuvimos una EC_{50} más pequeña en comparación con las demás tirfostinas. La estructura de la tirfostina B42 contiene una cadena de hidrocarburos mas corta enlazada al grupo amida. Si la comparamos con la tirfostina B56, la tirfostina B42 posee un anillo de benceno más cercano al grupo amida pero no igual que la B48, ésto permite que la tirfostina sea estable pero lo suficientemente reactiva para unirse a los receptores de tirosina en mayor proporción que las demás disminuyendo la unión de la tirosina a su receptor y consecuentemente también la fosforilación del receptor y la proliferación celular desenfrenada.

En la figura 3 se observa el efecto inhibidor de la tirfostina B44 sobre la proliferación. En la línea CALO (A), se obtuvo una EC_{50} concentración inhibidora de $12.5\mu\text{M}$; para HeLa (B) $25\mu\text{M}$; y para INBL (C) $12.5\mu\text{M}$. Podemos observar que la EC_{50} de CALO e INBL son iguales mientras que la de HeLa es mayor. La estructura de la tirfostina B44 es muy semejante a la tirfostina B50 con excepción del grupo metilo que se encuentra en el carbono quiral. Esto permite que la molécula pueda formar enantiómeros, siendo que sus propiedades físicas son idénticas con excepción a la dirección en la que se hace girar el plano de la luz polarizada; la tirfostina B44 lo hace hacia la izquierda (-) mientras que la tirfostina B50 gira a la derecha (+). El sistema de enzimas de las células es capaz de distinguir entre la estructura enantiómerica, por lo que solo una de las tirfostinas puede enlazarse correctamente en el sitio activo quiral de una enzima y por tanto solo una de las tirfostinas tiene efecto biológico en las células cervicales. La diferencia estructural entre las tirfostinas B44 y B50 con las demás tirfostinas es la sustitución de grupo nitrilo por el grupo amida, el cual tiene como radical un hidrocarburo donde se encuentra el carbón quiral ramificado por un metilo y por el anillo de benceno lo que en teoría les resta reactividad con respecto a la tirfostina B42, y que experimentalmente fue incapaz de inhibir la fosforilación del receptor HER2.

En el caso de la tirfostina B46 (figura 4) observamos que la concentración a la cual disminuye la proliferación celular en CALO (A) es $3.12\mu\text{M}$; en HeLa (B) es $6.25\mu\text{M}$; y en INBL (C) $3.12\mu\text{M}$. Nuevamente observamos que la EC_{50} es igual en CALO e INBL, mientras que en HeLa es 2 veces mayor.

La estructura de la tirfostina B46 difiere de las demás tirfostinas por la sustitución del grupo nitrilo por el grupo amida, donde el radical de hidrocarburos se encuentra conformado por el propano y en la posición 3 se encuentra un anillo de benceno, esto permite que la molécula sea más reactiva que otras como la tirfostina 25. Sin embargo, a pesar de que observamos que inhibe la proliferación celular a las concentraciones antes mencionadas, en ensayos de inmunoblot HER2 ya no se detecta en células cultivadas en presencia de éstas tirfostinas, con excepción de la B42.(datos no mostrados)

Con la tirfostina B48 (figura 5) se determinó para CALO (A) una EC_{50} de $12.5\mu M$; para HeLa (B), $50\mu M$; y para INBL $12.5\mu M$. En CALO e INBL se requiere la misma concentración mientras que para HeLa se requiere una concentración 4 veces mayor. La estructura de la tirfostina B48 difiere de las demás tirfostinas en el radical de hidrocarburo (anillo de benceno) enlazado directamente con la amida; esto permite que la molécula tienda a ser un poco menos reactiva que la tirfostina B42.

Usando la tirfostina B50 (Figura 6) obtuvimos una EC_{50} en CALO (A) de $3.12\mu M$; en HeLa (B) $12.5\mu M$ y en INBL (C) $12.5\mu M$. Podemos observar que HeLa e INBL inhiben a la misma concentración ($12.5\mu M$) mientras que CALO requiere una concentración tres veces menor. La estructura de la tirfostina B50 está descrita junto con la tirfostina B44.

La tirfostina B56 (Figura7) inhibe la proliferación de CALO (A) a una EC_{50} de $1.56\mu M$; en HeLa (B) a $3.12\mu M$ y en INBL (C) a $1.56\mu M$. Para CALO e INBL se necesita la misma concentración ($1.56\mu M$) mientras que HeLa requiere una concentración 2 veces mayor ($3.12\mu M$) para inhibir la proliferación celular. Estas diferencias son posiblemente debidas a la variabilidad propia de cada línea celular. La tirfostina B56 tiene una cadena más larga de hidrocarburos enlazada al grupo amida y en la posición 4 tiene un anillo benceno lo que le permite tener una cadena saturada inerte pero estable.

Haciendo una comparación de la estructura química de las tirfostinas podemos entender porqué las curvas de inhibición de la proliferación realizadas utilizando la tirfostina B42 presentan un comportamiento diferente con respecto a la demás tirfostinas y porqué justamente ésta tirfostina es la única que inhibe aunque sea de manera parcial la fosforilación del receptor HER2 de acuerdo a nuestros resultados descritos posteriormente.

En la tabla 1 se muestra el EC_{50} para cada tirfostina, ésta es la concentración mínima necesaria a la cual se inhibe la proliferación celular de manera visible en las gráficas con respecto al punto de inicio.

Debido a que las tirfostinas están disueltas en dimetilsulfóxido (DMSO) se realizaron controles con el disolvente a las concentraciones EC_{50} de cada una de las tirfostinas con el fin de determinar si los comportamientos se veían afectados por el DMSO y como se aprecia en las figuras 1-7 observamos comportamientos distintos a los descritos por las tirfostinas o sea que el disolvente no afectó los ensayos.

Después de determinar el efecto inhibitorio de las diferentes tirfostinas sobre la proliferación celular, determinamos la presencia de la proteína HER2 en las líneas celulares de cáncer cervical HeLa, CALO e INBL. Se utilizó como control positivo la línea celular de cáncer de mama MCF-7 en la cual se sabe que ésta proteína se encuentra sobre-expresada, como control negativo utilizamos la línea celular U937 y linfocitos normales de sangre periférica que no expresan HER2 ya que son células de origen hematopoyético.

De cultivos celulares de las líneas CALO, INBL y HeLa se obtuvieron lisados celulares y se inmunoprecipitó la proteína HER2 utilizando un anticuerpo específico. Se utilizó el mismo número de células con la finalidad de comparar la

cantidad de proteína presente en cada línea celular. A partir de los inmunoprecipitados se separó la proteína mediante electroforesis y se identificó por inmunoblot.

En las figuras 8 y 9 (B) podemos observar la presencia de una proteína de aproximadamente 185 kDa la cual corresponde a la proteína HER2 de acuerdo al peso molecular reportado para la proteína y por la especificidad del anticuerpo anti-neu utilizado. Cada carril corresponde a las líneas celulares MCF-7, HeLa, INBL, CALO y C-33 respectivamente. En la figura 9 en (B) se observa que la proteína HER2 no está presente ni en la línea U937 ni en linfocitos.

Sabiendo que el cáncer cervical, a diferencia del cáncer de mama, está relacionado con la presencia del virus de papiloma humano (VPH) y que las líneas celulares CALO, INBL y HeLa están infectadas con VPH 16₍₃₉₎, utilizamos la línea celular C-33 que está libre de infección por VPH, para analizar si la presencia del virus VPH de alguna manera está relacionada con la sobre-expresión de HER2. Los resultados muestran que HER2 se expresa, aunque en una proporción cualitativamente menor a la encontrada en las otras líneas celulares.

Con la finalidad de determinar si la disminución de la proliferación celular estaba relacionada con una disminución de la fosforilación de HER2 se analizó el estado de fosforilación del receptor antes y después de la exposición a las tirfostinas.

Para determinar el estado de fosforilación de la proteína HER2 se obtuvieron lisados celulares y a partir de ellos se inmunoprecipitó la proteína HER2. Los inmunoprecipitados fueron separados mediante electroforesis SDS-PAGE, transferidos a membrana de nitrocelulosa y analizados por inmunoblot utilizando anticuerpos anti-fosfotirosina.

Las figuras 8A y 9A muestran que el receptor se encuentra fosforilado en tirosina, lo que parece indicar que sin un estímulo aparente de factor de crecimiento, el receptor se autofosforila. Así como en la figura 9 se observa que en los carriles de las líneas celulares U937 y en los linfocitos no se encuentra presente HER2 ya que no se observan las bandas correspondientes a ésta proteína.

Para corroborar que la proteína fosforilada era HER2 la membrana fue incubada en medio ácido para eluir el anticuerpo antifosfotirosina y se incubó nuevamente con un anticuerpo anti-neu, el resultado se observa en las figura 8B y 10B

Para determinar el efecto inhibitorio de las tirfostinas sobre la fosforilación en tirosina del receptor HER2, se incubaron las células en presencia de la tirfostina que mostró mayor efecto inhibitorio sobre la proliferación, en éste caso B42. Las células se incubaron durante 16 horas en presencia del fármaco, posteriormente se lisaron y se inmunoprecipitó la proteína HER2.

Los inmunoprecipitados fueron separados por electroforesis SDS-PAGE, transferidos a membranas de nitrocelulosa y analizados por inmunoblot con anticuerpo antifosfotirosina. En la Figura 10A se muestra el blot antifosfotirosina en el cual se observa que al haber estado las células en contacto con la tirfostina B42 se impidió al menos de manera parcial la fosforilación de HER2. Se observa que la proteína HER2 está presente en todas las líneas celulares. Se utilizó como

control un cultivo de la línea celular INBL que no fue sometido al tratamiento con tirfostina. En la figura 10 se puede observar la presencia de la proteína fosforilada.

Para confirmar la identidad y presencia de la proteína se incubó la membrana en medio ácido para eluir el anticuerpo antifosfotirosina y se volvió a incubar con el anticuerpo específico anti-neu (figura 10B).

