



Martínez Castro José Tezcatlipoca / Velázquez Torres Marcela.

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza



DETECCIÓN DE POSIBLES MUTACIONES EN EL RECEPTOR EGFR, EXONES 19 Y 21, EN LINEAS CELULARES DE CARCINOMA DE CÉRVIX CALO E INBL

Área: Diferenciación celular y cáncer

Tesis para obtener el título de Biólogo

Presentan:
José Tezcatlipoca Martínez Castro
Marcela Velázquez Torres

Director de tesis: Dr. Arturo Valle Mendiola

Adscripción: Posgrado e Investigación

Asesor interno: José Misael Vicente Hernández Vázquez

MÉXICO, 06 DE DICIEMBRE DEL 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



Martínez Castro José Tezcatlipoca / Velázquez Torres Marcela.



ÍNDICE

RESUMEN.....	8
MARCO TEORICO.....	9
CÁNCER CÉRVICO UTERINO.....	10
FACTORES PROMOTORES DEL CÁNCER CÉRVICO UTERINO.....	11
CICLO DE PROPAGACIÓN DEL VPH.....	12
ETIOLOGÍA DEL CÁNCER CÉRVICO UTERINO POR VPH.....	14
PARTICIPACIÓN DEL VPH EN LA CARCINOGENESIS DEL CACU.....	15
EL RECEPTOR PARA EL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO (EGFR).16	
EL EGFR ES PARTE DE UNA FAMILIA FORMADA POR CUATRO RECEPTORES.....	17
DOMINIO TIROSINA CINASA.....	22
TIPOS DE MUTACIONES DEL GEN EGFR.....	25
MUTACIONES DEL DOMINIO EXTRACELULAR PRESENTES EN TUMORES...27	
IMPORTANCIA DEL EGFR EN EL CÁNCER.....	28
SECUENCIACIÓN.....	34
AUTOMATIZACIÓN DEL MÉTODO DE SANGER.....	34
SECUENCIACIÓN AUTOMATIZADA.....	35
AUTOMATIZACIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	36
BASIC LOCAL ALIGNMENT SEARCH TOOL (BLAST).....	37
JUSTIFICACIÓN.....	40
HIPÓTESIS.....	42
OBJETIVO GENERAL.....	43
OBJETIVOS PARTICULARES.....	43
PROCEDIMIENTO.....	44
Cultivo celular.....	44
Resiembra.....	44
Conteo celular.....	44
Extracción de ADN.....	45
Reacción de polimerasa en cadena (PCR).....	45



Electroforesis en gel de agarosa.....	46
Obtención de las muestras para la secuenciación.....	47
Secuenciación.....	48
Detección de mutaciones.....	48
RESULTADOS.....	49
Establecimiento de las condiciones óptimas para la extracción de ADN por medio de la técnica FTA.....	49
Establecimiento de las condiciones óptimas para la obtención de los productos de PCR.....	51
Optimización de la técnica con las líneas celulares CALO e INBL.....	51
Secuenciación.....	54
Blast y detección de mutaciones.....	55
ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	65
CONCLUSIONES.....	68
PERSPECTIVAS.....	69
BIBLIOGRAFÍA.....	70



Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Oncología Molecular (L9PB) de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer, FES Zaragoza, UNAM.

Este trabajo contó con el apoyo financiero de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) al proyecto PAPIIT-IN221512.



AGRADECIMIENTOS

A Dios, por ver siempre bendiciones en mi vida.

A mi papá Francisco por ser la persona a quien más admiro y porque con su ejemplo me ha enseñado el valor de la vida y de mi persona.

A Mari, mi mamá, por siempre apoyarme en todo y darme consuelo en los momentos difíciles.

A mi hermana Laura, por ser mi mejor amiga y compañera que me hace saber en todo momento lo que puedo lograr.

A mis hijos Francisco y Héctor por ser mi razón primordial para ser un mejor ser humano.

A mi esposo José por ser mi colega, amigo y compañero de vida, porque el lugar seguro a donde siempre puedo llegar es su compañía.

A mis cuñados Héctor, Rodrigo y Brenda y a mis suegros, Leticia y Héctor por apoyar a mi familia siempre y hacer por nosotros más de lo que pudiera pagar.

A mi tía Lety porque siempre ha creído en mi y se alegra por mis triunfos.

Al laboratorio 9 en especial a la Dra. Isabel Soto Cruz por la oportunidad de aprendizaje y al Dr. Arturo Valle Mendiola por ser mi maestro en todo lo que he aprendido dentro del laboratorio 9.

“La derrota tiene algo positivo, nunca es definitiva. En cambio la victoria tiene algo negativo, jamás es definitiva.” José Saramago.

A Dios por encaminar y colocar en mi vida a cada una de las personas que he conocido.

A mis padres Héctor y Leticia por ser las personas que me inculcaron valores, me proporcionaron la oportunidad de tener estudios, por brindarme lo mejor que ellos tenían y por qué siempre me han apoyado. Gracias por todo, muchas gracias.

A mi esposa Marcela por ser mi maestra y guía, por enseñarme el valor de la vida.

A mis hijos Héctor y Francisco por ser el origen de energía y amor.

A mis hermanos Héctor, Rodrigo y Brenda. Gracias por todo hermanos.

A mis suegros, Francisco y Mari, por su apoyo brindado, por su cariño, confianza y amor.

A todos mis familiares, de manera especial a mi Tía Lupe.

A mi amigo el Dr. José Luis Velasco Bolom, por darme la oportunidad de ser su amigo en la Universidad. Gracias de corazón por todo maestro, colega, amigo y hermano.

A mis amigos: Rodrigo, Leonardo y Othoniel.

Agradezco a la Dra. Isabel Soto Cruz por todo su apoyo y confianza brindada. A mi Director el Dr. Arturo Valle Mendiola por su paciencia y apoyo en este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio: Pilar, Octavio, Evelyn y Mary. Gracias por haberme dejado un buen recuerdo del laboratorio 9.

Agradezco a los sinodales del Examen Profesional: M. en C. María del Carmen Lagunas Cruz, Dr. Luis Sánchez, Dr. Hugo López Muñoz y M. en C. José Misael Vicente Hernández Vázquez por sus observaciones que ayudaron a enriquecer este trabajo.

Gracias a la vida, gracias a todos.

RESUMEN

El gen EGFR codifica para una proteína, con 1186 aminoácidos. Las anomalías en las funciones de EGFR están asociadas con todas las características claves del desarrollo y crecimiento del cáncer incluyendo la proliferación celular autónoma, la invasión, la angiogénesis y el potencial metastásico.

La expresión de EGFR puede dar como resultado el incremento de algunos mecanismos como: la producción de los ligandos de EGFR, el incremento en la transcripción del gen EGFR, la amplificación del gen EGFR y mutaciones que resultan en la activación constitutiva de actividad de tirosina cinasa. El EGFR está frecuentemente expresado en tumores escamosos de cabeza y cuello, cáncer colorrectal, mama, próstata, vejiga y ovario.

Se ha demostrado la presencia del receptor EGFR, aparentemente inactivo en las líneas celulares de cáncer de cérvix CALO e INBL. Por lo tanto, es importante analizar la presencia de mutaciones en el gen EGFR que pudieran generar una inactivación, específicamente en los exones 19 y 21 que se incluyen dentro del dominio tirosina cinasa, en los cuales se ha reportado la mayor cantidad de mutaciones en diversos tipos de cáncer.