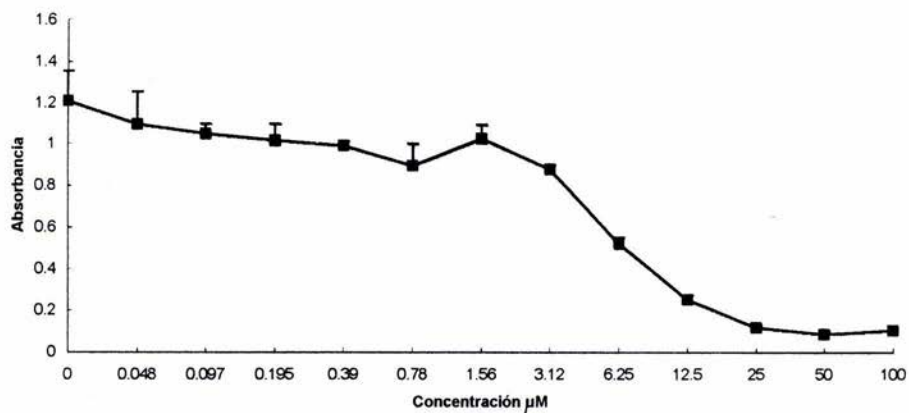
Otro de los objetivos del proyecto era determinar la presencia de la proteína por medio de la técnica de inmunofluorescencia, sin embargo, tras haber realizado algunos ensayos haciendo varias modificaciones a la técnica los resultados no fueron satisfactorios, lo único que pudimos observar por inmunofluorescencia fueron imágenes como la que presentamos en la figura 11. En A se observa un grupo de células HeLa fijadas con glutaraldehído y observadas con luz visible a una resolución 40x, en B se observan las mismas células después del tratamiento para inmunofluorescencia con luz ultravioleta en el microscopio LEICA a una resolución 40x. No apreciamos la presencia de HER2 ya que solo se observa una región teñida de color verde mientras que las células se encuentran distribuidas en todo el campo. Probablemente el anticuerpo que utilizamos para detectar la proteína mediante Western Blot no sea útil para la técnica de inmunofluorescencia. Sería necesario realizar ésta técnica con otro anticuerpo.

RESULTADOS

Inhibición de la proliferación celular inducida por la tirfostina 25

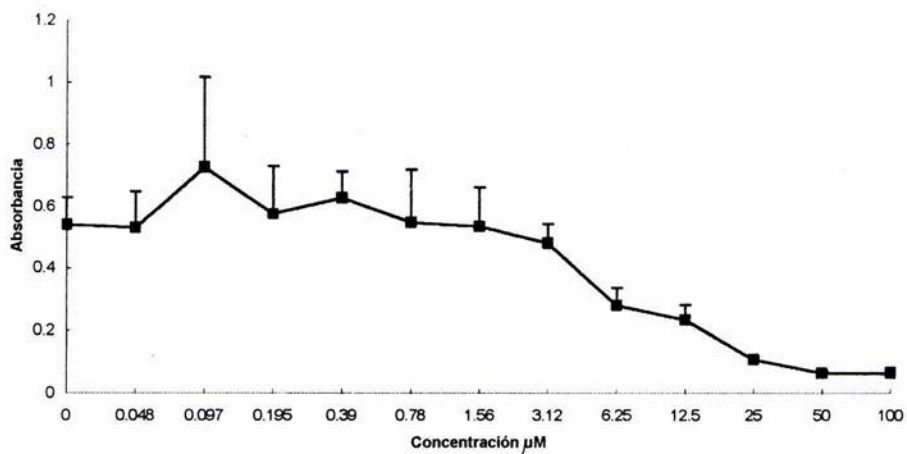
A:

CALO Tyr 25

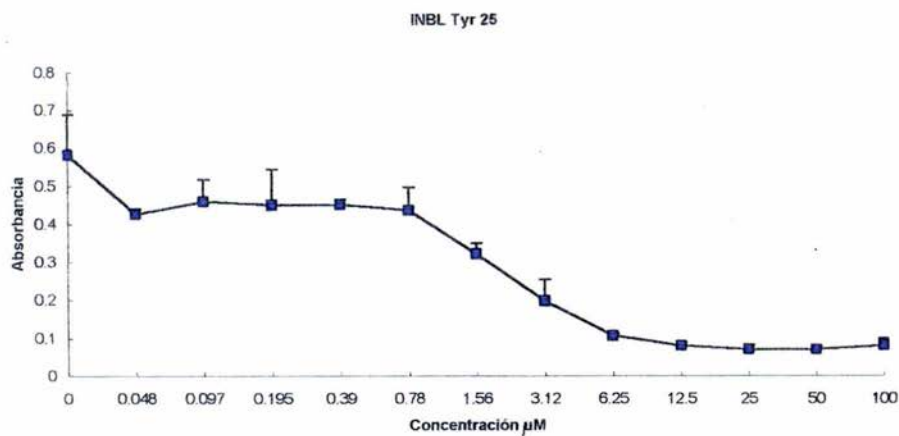


B:

HeLa Tyr 25



C



D

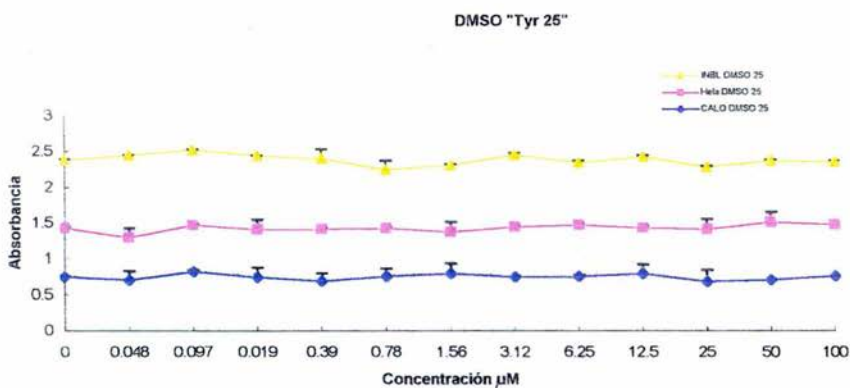
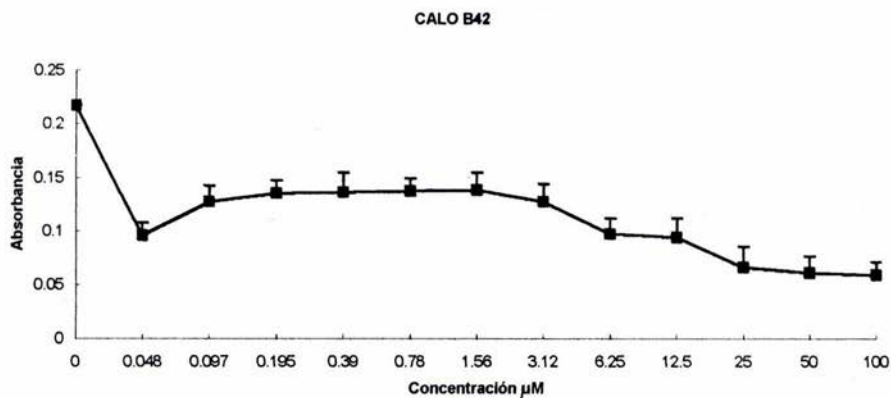


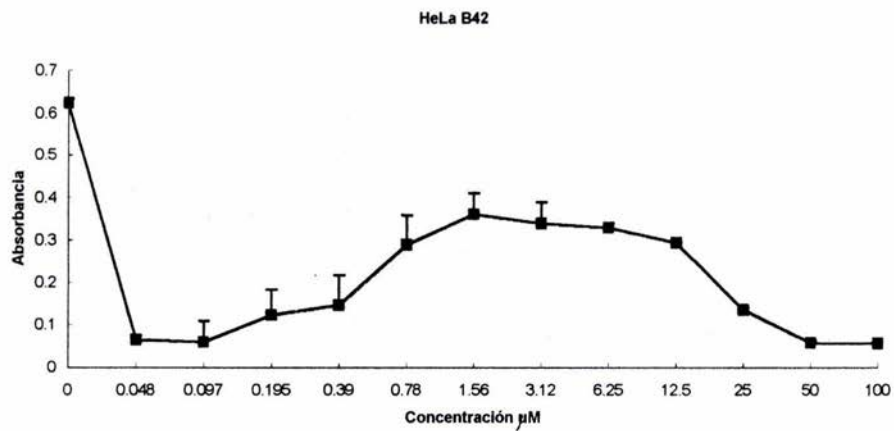
Figura 1. Inhibición de la proliferación celular inducida por la tirfostina 25 en las líneas celulares CALO(A), HeLa(B), INBL(C) y un control de DMSO (D). Se realizó una dilución seriada bajo las mismas condiciones usando la misma cantidad de células. Se graficaron los diversos valores de absorbancia para cada una de las concentraciones celulares expresadas en $\mu\text{mo/L}$ en una escala 0 a $100\mu\text{M}$. Los cultivos celulares se incubaron en presencia de la tirfostina 25 durante 120 horas. Se realizó un ensayo con DMSO para cada una de las líneas celulares como control para evaluar su efecto. Los resultados corresponden al promedio de 3 ensayos para cada línea celular.

Inhibición de la proliferación celular inducida por la tirfostina B42

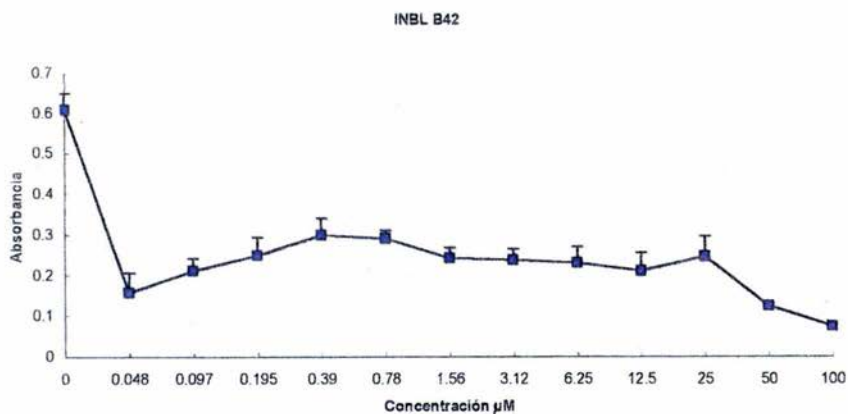
A:



B:



C:



D:

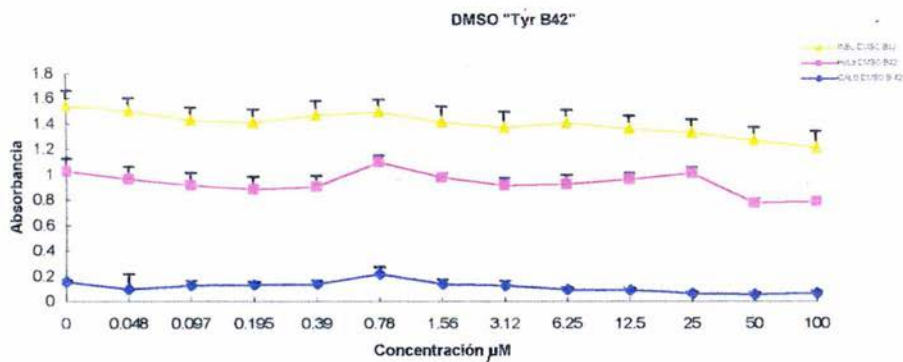
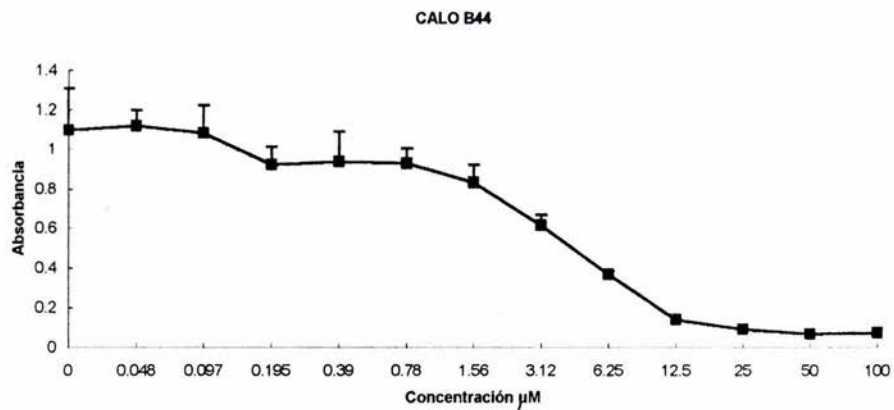


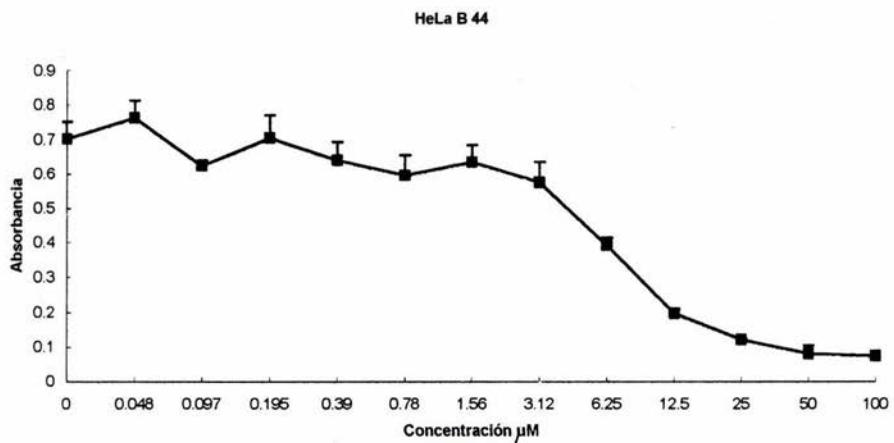
Figura 2. Inhibición de la proliferación celular inducida por la tirfostina B42 en las líneas celulares CALO(A), HeLa(B), INBL(C) y un control de DMSO (D). Se realizó una dilución seriada bajo las mismas condiciones usando la misma cantidad de células. Se graficaron los diversos valores de absorbancia para cada una de las concentraciones celulares expresadas en $\mu\text{mo/L}$ en una escala 0 a $100\mu\text{M}$. Los cultivos celulares se incubaron en presencia de la tirfostina B42 durante 120 horas. Se realizó un ensayo con DMSO para cada una de las líneas celulares como control para evaluar su efecto. Los resultados corresponden al promedio de 3 ensayos para cada línea celular.

Inhibición de la proliferación celular inducida por la tirfostina B44

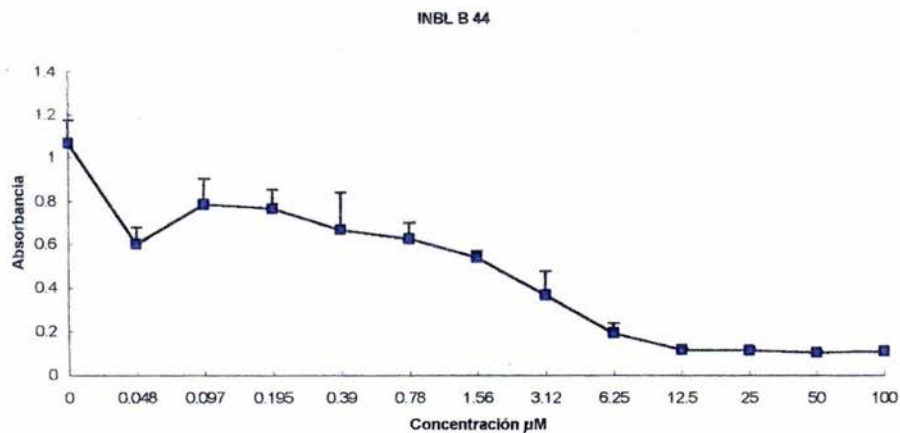
A:



B:



C:



D:

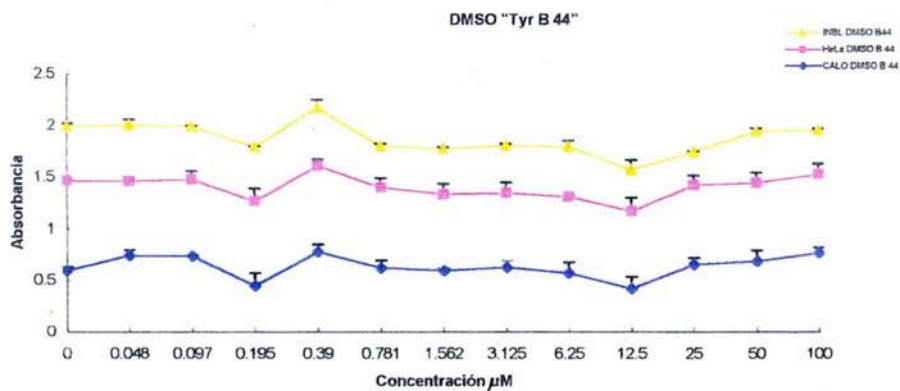
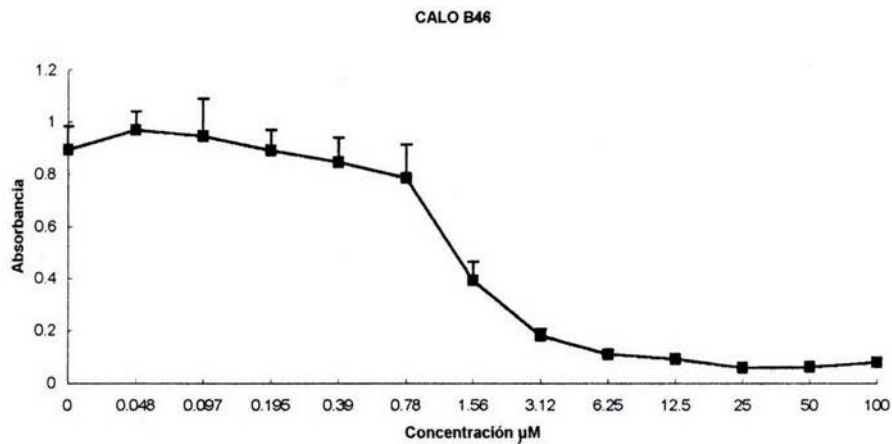


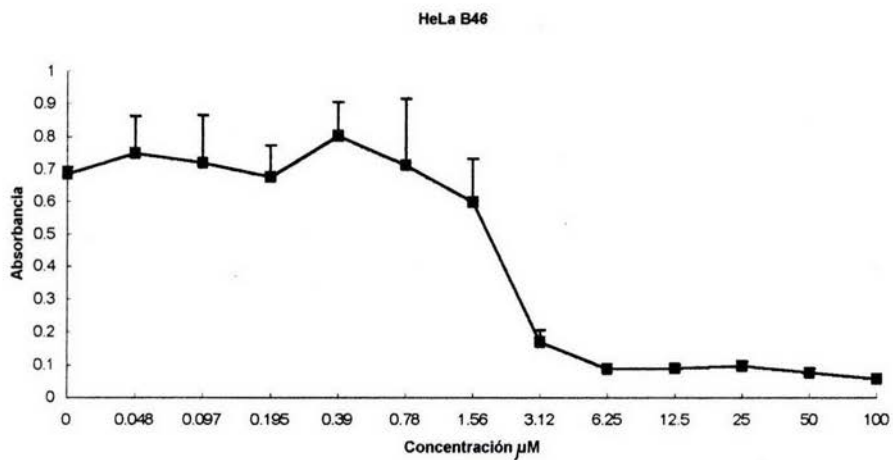
Figura 3. Inhibición de la proliferación celular inducida por la tirfostina B44 en las líneas celulares CALO(A), HeLa(B), INBL(C) y un control de DMSO (D). Se realizó una dilución seriada bajo las mismas condiciones usando la misma cantidad de células. Se graficaron los diversos valores de absorbancia para cada una de las concentraciones celulares expresadas en $\mu\text{mo/L}$ en una escala 0 a $100\mu\text{M}$. Los cultivos celulares se incubaron en presencia de la tirfostina B44 durante 120 horas. Se realizó un ensayo con DMSO para cada una de las líneas celulares como control para evaluar su efecto. Los resultados corresponden al promedio de 3 ensayos para cada línea celular.

Inhibición de la proliferación celular inducida por la tirfostina B46

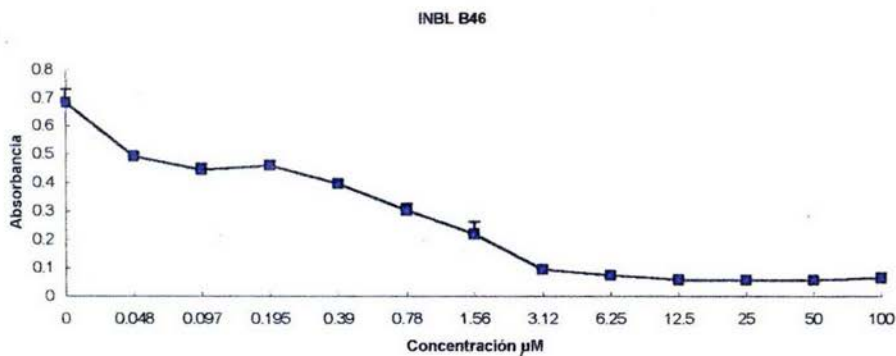
A:



B:



C:



D:

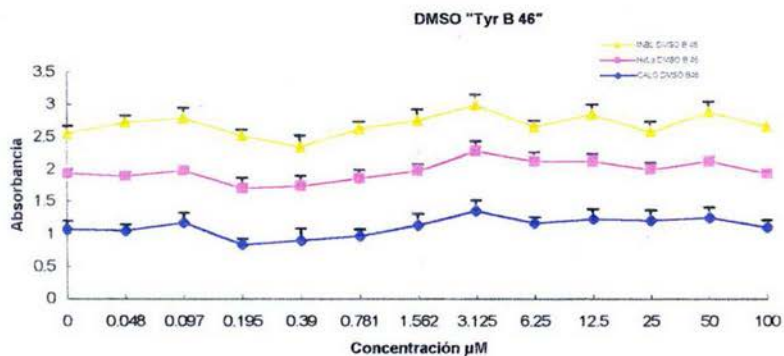
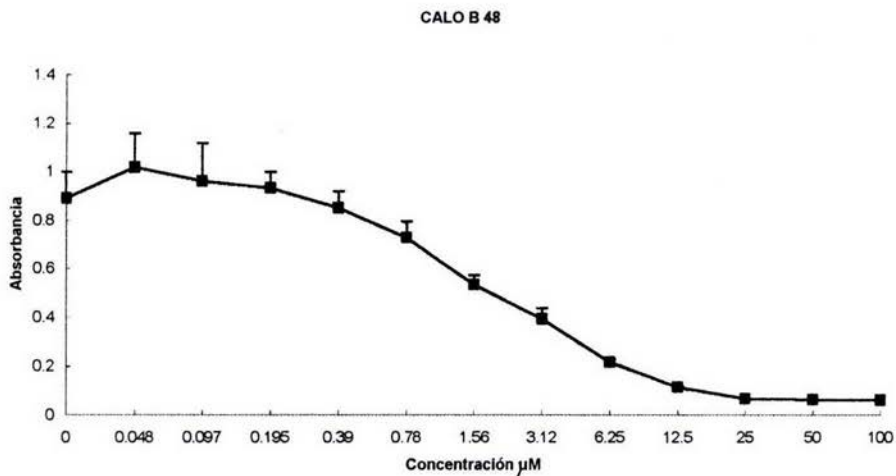


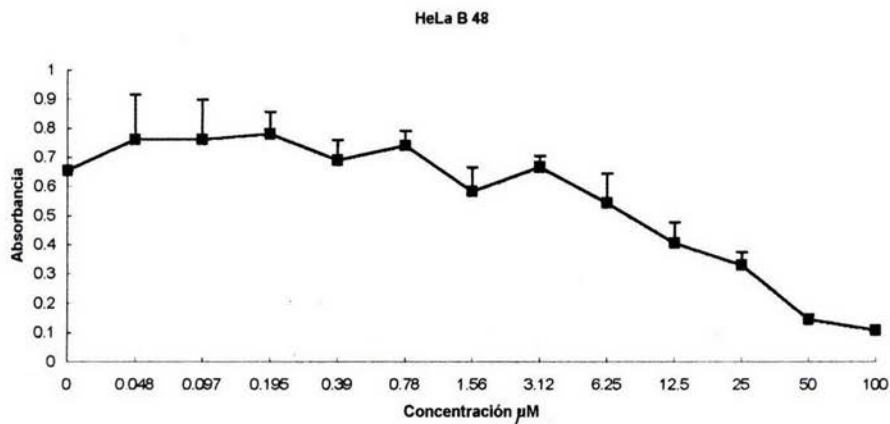
Figura 4. Inhibición de la proliferación celular inducida por la tirifostina B46 en las líneas celulares CALO(A), HeLa(B), INBL(C) y un control de DMSO (D). Se realizó una dilución seriada bajo las mismas condiciones usando la misma cantidad de células. Se graficaron los diversos valores de absorbancia para cada una de las concentraciones celulares expresadas en $\mu\text{mol/L}$ en una escala 0 a $100\mu\text{M}$. Los cultivos celulares se incubaron en presencia de la tirifostina B46 durante 120 horas. Se realizó un ensayo con DMSO para cada una de las líneas celulares como control para evaluar su efecto. Los resultados corresponden al promedio de 3 ensayos para cada línea celular.

Inhibición de la proliferación celular inducida por la tirfostina B48

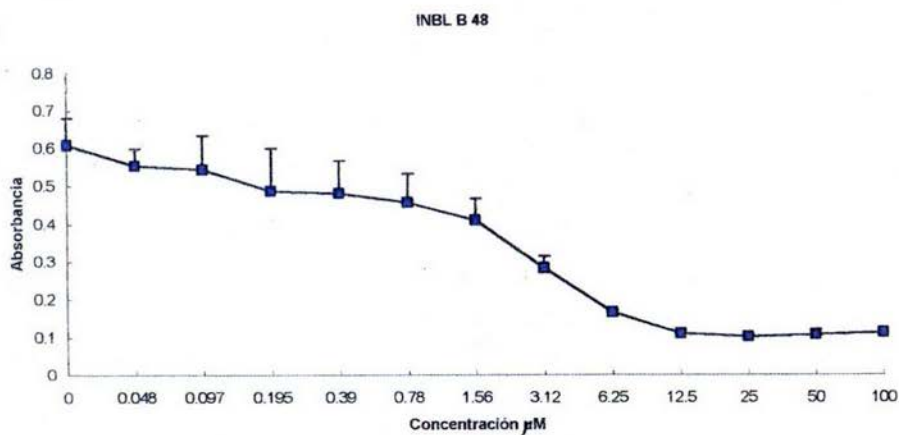
A:



B:



C:



D:

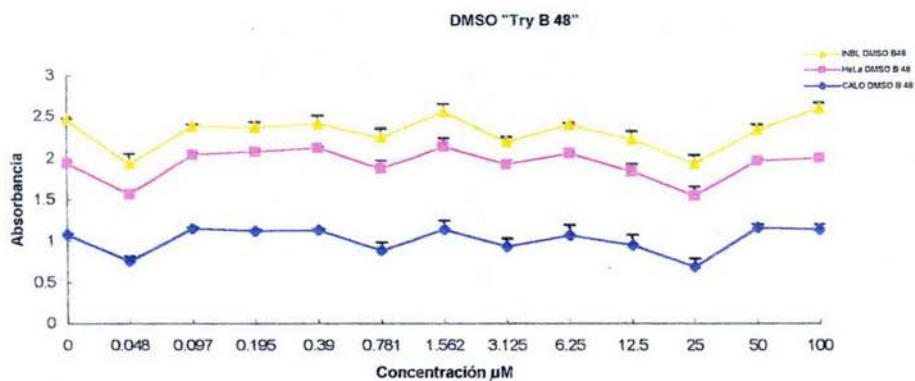
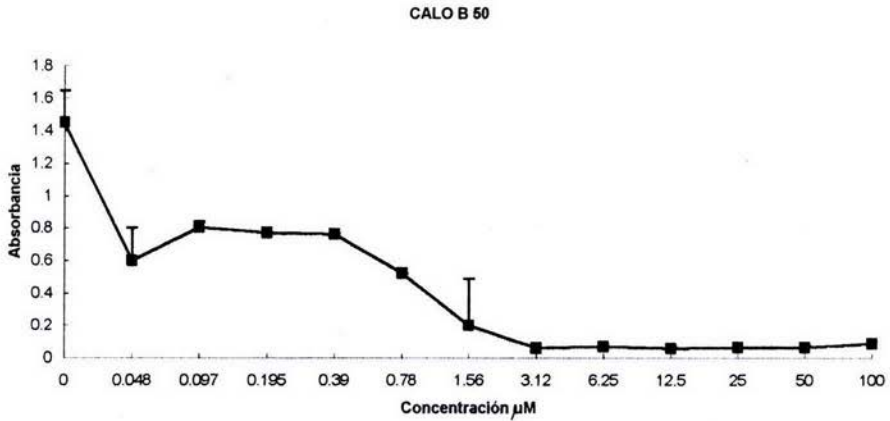


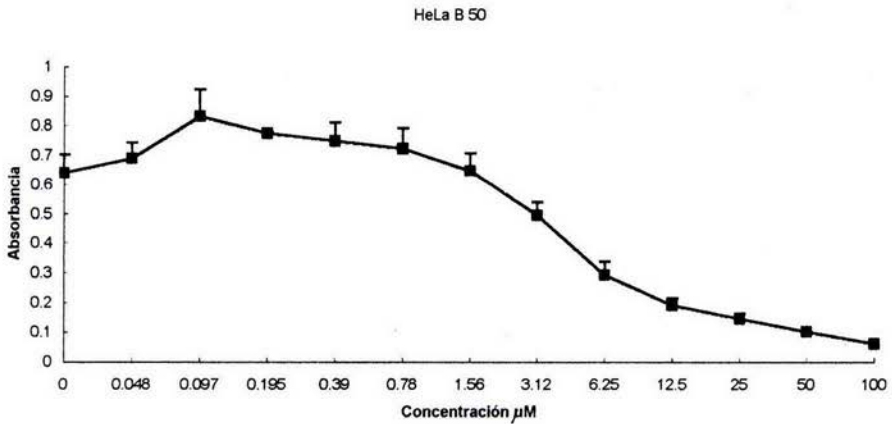
Figura 5. Inhibición de la proliferación celular inducida por la tirifostina B48 en las líneas celulares CALO(A), HeLa(B), INBL(C) y un control de DMSO (D). Se realizó una dilución seriada bajo las mismas condiciones usando la misma cantidad de células. Se graficaron los diversos valores de absorbancia para cada una de las concentraciones celulares expresadas en $\mu\text{mo/L}$ en una escala 0 a $100\mu\text{M}$. Los cultivos celulares se incubaron en presencia de la tirifostina B48 durante 120 horas. Se realizó un ensayo con DMSO para cada una de las líneas celulares como control para evaluar su efecto. Los resultados corresponden al promedio de 3 ensayos para cada línea celular.

Inhibición de la proliferación celular inducida por la tirfostina B50

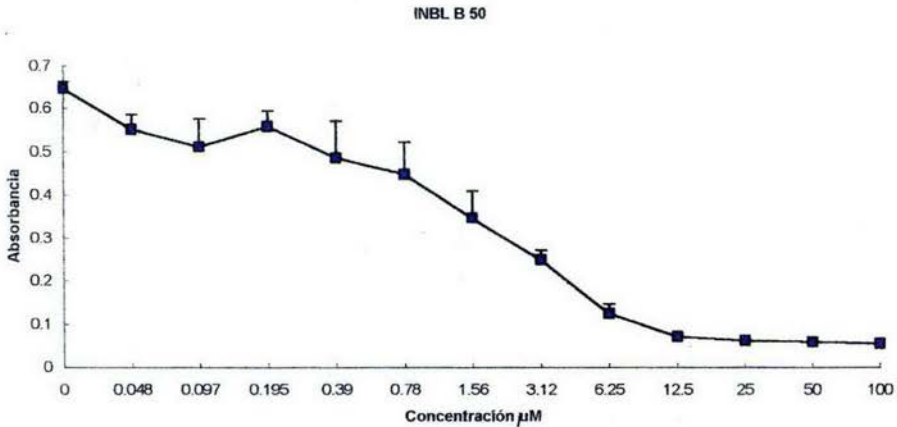
A:



B:



C:



D:

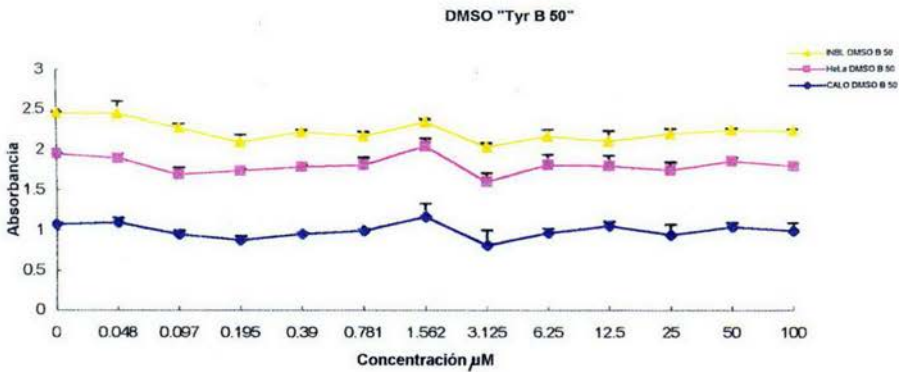
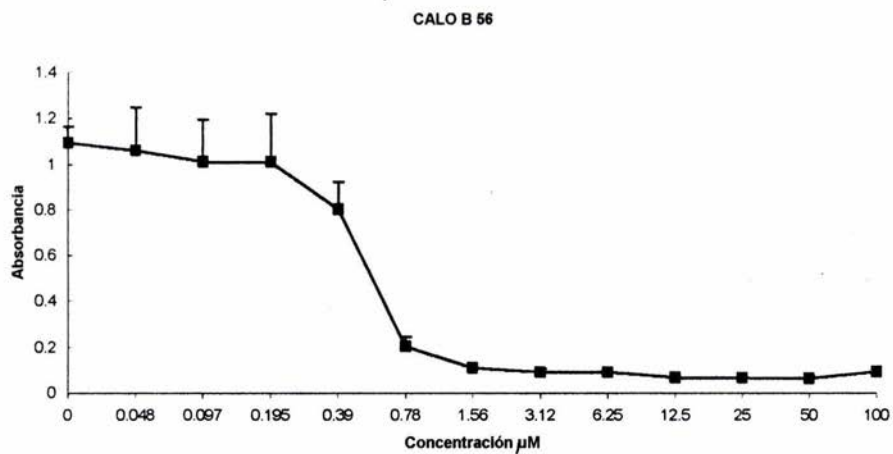


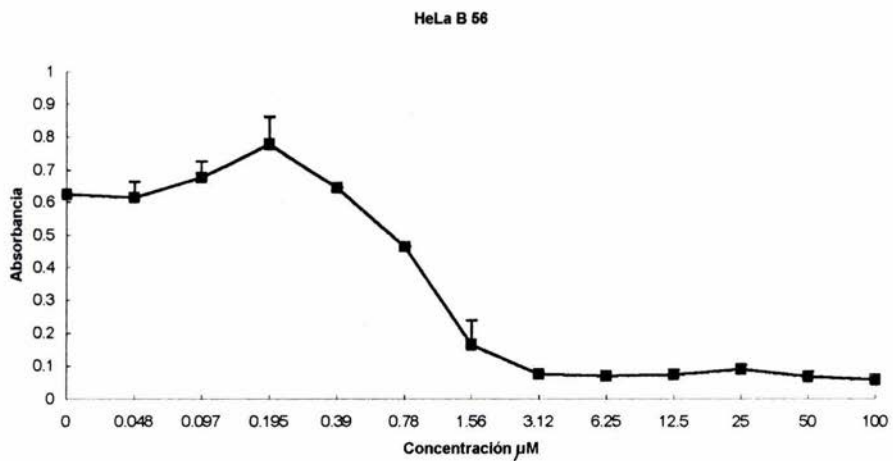
Figura 6. Inhibición de la proliferación celular inducida por la tirfostina B50 en las líneas celulares CALO(A), HeLa(B), INBL(C) y un control de DMSO (D). Se realizó una dilución seriada bajo las mismas condiciones usando la misma cantidad de células. Se graficaron los diversos valores de absorbancia para cada una de las concentraciones celulares expresadas en $\mu\text{mol/L}$ en una escala 0 a $100\mu\text{M}$. Los cultivos celulares se incubaron en presencia de la tirfostina B50 durante 120 horas. Se realizó un ensayo con DMSO para cada una de las líneas celulares como control para evaluar su efecto. Los resultados corresponden al promedio de 3 ensayos para cada línea celular.

Inhibición de la proliferación celular inducida por la tirfostina B56

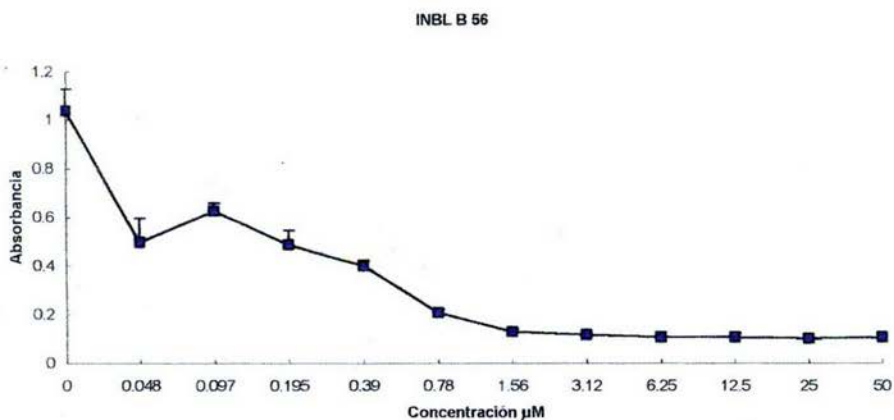
A:



B:



C:



D:

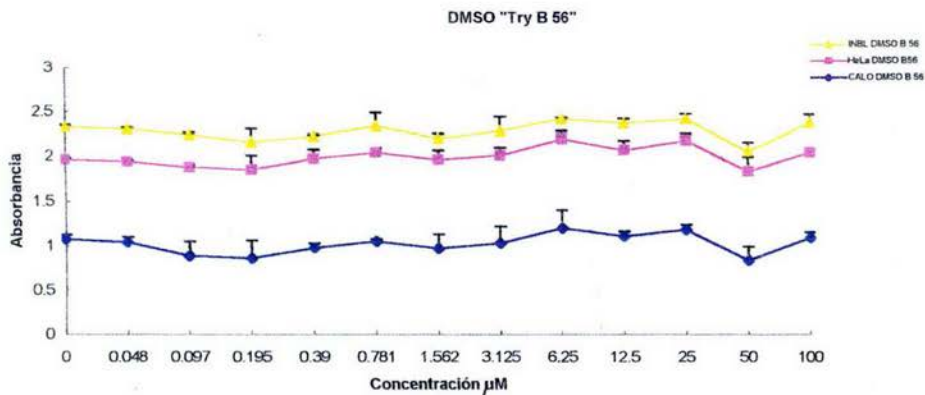


Figura 7. Inhibición de la proliferación celular inducida por la tirifostina B56 en las líneas celulares CALO(A), HeLa(B), INBL(C) y un control de DMSO (D). Se realizó una dilución seriada bajo las mismas condiciones usando la misma cantidad de células. Se graficaron los diversos valores de absorbancia para cada una de las concentraciones celulares expresadas en $\mu\text{mo/L}$ en una escala 0 a $100\mu\text{M}$. Los cultivos celulares se incubaron en presencia de la tirifostina B56 durante 120 horas. Se realizó un ensayo con DMSO para cada una de las líneas celulares como control para evaluar su efecto. Los resultados corresponden al promedio de 3 ensayos para cada línea celular.

Concentración ($EC_{50}\mu M$) necesaria para inhibir la proliferación celular

Tirfostina	CALO (μM)	HeLa (μM)	INBL (μM)
25	12.5	25	6.25
B42	0.048	0.048	0.048
B44	12.5	25	12.5
B46	3.12	6.25	3.12
B48	12.5	50	12.5
B50	3.12	12.5	12.5
B56	1.56	3.12	1.56

Tabla 1. Concentración ($EC_{50}\mu M$) necesaria para inhibir la proliferación con las diferentes tirfostinas. Se realizaron ensayos de inhibición probando diferentes concentraciones de las tirfostinas. En ésta tabla se muestra la concentración óptima para inducir la mayor inhibición de la proliferación ($EC_{50}\mu M$).

Presencia y fosforilación de HER2

(A) BLOT ANTI-PY

Ipp: HER2

Blot:



MCF-7

HeLa

INBL

CALO

C-33

(B) BLOT HER2

Ipp: HER2

Blot: HER2



MCF-7

HeLa

INBL

CALO

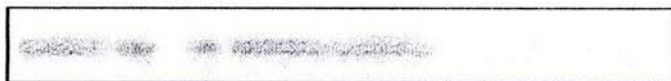
C-33

Figura 8. Presencia y estado de fosforilación de la proteína HER2 en las líneas celulares MCF-7, HeLa, INBL, CALO y C-33. Se inmunoprecipitó la proteína a partir de lisados celulares, el inmunoprecipitado fue separado mediante electroforesis (SDS-PAGE 10%) y las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa. (A) La membrana fue incubada con anticuerpos antifosfotirosina para determinar el estado de fosforilación de la proteína HER2. La proteína se encuentra fosforilada si el estímulo con factores externos como el EGF que se sabe induce fosforilación. (B) La membrana fue incubada en 0.1M de glicina, 5% SDS pH 2.5 durante 60 minutos a 70°C, lavada y bloqueada con BSA. Posteriormente se incubó en presencia de anticuerpo anti-HER2 para demostrar que la proteína fosforilada es en realidad HER2.

(A) BLOT ANTI-PY

Ipp: HER2

Blot: α PY

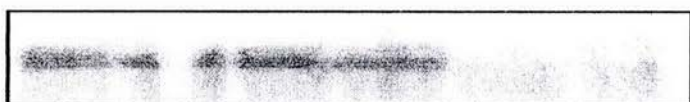


DMSO HeLa CALO INBL U937 LINFOCITOS

(B) BLOT ANTI-HER2

Ipp: HER2

Blot: HER2



DMSO HeLa CALO INBL U937 LINFOCITOS

Figura 9. Presencia de la proteína HER2 en las líneas celulares HeLa, CALO, INBL, U937 y Linfocitos. Se inmunoprecipitó la proteína a partir de lisados celulares y posteriormente fue separada por electroforesis (SDS-PAGE 10%) y transferida a membrana de nitrocelulosa. Los dos últimos carriles de éste inmunoblot corresponden a dos controles negativos donde no está presente HER2; El primer carril corresponde a células HeLa tratadas únicamente con DMSO como control negativo. (A) Inmunoblot con anticuerpos antifosfotirosina (PY20 y PY99) donde se observa que la proteína HER2 está fosforilada en tirosina (B) La membrana fue incubada en medio ácido, bloqueada con BSA y probada nuevamente con anticuerpos anti HER2 para demostrar la presencia de ésta proteína. La proteína HER2 no está presente en las células U937 ni en linfocitos de sangre periférica de donadores normales.