La técnica FTA (Flinders Technology Associates) facilita la extracción y purificación del ADN, junto con la técnica de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) y la secuenciación de los productos y su comparación con la base de datos existente en el NCBI, fue posible encontrar mutaciones en las cuatro muestras analizadas. Las mutaciones corresponden a cambios de pares de bases, deleciones e inserciones en el ADN. Lo anterior podría interpretarse como eventos favorables para la inactivación del EGFR en estas líneas modificación de la estructura, conformación y actividad del EGFR.

MARCO TEÓRICO

Generalidades del cáncer

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define al cáncer como un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo; también se habla de «tumores malignos» o «neoplasias malignas». Una característica del cáncer es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, proceso conocido como metástasis. Las metástasis son la principal causa de muerte por cáncer ⁽¹⁾.

El cáncer causa alrededor de 100 a 350 muertes de cada 100,000 habitantes en el mundo. El cáncer se genera por fallas en los mecanismos que por lo general controlan el crecimiento y la proliferación de las células. A diferencia del crecimiento de las células cancerígenas, durante el desarrollo normal y a lo largo de la vida adulta, intrincados sistemas de control genético regulan el equilibrio entre el nacimiento y la muerte celular en respuesta a señales de crecimiento, de inhibición del crecimiento y de muerte. La tasa de división y muerte celular determinan el tamaño del cuerpo adulto y la tasa de crecimiento para alcanzar este tamaño. En algunos tejidos adultos la proliferación celular ocurre continuamente como una estrategia constante de renovación del tejido. Por ejemplo, las células epiteliales intestinales viven por unos pocos días antes de morir y ser reemplazadas, por lo general las células de la piel sobreviven solo por dos o cuatro semanas antes de ser descamadas. Sin embargo, las células en muchos tejidos adultos no proliferan, excepto durante procesos de curación. Tales células estables (hepatocitos, células del músculo cardíaco, neuronas) pueden permanecer funcionales por largo períodos o incluso durante la vida entera de un organismo, por lo anterior mencionado, el cáncer ocurre cuando los mecanismos que mantienen estas tasas de crecimiento normal funcionan mal y causan división celular en exceso ⁽²⁾.

La pérdida en la regulación celular que origina la mayoría de los casos de cáncer se debe a daño genético, a menudo acompañado por influencias de químicos que promueven tumores, hormonas y algunas veces virus. Las mutaciones en dos amplias clases de genes han sido implicadas en la aparición del cáncer: protooncogenes y genes supresores de tumores. En general, los protooncogenes promueven el crecimiento celular; las mutaciones los convierten en oncogenes cuyos productos son excesivamente activos en la promoción del crecimiento. Usualmente, las mutaciones oncogénicas resultan en una expresión genética aumentada o bien en un producto hiperactivo. Por lo general, los genes supresores de tumores limitan el crecimiento, de manera que las mutaciones que los inactivan permiten una división celular inapropiada. Una tercera y más especializada clase de genes, llamados genes de mantenimiento, también está vinculada al cáncer. Estos genes normalmente protegen la integridad del genoma; cuando están inactivados, las células adquieren mutaciones adicionales a una velocidad mayor. Muchos de los genes en estas tres clases codifican proteínas que ayudan a regular la proliferación celular o la muerte celular por apoptosis; otros codifican proteínas que participan en la reparación del ADN dañado ⁽²⁾.

Los principales factores de riesgo que dan lugar a la formación de distintos tipos de cáncer en los países de ingresos bajos y medianos son: el tabaquismo, el alcoholismo, el consumo insuficiente de frutas y hortalizas, las infecciones por virus de hepatitis B, de hepatitis C y por virus del papiloma humano (VPH). El cáncer cérvico uterino, causado por el VPH, es una de las principales causas de defunción por cáncer de las mujeres en países de bajos ingresos ⁽²⁾.

Cáncer cérvico-uterino (CaCu)

El cáncer cérvico uterino actualmente constituye una de las dos primeras causas de muerte por neoplasias malignas en mujeres mayores de 25 años. La incidencia y mortalidad por estas neoplasias se asocian de manera importante a la transición demográfica, ya que existe una relación directa entre el envejecimiento poblacional y la incidencia de neoplasias malignas. Sin embargo, los estilos de vida y capacidad

de respuesta de los sistemas de salud marcan los distintos panoramas regionales (3).

El CaCu es una de las neoplasias malignas que afecta el tracto genital femenino más comúnmente. Se estima que, a nivel mundial, su incidencia es de 527,624 casos por año, con una mortalidad de 265,653 de casos al año, con una prevalencia a 5 años de 1,154,161 casos (4). Ocupa el cuarto lugar después del cáncer de mama, el cáncer colorrectal y el cáncer de pulmón. Este cáncer ocupa el 12% en incidencia entre todas las neoplasias malignas, y el 7.5% de mortalidad por cáncer específica. Asimismo, el 87% de los casos ocurren en países en vías de desarrollo (5). En México, tiene una incidencia de 13,960 casos por año, ocupando el 23.3% entre todas las neoplasias malignas, y una mortalidad de 4,769 casos por año, siendo el 11.9%; ocupando el segundo en incidencia y mortalidad después del cáncer de mama (4,5).

Factores promotores del Cáncer cérvico uterino CaCu

El mayor agente etiológico conocido para el desarrollo del CaCu es la infección y persistencia del VPH (6). Sin embargo, se han identificado otros cofactores que incrementan el riesgo para adquirir la infección o potencializan la progresión a la transformación de malignidad. Los cofactores etiológicos involucrados en la adquisición del VPH y la malignización son el inicio temprano de la vida sexual, el tener compañeros sexuales de riesgo, múltiples parejas sexuales, la multiparidad, el tabaquismo, el uso de anticonceptivos orales y la infección por el virus de inmunodeficiencia humana. Estos factores incrementan el riesgo de progresión a una lesión intraepitelial de alto grado (7). Asimismo, se ha visto que el fumar y el uso de anticonceptivos orales de forma prolongada promueve el desarrollo de metaplasia escamosa, promoviendo la persistencia de la infección viral, siendo este el factor de riesgo más importante para la progresión de las lesiones intraepiteliales (8).

Este virus presenta diferentes variantes, las cuales se dividen en un grupo de alto riesgo y uno de bajo riesgo. Se conocen más de 150 tipos de VPH que infectan al

ser humano, alrededor de 40 infectan los genitales y 14 de ellos son considerados de alto riesgo para el desarrollo de cáncer cérvico uterino. Existen también algunos tipos de VPH de bajo riesgo que solo causan verrugas genitales ⁽⁹⁾.

Se ha demostrado que alrededor de 99.7% de los cánceres cérvico uterinos pueden atribuirse a ciertos tipos de VPH. Así, el VPH 16 presenta la mayor porción (50%), seguido por el VPH 18 (12%), el VPH 45 (8%) y el VPH 31 (5%). No obstante, el VPH no constituye una causa suficiente para el desarrollo de esta enfermedad; son necesarios ciertos cofactores para que un porcentaje de infecciones persistentes por VPH logre, en algún momento, progresar y dar lugar al cáncer. Entre ellos destacan factores, como los tipos de antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad y la respuesta inmunológica, las influencias que ejercen las hormonas y otros agentes de transmisión sexual, por ejemplo, *Chlamydia trachomatis* ⁽⁹⁾.

Ciclo de propagación del VPH

Este virus se divide morfológicamente en tres regiones: la región larga de control (LCR por sus siglas en inglés) que no contiene marco de lectura; la región correspondiente a las proteínas tempranas E1 a E8 y la región que corresponde a las proteínas tardías L1 Y L2. Estas regiones codifican para distintas proteínas para el anclaje y supervivencia del virus. En la figura 1 se observa el acomodo de la proteína L1 que compone los pentámeros de la cápside del virus y el acomodo de su genoma al interior.

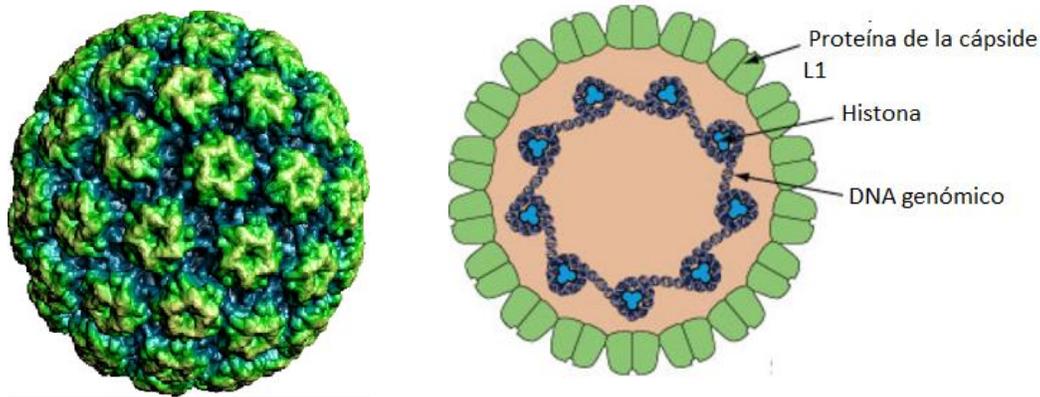


Figura 1. Imagen en rayos X de VPH 16 y representación del acomodo de su genoma y proteína L1. Modificado de: <http://viralzone.expasy.org/187> y http://viperdb.scripps.edu/info_page.php?VDB=5kep

El ciclo de propagación del VPH está unido al programa de diferenciación de la célula huésped infectada, el queratinocito, pero la expresión de altos niveles de proteínas virales y el ensamblaje viral ocurren exclusivamente en las capas superiores, es decir, en el estrato espinoso y en el epitelio granuloso del epitelio escamoso. Las células en la capa basal consisten en células troncales y células en tránsito que se están dividiendo continuamente y proveen un reservorio de células para las regiones suprabasales. La infección de estas células por el VPH conduce a la activación de la expresión en cascada de los genes virales que provoca la producción de aproximadamente 20 a 100 copias extracromosómicas del ADN viral por célula. Cuando el queratinocito infectado entra al compartimento de diferenciación, debería salir del ciclo celular, sin embargo, se presenta una regulación positiva de la expresión de los genes virales, ocurre la replicación del ADN viral y entonces el número de copias virales aumenta al menos a 1000 copias/célula, y se observa abundante expresión de los genes tempranos E6 y E7 y de los genes tardíos ⁽¹⁰⁾.

Etiología del cáncer cérvico uterino por VPH

La infección por VPH esencialmente es una enfermedad de transmisión sexual. De esta manera, tanto hombres como mujeres están involucrados en la cadena epidemiológica de la infección, participando como acarreadores asintomáticos, transmisores y también víctimas de la infección por VPH ⁽¹⁰⁾.

Muchos tipos de VPH producen solamente lesiones leves y no se asocian a cáncer humano. En dichas lesiones, la expresión de los productos virales se encuentran cuidadosamente reguladas, de modo que las proteínas virales se expresan en momentos definidos y en cantidades controladas, a medida que la célula infectada migra hacia la superficie epitelial ⁽¹⁰⁾.

Los virus del papiloma humano también pueden alojarse de forma latente en células epiteliales evadiendo la detección por el sistema inmune y permitiendo una reactivación futura. La reactivación de infecciones latentes de VPH se ha reportado en pacientes inmunocomprometidos ⁽¹⁰⁾.

La infección por VPH se puede clasificar en: primero una infección latente, que se caracteriza por la presencia de VPH en las células o tejidos que son aparentemente normales y sin ninguna manifestación de enfermedad. Sin embargo, el virus está presente y en ocasiones puede ser detectado por técnicas específicas como hibridación *in situ* o reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Posteriormente la infección subclínica se manifiesta por cambios microscópicos en el epitelio cervical (coilocitos, displasias) detectados en las citologías o cortes histológicos. Finalmente la infección clínica se manifiesta por la aparición de tumores visibles y en esta etapa podemos encontrar gran cantidad de tejido positivo para VPH. ⁽¹¹⁾

Estos virus se encuentran viables y con capacidad de infectar otros tejidos. Sin embargo, no siempre la enfermedad se manifiesta durante esta última etapa, ya que varios casos llegan a permanecer en período de latencia subclínico, tiempo durante

el cual se puede adquirir un estado de resistencia o regresión de las lesiones, o bien de progresión hacia un cáncer invasor. ⁽¹²⁾

Algunos datos sugieren que el VPH16 persiste en promedio mucho más tiempo infectando el epitelio, en comparación con otros tipos de VPde tal manera que aquellas lesiones que presentan VPH 16 podrían progresar más rápidamente con lo que se teoriza que las infecciones con papilomavirus oncogénicos persisten por más tiempo que los no oncogénicos ^(11,12).

Participación del VPH en la carcinogénesis del cáncer cérvico uterino.

Casi todos los casos de cáncer cérvico uterino (99.8%) se deben a tipos específicos del virus del papiloma humano (VPH). El enlace entre el cáncer cérvico uterino y el VPH fue demostrado a principios de los años 80 por el doctor Harald zur Hausen y la infección es un requisito necesario para el desarrollo de esta enfermedad. La infección por VPH puede ser causa de otros carcinomas ano genitales incluyendo de pene, vagina, vulva y ano ⁽⁹⁾.

Los virus del papiloma son pequeños virus de ADN de doble cadena, cuyo genoma está constituido por aproximadamente 7200-8000 pb, el cual se divide en tres regiones: una región de expresión temprana E (Early), la cual codifica para las proteínas virales (E1, E2, E4, E5, E6 y E7), necesarias para la replicación del ADN viral, la regulación de la transcripción y la transformación e inmortalización celular, además de una región de expresión tardía L (Late), que codifica para proteínas estructurales (L1 y L2) y una región reguladora conocida como región larga de control LCR (del inglés Long Control Region), que contiene la secuencia de ADN que permite el control de la replicación y de la expresión del genoma viral⁽¹³⁾.