Inhibición de la fosforilación en tirosina de la proteína HER2 por la tirfostina B42.

(A) BLOT ANTI-PY

Ipp: HER2/Tyr B42

Blot: α PY



(B) BLOT ANTI-HER2

Ipp: HER2/Tyr B42

Blot: HER2

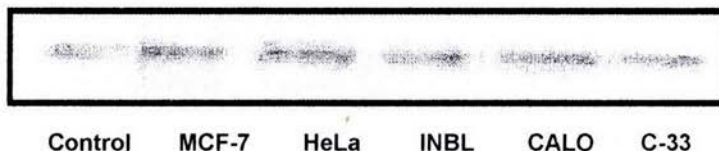
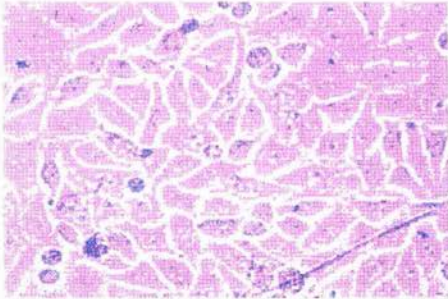
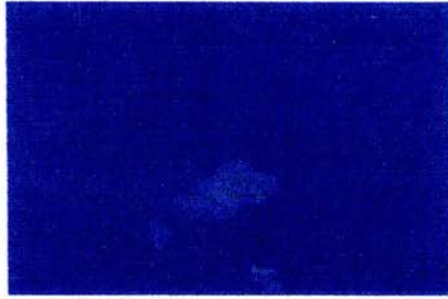


Figura 10. Inhibición de la fosforilación de la proteína HER2 por la tirfostina B42. Las líneas celulares MCF-7, HeLa, INBL, CALO y C-33 fueron expuestas a la tirfostina B42 por un periodo de 16 horas a una concentración $0.048\mu\text{M}$. Las células se lisaron y se inmunoprecipitó la proteína HER2. Las proteínas inmunoprecipitadas se separaron mediante electroforesis (SDS-PAGE 10%) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. El primer carril corresponde al control de las células INBL que no se expusieron a la tirfostina y se trató de la misma forma que el resto. (A) La membrana de nitrocelulosa se incubó con los anticuerpos antifosfotirosina (PY20 y PY99) en las líneas HeLa, INBL, CALO y C-33 no se observó la proteína fosforilada. (B) Se observó presencia de la proteína HER2 después de incubar la membrana en medio ácido para eliminar el anticuerpo antifosfotirosina y de incubarla nuevamente con el anticuerpo anti-neu.

Inmunofluorescencia



(A)



(B)

Figura 11. Determinación de la presencia de HER2 en células HeLa mediante la técnica de inmunofluorescencia. Imagen de células HeLa tratadas con la técnica de inmunofluorescencia. (A) Células INBL observadas con luz visible en el microscopio Leica a una resolución 40x. (B) Las mismas células después del tratamiento con el anticuerpo antilfluoresceína observadas con luz ultravioleta en el microscopio Leica a una resolución 40x.

DISCUSIÓN

El protooncogen *neu* codifica para una proteína transmembranal de 185KDa con actividad intrínseca de tirosina cinasa llamada HER2. Este receptor es semejante al receptor del factor de crecimiento epidérmico. Se ha reportado que existe sobre-expresión de la proteína HER2 en algunos tipos de tumores humanos como adenocarcinomas ginecológicos que incluyen los de ovario, endometrio, trompa de Falopio y cérvix, dicha sobre-expresión se debe a la amplificación del gen.

Se han realizado diversos estudios acerca de la sobre-expresión de la proteína pero no se ha estudiado mucho acerca de la actividad de tirosina cinasa del receptor y la posibilidad de utilizar inhibidores para interferir con su actividad.

En el presente estudio determinamos la presencia de HER2 así como su estado de fosforilación y evaluamos el efecto de diferentes tirfostinas sobre la fosforilación del mismo

Debido a que HER2 es un receptor de membrana cuya actividad conduce a una cascada de fosforilación en cinasas citoplasmáticas (incluyendo *ras* y *raf*)⁽³⁵⁾ lo que incrementa la transcripción proteica y el crecimiento celular, no resulta extraño que las células cancerosas crezcan de manera incontrolada, por lo que en éste caso procedimos a determinar la presencia y sobre-expresión del receptor en las líneas celulares seleccionadas, determinar su estado de fosforilación y sobre todo determinar si el crecimiento acelerado de las células tenía una relación directa con la sobre-expresión del receptor y su fosforilación, Esto lo logramos utilizando las tirfostinas, que al bloquear la actividad tirosina cinasa y al mismo tiempo disminuir la proliferación celular, puso de manifiesto el papel de HER2 en el crecimiento celular desenfrenado característico de las células cancerosas en las líneas celulares que trabajamos, ya que al utilizar un inhibidor disminuía el crecimiento celular y a su vez observamos que HER2 no estaba fosforilado, lo que nos indica que este hecho era el que había detenido el crecimiento celular, cuando menos de manera parcial.

A pesar de que sabemos que el VPH juega un papel decisivo en el cáncer cervicouterino, ya que inactiva a las proteínas supresoras de tumor Rb y p53 como se mencionó anteriormente, creemos que éste hecho solo permite que HER2 actúe de manera anárquica al carecer de los medios de control propios de las células normales y esto lo confirma el hecho de que HER2 esté sobre-expresado en la línea celular C-33 la cual está libre de infección por VPH₍₁₃₎.

Por lo tanto, en base a nuestros resultados sabemos que al igual que en el cáncer de mama, uno de los puntos clave para el desarrollo de tratamientos contra el cáncer cervicouterino radica en el bloqueo de la red de señales bioquímicas que desencadena HER2 tras la autofosforilación que deriva de la sobre-expresión de éste receptor.

De manera general en nuestros resultados, observamos que para la línea celular HeLa se requiere una mayor concentración de tirfostina para inhibir la proliferación celular en una proporción de dos a cuatro veces más que en CALO e INBL, esto es debido a que ésta línea celular posiblemente expresa algunos genes los cuales no expresan ni CALO ni INBL, lo cual forma parte de la variabilidad de cada línea celular ya que HeLa es una línea celular obtenida de una paciente de un tumor cervical del año de 1952 y las líneas celulares CALO e INBL fueron obtenidas a partir de biopsias

de carcinoma cervicouterino de pacientes mexicanas en diferentes estadios de la enfermedad.

Tomando en cuenta esto, realizamos ensayos con inhibidores de tirosina cinasa análogos a la tirosina llamados tirfostinas.

Estos inhibidores fueron sintetizados recientemente y no se conocen sus efectos tóxicos ni sus mecanismos de acción sobre el receptor y las células, aunque experimentalmente observamos que a concentraciones altas provoca muerte celular.

La tirfostina B42 inhibe la fosforilación del receptor HER2 a concentraciones pequeñas, lo que posiblemente se debe a su estructura química ya que es la más parecida a la tirosina y a su vez tiene menor impedimento estérico, esto permite que sea reconocida por el receptor y se una a él. Analizando su estructura química llegamos a suponer que el nitrógeno del grupo amida tiene más posibilidad de enlazarse al grupo carboxilo del receptor ya que tiene un par de electrones libres que le dan una carga negativa capaz de atacar al carbono del grupo carboxilo del receptor, el cual posee una carga parcial positiva, éste hecho nos ayudaría a explicar el porqué sólo la tirfostina B42 inhibe la fosforilación.

A diferencia de la B42, la tirfostina 25 carece del grupo amida, la B48 tiene un anillo de benceno unido al nitrógeno de la amida por lo que los electrones están en resonancia y la hacen poco reactiva, mientras que los enantiómeros B44 y B50 tienen un grupo metilo en el carbono adyacente al nitrógeno de la amida lo que provoca impedimento estérico para que se una al receptor e impida la fosforilación.

En la tirfostina B46 existen tres carbonos más entre el nitrógeno y el anillo bencénico y en la tirfostina B56 existen cuatro lo que aumenta las diferencias estructurales con respecto a la tirosina, además de aumentar el impedimento estérico, por lo que creemos que no se puede unir al receptor.

Mientras que la tirfostina B42 inhibe la proliferación celular a concentraciones bajas y altas, en el primer caso debido a inhibición de la fosforilación en el segundo caso posiblemente a la toxicidad de la tirfostina; sin embargo, esto no pasa a concentraciones medias.

Cuando se analizó el efecto de las tirfostinas sobre la fosforilación de HER2 encontramos que la tirfostina B42 inhibe de manera competitiva a la enzima que fosforila al receptor, esto se debe a que la estructura de la tirfostina es la más parecida al sustrato y tiene menor impedimento estérico.

Además de inhibir a HER2 existen reportes que mencionan que B42 es un inhibidor de la fosforilación de Jak 3 en CALO e INBL las cuales expresan las tres subunidades del receptor IL-2 (α , β y γ) las cuales son activas y una de las principales vías que desencadenan la unión del ligando a éste receptor es la vía Jak/Stat₍₄₃₎. Trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación han demostrado la presencia y activación de Jak 3 en las líneas CALO e INBL. La activación de Jak 3 tiene como consecuencia la fosforilación de Stat 3 y Stat 5 entre otras, estas moléculas son factores de transcripción las cuales son capaces de activar genes antiapoptóticos. Recientemente se ha demostrado que la tirfostina B42 inhibe a la Jak 3 presente en las células CALO e INBL. (Comunicación personal Arturo Valle Mendiola)

Este hecho podría explicar el motivo por el cual a concentraciones medias (10 μ M) las células mueren, ya que además de la posible toxicidad del fármaco estarían inhibiendo la expresión de proteínas antiapoptóticas (bcl-2, bcl-xL)₍₄₃₎

Con el fin de determinar si los comportamientos observados se deben al efecto de la tirfostina y no al disolvente (DMSO) se realizó un ensayo usando únicamente DMSO en lugar de tirfostinas. Observamos un comportamiento normal distinto a nuestros ensayos de inhibición en presencia de tirfostinas, con lo cual confirmamos que la inhibición de la proliferación se debió realmente a la presencia de la tirfostina.

Con el método de inmunofluorescencia no obtuvimos resultados satisfactorios debido a que el anticuerpo que utilizamos está diseñado para inmunoblots y no para ésta técnica, lo cual al parecer causó que éste no se uniera de manera efectiva a la proteína y no se pudiera ver la señal de inmunofluorescencia. Para realizar ésta técnica necesitaríamos un anticuerpo especial para inmunofluorescencia pero hasta ahora no existe alguno en el mercado.