El mecanismo de acción del VPH de alto riesgo en el desarrollo de la neoplasia cervical se explica principalmente por la acción de dos de sus oncoproteínas virales E6 y E7. Estas proteínas tienen la capacidad de inmortalizar y transformar

queratinocitos, confiriéndoles un alto grado de inestabilidad cromosómica. La expresión duradera de estos genes es requisito indispensable para mantener el crecimiento neoplásico ⁽¹⁴⁾. Estudios han demostrado que estas proteínas virales interactúan de forma compleja en procesos biológicos como la apoptosis, la proliferación y la diferenciación celular. Se considera que el proceso de interacción del genoma del VPH con el genoma de la célula huésped es el evento fundamental en la progresión a cáncer, debido a la sobreexpresión de las oncoproteínas E6 y E7 por la pérdida de E2, proteína implicada en su regulación. ^(14, 15)

La proteína E5 del VPH 16 incrementa la activación del EGFR formando un complejo uniéndose a la subunidad C de la V-H⁺-ATPasa inhibiendo la acidificación del endosoma tardío, el cual a su vez, inhibe la degradación del EGFR por ubiquitinación. E5 inhibe el tráfico de endosomas tempranos a tardíos y retrasa la degradación del EGFR activado. ⁽¹⁶⁾

El Receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR)

El factor de crecimiento epidérmico (EGF) fue aislado originalmente por Stanley Cohen en 1962 a partir de extractos de glándula submaxilar de ratón que aceleraba la erupción del incisivo y la apertura del parpado en el animal recién nacido. Por lo tanto, se denominó originalmente “factor diente-parpado”, posteriormente fue renombrado como EGF porque estimulaba la proliferación de células epiteliales ⁽¹⁷⁾. En 1972, se determinó la secuencia de aminoácidos del EGF, la presencia de una molécula que unía específicamente EGF, el receptor para EGF (EGFR) se confirmó en 1975 al demostrar que EGFR marcado con yodo 125 se unía de manera específica a la superficie de fibroblastos ⁽¹⁷⁾.

En 1978, el EGFR fue identificado como una proteína que mostraba fosforilación incrementada cuando se unía el EGF en la línea celular A431 de carcinoma escamoso que tenía amplificado el gen *EGFR*. El descubrimiento en 1980 donde la proteína transformante de sarcoma de Rous, v-src, se fosforilaba en tirosina, llevó al descubrimiento de que el EGFR tenía actividad de tirosina cinasa al unirse al

EGF. En 1984, el cADN del gen *EGFR* humano se aisló y caracterizó. El análisis posterior de la proteína demostró un alto grado de similitud entre la secuencia de aminoácidos del EGFR y la proteína v-erbB, un oncogen del virus de eritoblastosis aviar ⁽¹⁷⁾.

El análisis de genotecas de cADNs utilizando una sonda para EGFR llevó a la identificación de una familia de proteínas relacionadas cercanamente con el EGFR. Esta familia cuenta con cuatro proteínas: EGFR (también conocida como ErbB1/HER1), ErbB2/HER2/NEU, ErbB3/HER3 y ErbB4/HER4. Los receptores ErbB2, ErbB3 y ErbB4 muestran homología extracelular relacionada con el EGFR en 44, 36 y 48% respectivamente; mientras que la homología para el dominio tirosina cinasa es de 82, 59 y 79%. El grado de homología en el dominio C-terminal regulador es relativamente bajo, siendo de 33, 24 y 28% respectivamente ⁽¹⁷⁾.

El EGFR es parte de una familia formada por cuatro receptores

Los receptores de la familia ErbB/Her, pertenecen a la subclase I de la superfamilia de receptores tirosina cinasa (RTKs). La actividad de estos receptores se centra en la mediación y regulación de las señales del medio externo hacia el interior de las células, su relevancia es evidente ya que participa en procesos que van desde el desarrollo embrionario hasta el organismo adulto en función, o en procesos de proliferación celular, diferenciación, migración y reorganización estructural. La intrincada y compleja capacidad de interacción entre los miembros de la familia EGFR formando dímeros o heterodímeros, e interacción con sus ligandos, afecta el tipo de señalización y duración de la misma. Existen evidencias sólidas que demuestran que la formación de heterodímeros entre dos diferentes miembros de la familia incrementa la diversidad de reconocimiento de ligandos, que de manera individual no puede obtenerse ^(18, 19, 20).

La familia de receptores tirosina cinasa ErbB-Her (RTKs), comprende a cuatro miembros, ErbB1/Her1, ErbB2/Her2 (neu), ErbB3/Her3 y ErbB4/Her4. Todos los

miembros de la familia comparten un dominio extracelular de unión a ligando (ectodominio), un dominio hidrófobo transmembranal y un dominio citoplasmático, conteniendo un subdominio con actividad intrínseca de tirosina cinasa. Aun cuando los 4 miembros de la familia comparten en general la misma estructura, cada uno de ellos posee en su estructura algunas particularidades muy específicas que son de suma importancia en la complementariedad de los dímeros, así como la selectividad en la activación específica de las vías de señalización ^(22, 23, 24).

La formación de heterodímeros conlleva al incremento en la capacidad de reclutar dentro del dominio citoplasmático, diversas moléculas asociadas al reconocimiento de fosfotirosinas por medio de proteínas que presentan dominios SH2 o dominios PTB, incrementando con esto el repertorio de las vías de señalización que pueden ser activadas por un receptor determinado. Los miembros de la familia de receptores ErbB se expresan en diferentes tejidos, donde tiene un papel importante en la proliferación y diferenciación celular. Los receptores son activados al unirse a su ligando natural, lo que lleva a la heterodimerización u homodimerización seguida de reclutamiento de proteínas-sustrato específicas en su dominio citosólico ^(18, 21, 22).

Dentro de las variantes entre los miembros de la familia, EGFR/ErbB1 se compone de un dominio extracelular de unión a EGF, compuesto de 622 residuos, un segmento transmembranal de 23 residuos, un dominio intracelular de 522 residuos con actividad tirosina cinasa ^(21,24, 25).

En el caso de Her2/ErbB2 se desconoce hasta el momento su ligando, y preferiblemente forma heterodímeros en lugar de homodímeros; tales heterodímeros pueden unirse a factores de crecimiento cuya variedad propicia una amplia gama de tipos de cáncer como el cáncer de mama, cervix, colon, endometrio, esofágico de pulmón y de páncreas ^(21, 26, 27,28).

El tercer miembro de la familia ErbB3/Her3 a pesar de presentar una gran homología en el dominio tirosina cinasa con los otros miembros de la familia no posee actividad

de proteína cinasa, aun cuando si presenta unión a ligando (NRG 1); por lo tanto, requiere la formación de heterodímeros (ErbB2-ErbB3) de manera particular, y con los otros miembros de ErbB. ErbB3 se presenta en casos de cáncer de mama, colon, próstata y estómago (22, 29). Aunque HER3 carece de actividad cinasa puede tranfosforilarse a través de otros RTKs como HER2 y HER4; al interactuar con otros miembros de la familia se activan vías de supervivencia debido a algunos residuos citoplasmáticos que pueden ser fosforilados y convertirse en sitios catalíticos de alta afinidad con unión a la subunidad PI3K (30).

ErbB4, que es el último miembro de la familia, comparte prácticamente el 75% de los residuos que componen el dominio transmembranal con los otros miembros, un 70% en el dominio intracelular que son alrededor de 276 residuos y 20% en la región C-terminal dentro del dominio catalítico. El ligando NRG2, puede favorecer su heterodimerización con ErbB2, sin embargo, sus ligandos naturales son NRG3 y NRG4 (19, 24, 25, 29).