APORTACIONES DEL TRABAJO

- La proteína HER2 se encuentra sobreexpresada en las líneas celulares CALO, HeLa, INBL y C-33.
- La presencia del VPH no es determinante para la sobreexpresión de HER2.
- Se determinó que la tirfostina B42 es un inhibidor de la fosforilación de HER2 con una EC_{50} de $0.048\mu\text{M}$.
- Cuando se bloquea la acción de HER2 se disminuye la tasa de crecimiento permitiendo entonces el control de la proliferación celular.
- Las tirfostinas 25, B42, B44; B46, B48, B50 y B56 inhiben la proliferación de las líneas celulares CALO, INBL y HeLa a diferentes concentraciones.
- Las tirfostinas 25, B44; B46, B48, B50 y B56 no inhiben la fosforilación de HER2 pero si inhiben la proliferación celular debido a la toxicidad del fármaco.
- Se encontró el EC_{50} para cada una de las tirfostinas utilizadas.
- La EC_{50} de la B42 es la más baja, por lo tanto la más eficaz y la única que a concentraciones pequeñas inhibe la fosforilación en los residuos de tirosina del receptor HER2 por lo tanto disminuye la proliferación celular, y a medida que la concentración aumenta se incrementa la toxicidad del fármaco, por lo que también aumenta la muerte celular.
- La tirfostina B42 es posiblemente un candidato en el tratamiento contra el cáncer cervicouterino ya que su acción radica en el bloqueo de la red de señales bioquímicas que desencadena HER2 tras la autofosforilación que deriva de la sobreexpresión de éste receptor y de ésta manera reduce la tasa de crecimiento de las células transformadas.

ANEXO 1

Preparación de Reactivos

Verseno

Para preparar 1 L se necesita:

Tris base	3.04 g
NaCl	8.00 g
KCl	0.4 g
EDTA	0.2 g

Se disuelve en agua Milli Q

Se ajusta pH 7.7

Se esteriliza en autoclave

Medio de congelación

Para preparar 10mL se necesitan:

DMSO	1mL
Suero Fetal de Bovino	9mL

Glutaraldehido 1.1%

Pesar 1.1 g de glutaraldehido y aforar a 100 mL de PBS o agua milli Q.

Cristal Violeta (0.1%)

Para 500mL

El cristal violeta se prepara en una solución amortiguadora de ácido fórmico.

NaOH	3.96 g
Ácido fórmico	4.28 mL

Ajustar a pH 6 y aforar a 500 mL de agua destilada o milli Q

Ácido acético (10%)

Ácido acético glacial	10mL
Agua destilada o milli Q	90mL

Buffer de lisis total

Para preparar 50 mL de buffer se necesita:

Tritón al 1%	0.5 mL
PMSF 0.1M en EtOH	0.5mL
Ortovanadato	50µL
EDTA 0.5M	100µL
NaCl 5M	1.5 mL
TRIS 1M	500µL
Aprotinina	1 mL
Fluoruro de sodio 0.1M	2mL
Pirofosfato de sodio	1mL
Leupeptina 1%	1mL
Pepstatina	2mL

Este buffer debe ser preparado el mismo día en que se va a usar o en su defecto puede ser preparado un día antes sin los siguientes reactivos los cuales deben ser agregados el mismo día de uso: PMSF, Aprotinina, pirofosfato de sodio.

Buffer de Laemmli 5x

Tris 1M pH 6.8	3.12mL
SDS	1 g
Azul de bromofenol	0.005g
Glicerol	5 mL
Agua milli Q	2 mL

Primero se disuelve el SDS en los 2 mL de agua y luego se agregan los demás reactivos.

Gel Separador al 10%

Acrilamida-Bisacrilamida	3.33mL
Buffer gel separador	1.25mL
SDS 10%	100 µL
Persulfato de amonio 1.5%	0.5mL

Agua destilada	4.8mL
TEMED	15 μ L
<u>Gel concentrador</u>	

Acrilamida-bisacrilamida	1.25mL
Buffer gel concentrador	2.5mL
SDS 10%	100 μ L
Persulfato de amonio 1.5%	0.5mL
Agua destilada	5.6mL
TEMED	15 μ L

Acrilamida – Bisacrilamida

Bisacrilamida	0.8g
Acrilamida	30g

Disolver en aproximadamente 30 mL de agua destilada, posteriormente se afora a 100mL si es necesario.

Usar guantes, cubre bocas y goggles ya que es muy tóxico.

PMSF

Se pesan 4.35 g y se disuelven en 250 mL de etanol al 96%

Usar guantes y cubre bocas ya que es muy tóxico.

Buffer gel concentrador

Disolver 6.05 g de Tris en 40 mL de agua, ajustar el pH a 6.8 y aforar a 100 mL.

Buffer gel separador

Disolver 36.3 g de Tris disuelto en 50mL, ajustar el pH a 8.8 y aforar a 100 mL.

Buffer de corrida 5X

Glicina	72g
Tris	15g

SDS 5g

Disolver el SDS en 100 mL de agua destilada, posteriormente disolver los demás reactivos y aforar a 1 litro.

Buffer de transferencia

Tris 3.02 g

Glicina 14.4 g

SDS 0.5 g

Se lleva a 700 mL con agua destilada y se ajusta el pH a 8.3, se afora a 800 mL y luego se agregan 200 mL de metanol.

TBS

NaCl 5M 30mL

Tris 1M 20mL

Aforar a 1 litro

TBS – tween

500mL de TBS más 500µL de Tween 20.

Solución reveladora

Se diluyen 51.5 mL de la solución concentrada (KodaK GBX CE) en 236.5 ml de agua se guarda en frasco ámbar para protegerlo de la luz.

Buffer de elución

Glicina 3.75 g

SDS 2.5 g

Se disuelve en 300 mL de agua destilada se ajusta el pH a 2.5 y se afora a 500mL.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bishop Michael J. Molecular themes in oncogenesis. *Cell*.64:235-248,1991.
2. Kumar R., Mahitosh M., Vadlamudi R. New insights into anti-HER2 monoclonal antibody research. *Seminars in Oncology*.27:84-91,2000.
3. Yarden Yasef. Biology of HER2 and its importance in breast cancer. *Oncology*.61:1-13,2001.
4. Selvarajan S., Bay B.H., Choo A., Chuah K.L. Sivaswaren C.R. Effect of fixation period on HER2/neu gene amplification detected by fluorescence *in situ* hibridization in invasive breast carcinoma. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*.50:1693-1696,2002.
5. Zwick E., Bange J., Ullrich A. Receptor tyrosine kinase signaling as a target for cancer intervention strategies. *Endocrine-Related Cancer*.8:161-173,2001.
6. Neve R.M., Lane H.A., Hynes N.E. The role of overexpressed HER2 in transformation. *Annals of Oncology*.12:s9-s13,2001.
7. Hanna Wedad. Testing for HER2 status. *Oncology*. 61:22-30,2001.
8. Mohar A., Frías-Mendivil M., Súchel L. Epidemiología del cáncer Cervicouterino en México. *Annals of Oncology*,7: s222-s227,1998.
9. Lizano M., García-Carrancá A. Aspectos moleculares de los virus del papiloma humano y su participación en el desarrollo del cáncer Cervicouterino. *Annals of Oncology*.7:s233-s244,1998.
10. Meneses-García A., Chanona-Vilchis J., Sotelo-Regil R. Neoplasias malignas del cérvix uterino. *Annals of Oncology*.7:s245-s256,1998.
11. Fernández J.A., Hamilton P., Klas D. Essential viral and cellular zinc and iron containing metalloproteins as target for novel antiviral and anticancer agents: implications for prevention and therapy of viral diseases and cancer. *Anticancer Res*. 21:931-958,2001.
12. Bar J.K., Harlazinka A., Sedlaczek P., Kasiak J. Relations between the expression of p53, c-erb-2, Ki-67 and HPV infection in cervical carcinomas and cervical displasias. *Anticancer Res*.21:1001-1006,2001.
13. Saranath D., Khan Z., Tandle A.T. HPV16/18 prevalence in cervical lesions/cancers and p53 genotypes in cervical cancer patients from India. *Gynecologic Oncology*. 86:157-162,2002.
14. Manavi M., Baghestanian M, Kucera E. Papilloma virus and c-erb B-2 expression in diseases of the mammary nipple. *Anticancer Res*.21:797-803,2001.
15. Moaser M., Basso A., Averbuch S. The tyrosine kinase inhibitor ZD1839("Iressa") inhibits HER2-driven signaling and suppreses the growth of HER2-overexpressing tumor cells. *Cancer Res*.61:7184-7188,2001.
16. Ben-Bassat H., Rosenbaum-Mitrani Z. Tyrphostins that suppress the growth of human papilloma virus 16-immortalized human keratinocytes. *The Journal of Pharm. And Exp. Therap*. 290:1442-1457,1999.
17. Reese D., Slamon D. HER2/neu signal transduction in human breast and ovarian cancer. *15:1-8,2001.*

18. Baselga J., Albanell J. Mechanism of action of anti-HER2 monoclonal antibodies. *Annals of Oncology*.12:s35-s41,2001.
19. Rubin I., Yarden Y. The basic biology of HER2. *Annals of Oncology*.12:s3-s8,2001.
20. Brignola P., Lackey K., Kadwell S. Comparison of the biochemical and kinetic properties of the type 1 receptor tyrosine kinase intracellular domains. *The J of Biol Chem*.277:1576-1585,2002.
21. Cuzick J. Time to consider HPV testing in cervical screening. *Annals of Oncology*.12:1511-1514,2001.
22. Ménard S., Tagliabue E., Campiglio M. Role of HER2 gene overexpression in breast carcinoma. *Journal of Cellular Physiology*.182:150-162,2000.
23. Tzahar E., Pinkas-Kramarski R. Bivalence of EGF-like ligands drives the ErbB signaling network. *The EMBO Journal*.16:4938-4950,1997.
24. Valagussa P. HER2 status: a statistician view. *Annals of Oncology*.12:s29-s34,2001.
25. Thor A. HER2 a discusión of testing approaches in the USA. *Annals of Oncology*.12:s101-s107,2001.
26. Hoff E., Tubbs P., Myles J. HER2/neu amplification in breast cancer. *Anatomic Pathology*.117:916-921,2002.
27. Arteaga C. Epidermal growth factor receptor dependence in human tumors: more than just expression?. *The Oncologist*.7:31-39,2002.
28. Ménard S., Casalini P., Campiglio M. HER2 overexpression in various tumor types, focusing on its relationship to the development of invasive breast cancer. *Annals of Oncology*.12:s15-s19,2001.
29. Scoll S., Beuzeboc P., Povillart P. Targeting HER2 in other tumor types. *Annals of Oncology*.-12:s81-s87,2001.
30. Balsega J., Albanell J. Mechanism of action of anti-HER2 monoclonal antibodies. *Annals of Oncology*.12:s101-s107,2001.
31. Neve R.M., Lane H.A., Hynes N.E. The role of overexpressed HER2 in transformation. *Annals of Oncology*.12:s9-s13,2001.
32. Worthyake R., Opreska L., Wiley S. ErbB-2 amplification inhibits down-regulation and induces constitutive activation of both ErbB-2 and Epidermal Growth Factor Receptors. *The Journal of Biol. Chem*. 274:8865-8874,1999.
33. Yang H.Y., Zhoo B.P., Hung M.C. Oncogenic signals of HER2/neu in regulating the stability of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *The Journal of Biol. Chem*.275:24735-24739,2000.
34. Gille H., Downward J. Multiple Ras effector pathways contribute to G1 cell cycle progression. *The Journal of Biol. Chem*.274:22033-22040,1999.
35. Piccart M.J. Proposed treatment guidelines for HER2 positive metastatic breast cancer in Europe. *Annals of Oncology*.12:s89-s94,2001.
36. Gazit A. Tyrphostin Inhibitor set. *J. med. Chem*. 32:2344,1989.
37. Gazit A. Tyrphostin inhibitor set. *J. Med. Chem*.34:503,1991.
38. Lyall R. M. Tyrphostin inhibitor set. *J. Med Chem*. 264:503,1989
39. Rangel R., Rocha L. Establecimiento y caracterización de la línea celular CALO y el clon Kalo obtenidas a partir de un carcinoma de cervix y el efecto de IL-2, IL-3, GM-CSF, M-CSF, TNF- E IFN sobre su proliferación. *Oncología*. 39:3,1993.