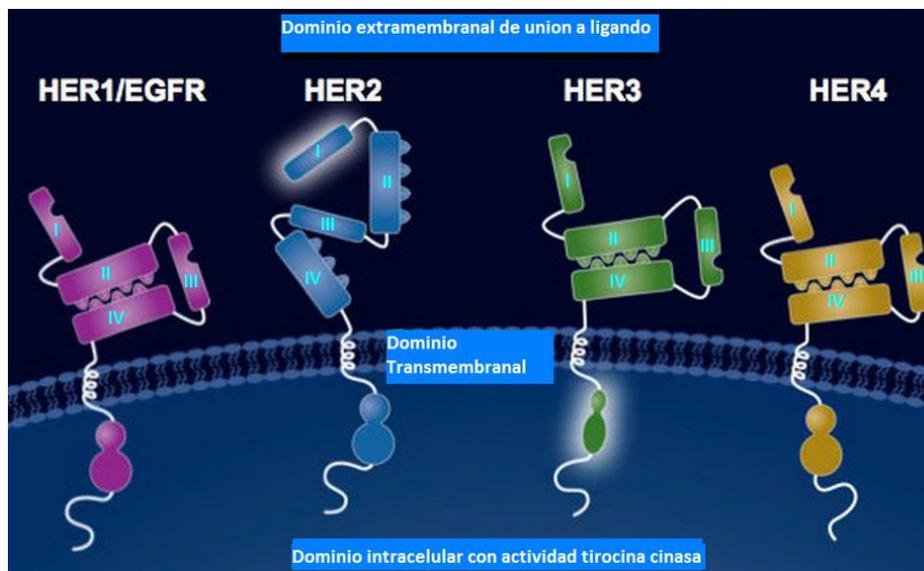


Figura 2: Los 4 miembros de la familia ErbB. Se muestra la disposición del dominio extramembranal, el dominio transmembranal y el dominio tirosina cinasa, los subdominios I, II, III y IV de las proteínas sin unión a ligando. Nótese que el receptor HER2 tiene una conformación cual si estuviera unido a ligando. (Modificado de

<http://www.biooncology.com/biological-pathways/her-signaling>)

El dominio extracelular de cada uno de los miembros de la familia consiste en 4 subdominios; donde los subdominios I y III se forman a través de una hélice β , de

suma importancia como punto de unión con el ligando, una conformación llamada asa de dimerización (β -hairpin) dentro del subdominio 2^(24, 32, 33).

Al efectuarse la interacción ligando receptor, el asa de dimerización protuye del receptor; media la interacción con otro receptor dando paso a la formación del dímero, formando una estructura conjunta con el ligando; esta es la forma activa. En contraste, la forma inactiva se caracteriza por interacciones moleculares entre los dominios II y IV. EGF y TGF α se unen en relación uno a uno con el receptor, el subdominio II es el principal componente en la unión de dos receptores, a manera de un brazo extendido compuesto por 242 y 259 residuos. EGF y TGF α interactúan con los residuos estructurales del dominio I y con los grupos R de los aminoácidos del subdominio III, los residuos de Arg 41 en EGF y Arg 42 en TGF α , altamente conservados, interactúan con Asp355 del receptor y Leu 47 en EGF y Leu 48 en TGF α se proyectan formando un sitio hidrofóbico en la superficie de la subregión III. (23, 26, 35)

La unión de los ligandos altera la disposición de los subdominios II y III pero no la orientación relativa de los subdominios I y II. En el receptor que no se encuentran activados los subdominios II y IV se encuentran unidos y el brazo de dimerización se encuentra plegado impidiendo la interacción con un receptor adyacente, inclusive, los subdominios de unión a ligando I y III se encuentran muy distantes para que un solo ligando pueda interactuar con ambas simultáneamente. Para que la activación pueda llevarse a cabo, es decir para que el ligando pueda unirse a su receptor es necesaria la rotación a 130° de los subdominios I y III de las posiciones de los subdominios I y II, este arreglo permite la conformación extendida, rompiendo las uniones intermoleculares de los subdominios II/IV facilitando la participación del brazo extendido en la formación de dímeros, a partir de interacciones intermoleculares en donde se estima que el 95% de los receptores, permanecen en su forma inactiva contra el 5% que presenta una forma activa, y esto se ve afectado por la presencia del ligando, dando como resultado una baja o una alta afinidad del receptor por su ligando.^(19,29,32)

Probablemente la forma o estado de baja afinidad se ve reflejada por el arreglo en que se encuentran los subdominios I y III. (19, 24, 32) El receptor ErbB2 o Her 2 difiere en su dominio extracelular de manera significativa, puesto que presenta una conformación cerrada como si estuviese unido el receptor a un ligando mostrando una asa de dimerización protuyendo del receptor; lo que podría explicar el desconocimiento de un ligando natural para ErbB2. Los subdominios extracelulares I y III se encuentran plegados, impidiendo cualquier interacción con un ligando. Probablemente esta condición favorezca preferentemente la formación de heterodímeros de ErbB2 con los otros miembros de la familia ErbB/HER, en lugar de formar homodímeros. (32, 34, 35, 36)

Her2 se encuentra constituido por tres dominios: el dominio extracelular dividido en subdominios que se encuentran constituidos por 632 aminoácidos, sin embargo, la conformación de estos dominios no es propicia para formar un sitio de unión al ligando. Esto se puede explicar a partir de las estructuras cristalinas obtenidas en diferentes medios en los cuales Her2 presenta una variación en el arreglo de los subdominios III y IV que muestran una relación de interdominio de tal forma, que asemeja un estado de activación similar al presentado por otros miembros cuando se unen a su ligando respectivo. Probablemente, se debe a que no están presentes dos regiones clave en el subdominio IV, en donde los residuos de contacto Gly 576, His 565 presentes en Her 3 son reemplazados por residuos de Pro y Phe respectivamente en Her 2, lo cual puede explicar la ausencia de región de contacto de las subregiones II y IV, siendo la interface I y III favorecida por la existencia de grupos de residuos hidrofóbicos rodeados por contactos hidrofílicos, haciendo esta conformación más estable. Todos estos cambios perfilan el funcionamiento de ErbB/Her2 como receptor cooperador con otros miembros de la familia de receptores, que si poseen ligandos propios por lo que hace a Her2/ErbB2 un receptor con actividad constitutiva por no requerir la unión directa a un ligando específico. Her2 tiene una región transmembranal compuesta por 22 aminoácidos, un dominio intracelular conformado por 580 aminoácidos con la estructura bilobulada con actividad tirosina cinasa y asas de activación. (26, 36, 37)

La desregulación de cualquier miembro de la familia ErbB se encuentra asociada a procesos transformantes que pueden llegar a promover el desarrollo de diversos tipos de cáncer. (32, 38, 39). Todos los miembros de la familia EGFR/ErbB tienen el potencial para estimular la cascada de señalización Raf-MEK-ERK. (25, 40)

Otras moléculas particulares como la fosfolipasa C que se unen a fosfotirosinas en ErbB1 mediando la formación de diacilglicerol e inositol 1, 4, 5-trifosfato, que son segundos mensajeros. La unión específica de la subunidad reguladora de la fosfatidinositol-3 cinasa (PI3K) a fosfotirosinas en los receptores ErbB3 y ErbB4 conlleva a la activación de la enzima; la activación de PI3K fosfato, activa a su vez a la proteína cinasa B o AKT (28, 31). La importancia de esta familia subyace en su capacidad de formación de dímeros capaces de activar de manera sustancial la vía de las MAPK (proteínas cinasas activadas por mitógeno, asociadas a proliferación y diferenciación celular) y la vía de sobrevivencia PI3K/AKT (PDK-1 fosfatidilinositol) (37, 40, 41).

Dominio tirosina cinasa

El dominio tirosina cinasa posee una estructura de característica bilobulada en toda la familia de receptores ErbB/EGFR, donde los residuos 685-769 comprenden el lóbulo aminoterminal de la cinasa y los residuos 773-953 componen el lóbulo carboxilo terminal. El lóbulo más pequeño tiene un arreglo de láminas β en antiparalelo, con regiones ricas en Glicina y el asa de unión a ATP comprendida entre los residuos 695-700 (29, 42).

La estructura del lóbulo mayor (Carboxilo terminal) es predominantemente en forma de β hélice, este lóbulo es el responsable de la unión del péptido o proteína sustrato. Al igual que en otras proteínas cinasas, el sitio catalítico se encuentra en la hendidura formada por los dos lóbulos; la secuencia por Leu-Val-Ile (955-957) del lóbulo carboxilo terminal juega un papel importante en la dimerización de receptor

independiente de unión a ligando, esta secuencia interactúa con el lóbulo mayor del dominio cinasa. (43, 44)

Se han detectado 12 subdominios con residuos de aminoácidos conservados que constituyen el “centro” o sitio catalítico de las proteínas cinasas, de ellos, el motivo compuesto por los aminoácidos K/D/D participa de manera importante en las propiedades catalíticas del receptor para EGF. (19, 41) La Lys-721 del receptor para EGF representa un residuo invariable en la familia de receptores ErbB/EGFR, que tiende a formar iones pares con los fosfatos β y γ del ATP, conjuntamente la Asp-813 es la base catalítica que orienta el grupo tirosil del sustrato proteína en un estado catalítico que posiblemente extraiga un protón de la tirosina facilitando así el ataque nucleofílico del fosforo- γ del complejo Mg-ATP. El residuo Asp-831 es el primer residuo del asa de activación correspondiendo al lóbulo grande, la Asp-831 se une al Mg^{2+} que coordina los grupos fosfatos β y γ del ATP. Para la familia de tirosinas cinasas ErbB el sitio de transferencia de grupos fosfato en el asa catalítica se compone de los residuos HRDLAARN para HER1 (His-811-ASN818), para HER2 (822-829) y en HER4 (816-823), en contraste para HER3- ErbB3, que tiene una secuencia HRNLAARN (813-820) donde la base catalítica Aspartato se convierte en Asparagina (N815) dando como resultado la nulidad catalítica de la cinasa (28, 29, 43, 44).

Bajo condiciones fisiológicas, el ligando se une a su receptor formando homodímeros o heterodímeros con el o los receptores, que a su vez permiten la activación del dominio citoplasmático y su correspondiente subregión con actividad tirosina cinasa (37, 43, 44). La dimerización resulta en una autofosforilación o una transfosforilación de los residuos de tirosina en el segmento C-terminal que sirven como sitios de unión a moléculas de señalización que contengan dominios SH2 y PTB (43). En la figura 3 se observa la conformación cerrada del receptor, la posterior captación del ligando EGF y la formación de dímeros, así como la subsecuente fosforilación y activación del dominio tirosina cinasa. Al ser fosforilado el dominio

tirosina cinasa, se promueve el anclaje de distintas proteínas río abajo activando la vía Ras, dicho proceso se observa en la figura 4.

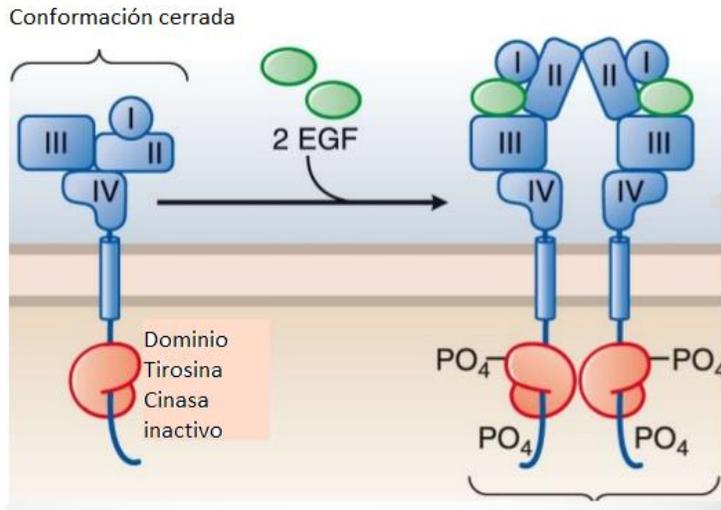


Figura 3. Receptor EGFR en conformación cerrada que posteriormente capta al ligando natural EGF y forma heterodímeros u homodímeros. Se muestra también el cambio y la activación del dominio tirosina cinasa y su fosforilación.

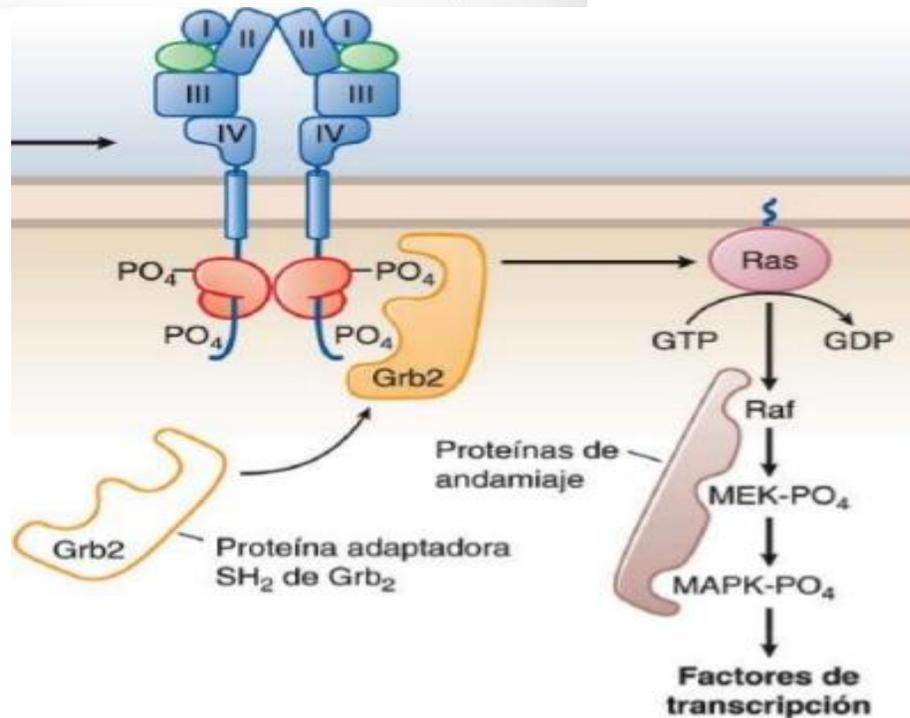


Figura 4. Activación río abajo de la vía de señalización. Modificado de: <https://image.slidesharecdn.com/receptortirosinkinasa-live-120203161106-phpapp01/95/receptor-tirosin-kinasa-7-728.jpg?cb=1328286135>

La activación de los dominios de unión al ligando en la familia ErbB, activa cambios conformacionales en el dominio citoplasmático. La transferencia del Fosfato y del ATP a los residuos de tirosina blanco incluyen la participación de varias asas que comprenden el dominio catalítico de tirosina cinasa y su correcta conformación, por

ejemplo, para HER2 los residuos 844-850 comprometen el asa de activación C-loop que es crucial para la transferencia del grupo fosforil. La β C-hélice formada por los residuos 761-775 y el asa de unión a nucleótido o N-loop, residuos 727-732 son responsables de la coordinación ATP y el sustrato de tirosina blanco ^(26, 28, 45).