40. Soto Cruz I., Santiago Perez A., Moreno Morales. Implication of tyrosine kinase receptor c-Kit and HER2 in cell growth of cervical carcinoma. *Res. Adv. In Cancer.* 3:6-11,2003.
41. Takuwa N., Takuwa Y. Regulation of cell cycle molecules by the Ras effector system. *Molec and Cell Endocrinology.* 177:25-33,2001.
42. Geddert H., Zeriuoc M., Wolter M. Gene amplification and protein overexpression of c-erb-b2 in breast carcinoma and its precursor lesions. *Anatomic Pathology.* 118:60-66,2002.
43. Ben-Bassat H., Rosenbaum-Mitrani S., Hartzstark Z. Inhibitors of epidermal growth factor receptor kinase and of cyclin-dependent kinase 2 activation induce growth arrest, differentiation, and apoptosis of human papilloma virus 16-immortalized human keratinocytes. *Cancer Res.* 57:3741-3750,1997.
44. Rein D., Kurbacher C. The role of chemotherapy in invasive cancer of the cervix uteri: current standars and future prospects. *Anti-Cancer Drugs.* 12:787-795,2001.
45. Wang L., Kirken R., Erwin R. Jak3, STAT and MAPK signaling pathways as novel molecular targets for the tyrphostin AG-490 regulations of IL-2 mediated T cell response. *Journal of Immunology.* 15:3897-3904,1999.
46. Tapia C., Sandoval R.J. Cancer Cervicouterino: factores de riesgo y alteraciones asociadas en mujeres del estado de Guerrero. *Cancerología.* 44:19-27,1998.
47. Korkolis D., Ardavanis A., Yatis J. HER-2/neu overexpression in breast cancer: an immunohistochemical study including correlations with clinicopathologic parameters, p53 oncoprotein and cathepsin-D. *Anticancer Res.* 21:2207-2212,2001.
48. Tzahar E., Pinkas-Kramarrski R., Mayer J. Bivalence of EGF-like ligands drives the ErbB signaling network. *The EMBO Journal.* 16:4938-4950,1998.
49. Brabender J., Danenberg KI. Epidermal growth factor receptor and HER2-neu mRNA expression in non-small cell lung cancer is correlated with survival. *Clin. Can. Res.* 7:1850-1855,2001.
50. Schaller G., Eversk K. Current use of HER2 tests. *Annals of Oncology.* 12:s97-s100,2001.
51. Thor A. HER2-a discussion of testing approaches in the USA. *Annals of Oncology.* 12:s101-s107,2001.
52. Ménard S., Fortis S., Castiglioni F. HER2 as a prognostic factor in breast cancer. *Oncology.* 61:67-72,2001.
53. Mendrola J., Berger M., King M. The single transmembrane domains of ErbB receptors self-associate in cell membranes. *The J of Biol. Chem.* 277:4704-4712,2002
54. Sharpe S., Barber K., Grant C. Evidence of a tendency to self-association of the transmembrane domain of ErbBB-2 in fluid phospholipid bilayers. *Biochemistry.* 41:2341-2352,2002.
55. Sharpe S., Barber K., Grant C. Interactions between ErbB-1 and ErbB-2 transmembrane domains in bilayer membranes. *FEBS letters.* 519:103-107,2002.
56. Komatsu M., Jepson S., Arango M. Muc 4 sialomucin complex, an intramembrane modulator of ErbB2/HER2/neu, potentiates primary tumor growth and suppresses apoptosis in a xenotransplanted tumor. *Oncogene.* 20:461-470,2001.

57. Moulder S., Yakes M., Muthuswamy S. Epidermal growth factor receptor (HER1) tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa) inhibits HER2/neu (erbB2)-overexpressing breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res.* 61:8887-8895,2001.
58. Krüger S., Weitsch G., Büttner H. HER2 overexpression in muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: Prognostic implications. *Int. J. of Cancer.*102:514-518,2002.
59. Arrazi E., Clark G., Mertz J. Estrogen-related receptor α and estrogen-related receptor γ associate with unfavorable and favorable biomarkers, respectively, in human breast cancer. *Cancer Research.*62:6510-6518,2002.
60. Mc Cormic S., Lillemoe T., Beneke J. HER2 assesment by immunohistochemical analisis and fluorecence *in situ* hybridization. *Anatomic Pathology.*117:935-943,2002.
61. Piccart M. Lohrisch C., Di Leo A. The predictive value of HER2 in breast cancer. *Oncology.*61:73-82,2001.
62. Grushko T., Blackwood A., Schumm P. Molecular-cytogenetic analysis of HER-2/neu gene in BRCA 1-associated breast cancers. *Cancer Res.* 63:1481-1488,2002.
63. Raudin Peter. The use of HER2 testing in the management of breast cancer. *Seminars in Oncology.*27:33-42,2000.
64. Lane H.A., Motoyama A.B. Modulation of p27/Cdk2 complex formation through 4D5-mediated inhibition of HER2 receptor signaling. *Annals of Oncology.*12:s21-s22,2001.
65. Cooke T., Reeves J. HER2 as a prognostic and predictive marker for breast cancer. *Annals of Oncology.*12:s23-s28,2001.
66. Mrcic M., Grgic M. Trastuzumab in the treatment of advanced breast cancer: single-center experience. *Annals of Oncology.*12:s95-s96,2001.
67. Fiorini M., Ballaro C., Sala G. Expresión of RALT a feedback inhibitor of Erb B receptor is subjected to an integrated transcriptional and post-transcriptional control. *Oncogene.*21:6530-6539,2002.
68. Lenferink A., Busse D., Flanagan M. ErbB2/neu kinase modulates cellular p27 and cyclin D1 through multiple signaling pathways. *Cancer Res.*61:6583-6591,2001.
69. Smith V., Hobbs S., Cobit W. ErbB2 overexpression in an ovarian cancer cell line confers sensitivity to the HSP90 inhibitor geldamycin. *Anticancer Res.*22:1993-2000,2002.
70. Kleinberger-Doron N., Shelah N. Inhibition of Cdk2 activation by selected tyrophostins causes cell cycle arrest at late G1 and S phase. *Exp. Can. Res.* 241:340-351,1998.
71. Bishop P., Myers T., Robert R. Differential sensitivity of cancer cell to inhibitors of the epidermal growth factor receptor family. *Oncogene.*21:119-127,2002.
72. Olson M., Paterson H. Signal from Ras and Rho GTPases interact to regulate expresión of p21. *Nature.*394:295-297,1998.
73. Bundred N.J., Chan K., Anderson N.G. Studies of epidermal growth factor receptor inhibition in breast cancer. *Endocrine Related Cancer.*8:183-189,2001.

74. Timms J., White S., O'Hare M. Effects of ErbB-2 overexpression on mitogenic signaling and cell cycle progression in human breast luminal epithelial cells. *Oncogene*.21:6573-6586,2002.
75. Murray J., Przepiorka D. Clinical trials of Her-2/neu specific vaccines. *Seminars in Oncology*.27:71-75,2000.
76. Roh H., Pippin J., Drebin J. Down-regulation of HER2/neu expression induces apoptosis in human cancer cells that overexpress HER2/neu. *Cancer Res*.60:560-565,2000.
77. Cheung T.H., Chung T.K., Lo K.W. Apoptosis-related protein in cervical intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma of the cervix. *Gynecologic Oncology*.86:14-18,2002.
78. Matsuda K., Yoshida K., Taya Y. P53A1P1 regulates the mitochondrial apoptotic pathway. *Can Res*.62:2883-2889,2002.
79. Ahmady O., Salahy E., Mahmoud M. Multivariate analysis of bcl-2 apoptosis, p53 and HER-2/neu in breast cancer: a short-term follow up. *Anticancer Res*.22:2493-2500,2002.
80. Stern David. Tyrosine kinase signaling in breast cancer ErbB family receptor tyrosine kinases. *Breast Cancer Res*. 2:176-183,2000.
81. Ellis P.E., Wong L.F., Rolfe K.J. The role of p53 and Ki67 in Paget's disease of the vulva and the breast. *Gynecologic Oncology*.86:150-156,2002.
82. Lenferink A., Busse D., Flanagan M. ErbB2/neu kinase modulates cellular p27^{Kip1} and cyclin D1 through multiple signaling pathways. *Can. Res*. 61:6583-6591,2001.
83. Zhao J., Pestell R., Guan J. Transcriptional activation of cyclin D1 promoter by FAK contributes to the cell cycle progression. *Molec. Biol. of the Cell*. 12:4066-4077,2001.
84. Fletcher L., Cheng Y., Muschel R. Abolishment of the Tyr-15 inhibitory phosphorylation site on cdc2 reduces the radiation-induced G₂ delay revealing a potential checkpoint early mitosis. *Cancer Res*. 62:241-250,2002.
85. Busse D., Dougty R., Arteaga C. HER-2/neu (erbB-2) and the cell cycle. *Seminars in Oncology*. 27:3-8,2000.
86. El-Hizawi S., Logowski J., Kulesz-Martin M. Induction of gene amplification as a gain-of-function phenotype of mutant p53 proteins. *Cancer Res*. 62:3264-3270,2002.
87. Wakui S., Muti T., Yakoo K. Prognostic status of p53 gene mutation in canine mammary carcinoma. *Anticancer Res*. 21:611-616,2001.