El asa de activación A-loop comprende los residuos 863-884, que regula la activación de la cinasa, la cual cambia su conformación de manera extendida sobreponiéndose a la C-loop y permitiendo el acceso del sustrato blanco en el asa catalítica C-loop ^(28, 43). En muchas proteínas cinasas se encuentra en forma compacta por la existencia de puentes de hidrógeno formadas entre el grupo hidroxilo de una tirosina no fosforilada con un residuo de aspartato del sitio catalítico impidiendo la unión de sustratos al sitio catalítico de la proteína, solo hasta que la tirosina es fosforilada puede ser activada, caso contrario en los receptores de EGF ⁽⁴⁴⁾.

Tipos de mutaciones del gen *EGFR*

Las mutaciones en el gen EGFR se presentan principalmente en los primeros 4 exones del gen que codifica para el dominio tirosina cinasa ⁽⁴⁶⁾. Aproximadamente 90% de las mutaciones de EGFR son deleciones pequeñas que involucran 5 aminoácidos de los codones 746-750 (ELREA) o son mutaciones sin sentido que dan como resultado una sustitución de Leucina por Arginina en el codón 858 (L858R). No hay más de 20 variantes de una deleción, incluyendo deleciones mayores, deleciones mas mutaciones puntuales y deleciones mas inserciones. Aproximadamente 3% de las mutaciones ocurren en el codón 719, dando como resultado la sustitución de Glicina por Cisteina, Alanina o Serina (G719X). Además, aproximadamente 3% son mutaciones por inserción en el exón 20. Estos 4 tipos de mutaciones raramente ocurren al mismo tiempo. Existen otras mutaciones puntuales raras, algunas de las cuales se presentan con la mutación L858R. ⁽⁴⁶⁾

Una delección en el exón 19 en combinación con la mutación L858R dan como resultado una fosforilación incrementada y sostenida del EGFR y otras proteínas de la familia ERBB sin la estimulación por ligando. Se ha demostrado que el EGFR mutante activa de manera selectiva a las vías de señalización AKT y STAT que promueven sobrevivencia celular pero no tienen efecto en la vía de cinasas activadas por mitógeno (MAPK) que induce proliferación celular ⁽⁴³⁾. Los mutantes de EGFR en dominio de cinasa son oncogénicos y pueden transformar tanto fibroblastos como células epiteliales de pulmón en ausencia de EGFR exógeno, causando crecimiento independiente de anclaje, formación de focos y formación de tumores en ratones inmunocomprometidos ⁽⁴⁷⁾. La transformación está asociada con la autofosforilación constitutiva de EGFR, fosforilación de Shc y activación de la vía STAT. Mientras que la transformación por la mayoría de los mutantes de EGFR confieren a las células sensibilidad a Erlotinib y Gefinitib, la transformación que induce la inserción (D770insNPG) en el exón 20 confiere a las células resistencia a esos inhibidores pero, por otro lado, son más sensibles al inhibidor irreversible CL-387,785. ⁽⁴⁸⁾

Se ha demostrado que la Del 747-753 en el dominio de cinasa confiere una mayor tasa de autofosforilación y una sensibilidad mayor al erlotinib que la cinasa con la mutación L858R. Estos datos reflejan las diferencias en la tasa de respuesta clínica entre la delección en el exón 19 y la mutación L858R. ⁽⁴⁹⁾

La actividad oncogénica de los mutantes de EGFR también se ha demostrado in vivo. Dos grupos de investigación han desarrollado ratones transgénicos que expresan la delección del exón 19 o la mutación L858R en neumocitos tipo II bajo control de doxiciclina. ⁽⁵⁰⁾ La expresión de cualquiera de estas mutantes de EGFR llevó al desarrollo de adenocarcinomas, en caso contrario, al retirar la doxiciclina para reducir la expresión del transgene, o el tratamiento con erlotinib dio como resultado una regresión tumoral. Estos experimentos muestran que la señalización sostenida del EGFR se requiere para mantener el tumor en adenocarcinomas de pulmón humanos que expresan los mutantes del EGFR ⁽⁵⁰⁾.

Mutaciones del dominio extracelular presentes en tumores

Reportes muestran tres tipos diferentes de deleciones en el dominio extracelular del gen EGFR; clasificadas de acuerdo al grado de deleción y denominadas EGFRvI, EGFRvII y EGFRvIII ⁽⁵⁰⁾. En la mutación EGFRvI el dominio extracelular se elimina completamente y se parece a la oncoproteína viral v-erbB. En la mutación EGFRvII, se cortan 83 aminoácidos del subdominio IV del dominio extracelular; sin embargo, esta mutación parece no contribuir al fenotipo maligno. La más común de las mutaciones es la EGFRvIII. Esta mutación a menudo involucra la amplificación del gen, dando como resultado sobre-expresión de EGFR que carece de los aminoácidos 30-297 que corresponden a los subdominios I y II del dominio extracelular ⁽⁵⁰⁾. En este caso la cinasa de tirosina del EGFR se encuentra constitutivamente activada sin requerir unión de ligando. Se ha reportado que este tipo de mutación se presenta en 30-50% de glioblastomas, en cáncer de pulmón se encuentra en 5% de carcinomas de células escamosas pero no en adenocarcinomas. También se ha observado que la expresión tejido-específica de EGFRvIII lleva al desarrollo de cáncer de pulmón ^(50,51). Además, hay evidencias que sugieren que los tumores de pulmón con EGFRvIII son sensibles al inhibidor de cinasa de tirosina irreversible de EGFR, HK1272, a pesar de que esos tumores son relativamente resistentes a los inhibidores reversibles Gefitinib y Erlotinib ⁽⁵¹⁾.

Se han identificado nuevas mutaciones sin sentido en el dominio extracelular del gen para EGFR en 13.6% de glioblastomas y en 12.5 % de líneas celulares de glioblastoma. Parece haber varios puntos críticos: se encontraron 5 mutaciones R108K en el dominio I, tres mutaciones T263P y cinco mutaciones A289V/D/T en el dominio II y dos mutaciones G598V en el dominio IV. Estas mutaciones de EGFR ocurren de manera independiente a EGFRvIII y representan un mecanismo alternativo para la activación de EGFR en tumores, además, estas mutaciones están asociadas con sobre-expresión del gen EGFR y le confieren a las células NIH-3T3 crecimiento independiente de anclaje y tumorigenicidad. Las células transformadas

por las expresiones de esas versiones mutantes son sensibles a los inhibidores de cinasa de EGFR ⁽⁵²⁾.

Importancia del EGFR en el cáncer

La complejidad de la vía de señalización de EGFR y su importancia en el crecimiento celular y la sobrevivencia pone de relieve el rol que tienen las alteraciones de EGFR en el desarrollo y mantenimiento de algunas condiciones patológicas como el cáncer. El descubrimiento de las perturbaciones en las vías de señalización de EGFR que pueden contribuir a la transformación maligna fue reconocida a inicios de la década de los 80 donde se demostró que EGFR es el homólogo celular del oncogen del virus de eritoblastosis aviar- B v-erbB, que codifica una proteína truncada que está relacionada con el receptor para EGF, reteniendo el dominio transmembranal y el dominio involucrado en la estimulación de la proliferación celular. ⁽⁵³⁾

Las anormalidades en las funciones de EGFR están asociadas con todas las características clave del desarrollo y crecimiento del cáncer incluyendo la proliferación celular autónoma, la invasión, la angiogénesis y el potencial metastásico. ⁽⁵⁴⁾ Aberraciones en la vía de señalización de EGFR pueden iniciarse por varios eventos como una producción alterada de ligandos, mutaciones y deleciones en los receptores o por activación persistente. Niveles altos en la expresión de EGFR son comunes de un fenotipo maligno en algunos tumores sólidos en humanos. De hecho EGFR es ampliamente expresado por muchos tipos celulares incluyendo linajes epiteliales y mesenquimales, con niveles usualmente de 40 000 a 100 000 receptores por célula. En muchos casos los niveles de receptores en células malignas se encuentra muy elevado, por ejemplo, se han reportado alrededor de 2 000 000 de receptores por célula en carcinoma de mama ⁽⁵⁵⁾.

La expresión de EGFR puede dar como resultado el incremento de algunos mecanismos como la producción de ligandos de EGFR, el incremento en la transcripción del gen EGFR, la amplificación del gen EGFR y mutaciones que resultan en la activación constitutiva de la actividad de tirosina cinasa. EGFR está frecuentemente expresado en tumores de cabeza y cuello, cáncer colorrectal, mama, próstata, vejiga y ovario. En el caso de cáncer de cabeza y cuello, la expresión de EGFR se observa en al menos 80% de los tumores y se correlaciona con la reducción de supervivencia de los pacientes ⁽⁵⁶⁾.

Varios estudios han demostrado que la expresión de EGFR se correlaciona con poca supervivencia libre de enfermedad y en general, mal pronóstico, hay mayor riesgo de recurrencia de la enfermedad, en un estadio tumoral avanzado existe un mayor riesgo de metástasis ⁽⁵⁶⁾.

La gran expresión de los ligandos de EGFR en combinación con una mayor expresión del receptor mismo puede facilitar el desarrollo de una vía de crecimiento autocrino o paracrino que contribuye en el desarrollo de la carcinogénesis. La coexpresión de EGFR y TGF se correlacionan con el desarrollo de varios tipos de cánceres humanos ^(56,57).

Sin embargo, EGFR también puede inducir de manera independiente a la presencia de ligandos y este evento conocido como transactivación del receptor, tiene importantes implicaciones en el desarrollo del cáncer. EGFR, de hecho, se produce como precursor a través de las membranas y es a menudo cortada por proteasas de la superficie celular que generan ligandos solubles. Esta división conocida como desprendimiento del ectodominio, se produce por la intervención de algunas proteasas como las metaloproteinasas de matriz (MMP) y disintegrinas/metaloproteasas (ADAM) y ser particularmente relevante en la formación y progresión del cáncer ya que probablemente podría sufrir una estimulación constitutiva del receptor y sus vías intermedias, igual que la señalización MAPK ⁽⁵⁷⁾.

Algunas de estas proteasas son activadas por otros receptores de superficie celular llamados receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), cuya activación por los agonistas específicos permite la transactivación de EGFR en células transformadas. En los tumores primarios de mama la actividad de EGFR se correlaciona con niveles elevados de proteasas ADAM y el cáncer de próstata con expresión alterada de GPCRs y sus ligandos que inducen el desarrollo del cáncer. Algunos agonistas de GPCR son capaces de transactivar no solo EGFR, sino también otros receptores ErbB tanto en células normales y cancerosas. En el cáncer de próstata a menudo se ha mostrado una activación de EGFR crónica y la expresión desregulada de GPCRs y sus ligandos con lo que se relaciona con el desarrollo de tumores ⁽⁵⁸⁾.

La transactivación de ErbB implica también otras moléculas fisiológicas, como el estradiol (E2). La liberación de E2 es estimulada por la activación de MMP2 y MMP9 y parece correlacionarse con la liberación de HB-EGF; algunos antiestrógenos como el Tamoxifeno, son capaces de transactivar tanto EGFR Y ErbB2 así como un efecto acompañado de la reducción de actividad antiproliferativa del fármaco en células que sobreexpresan ErbB2 en cáncer de mama ⁽⁵⁹⁾.

La amplificación del gen que conduce a la sobre-expresión de EGFR es una característica frecuente en muchos cánceres humanos, a menudo acompañados de otras reorganizaciones estructurales que causan deleciones en el dominio extracelular del receptor, siendo la variante tipo III (EGFRvIII). A este receptor mutado le faltan los exones 1-7 que codifican para una parte del brazo de dimerización lo que conduce a una activación constitutiva de su dominio TK y es una frecuente alteración genética de EGFR en algunos tipos de cáncer como glioblastomas malignos. Estos tumores a menudo presentan múltiples reordenamientos en el gen EGFR que no son borrados, tales como mutaciones puntuales y de inserción ^(59, 60).

La expresión de EGFR se correlaciona con un mal pronóstico y una peor evolución clínica de un gran número de enfermedades malignas, incluyendo cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de vejiga, cáncer de mama y cabeza y cuello. La expresión de EGFR ha sido a menudo evaluada como un factor pronóstico independiente. Además, el aumento del contenido de los receptores a menudo se asocia con el aumento de la producción de ligandos de activación, como el TGF, por las mismas células tumorales, lo que lleva a la activación de los receptores a través de una vía de estimulación autócrina ⁽⁶⁰⁾.

Se ha destacado la importancia de mutaciones y deleciones del dominio cinasa de EGFR en los tumores derivados de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico. La secuencia del gen de EGFR reveló una fuerte correlación entre la presencia de mutaciones somáticas en el dominio cinasa del gen y la respuesta a la pequeña molécula EGFR-TKIs (inhibidores de tirosina cinasa de EGFR), mientras que las mutaciones del dominio extracelular se encuentran comúnmente en los tumores cerebrales malignos. La activación de las mutaciones más frecuentes identificadas son las deleciones de los aminoácidos 746-750 en el exón 19, la sustitución del Leucina por Arginina en el codón 858 (L858R) y Leucina por Glutamato en el codón 861 (L861Q) en el exón 21 y la sustitución de Glicina por Cisteina en el codón 719 (G719C) en el exón 19 ⁽⁶¹⁾.

Algunas mutaciones son capaces de inducir resistencia a TKIs como la Treonina a Metionina, que son mutaciones puntuales (T790M O T766M) en el exón 20. El papel exacto de las mutaciones de EGFR en la carcinogénesis es un tema interesante de investigación. La mayor parte de estas mutaciones tiene un origen somático ya que el muestreo del tejido pulmonar normal utilizando microdissección revela su presencia solo en células cancerosas y no en tejido normal, incluso el epitelio normal en los tejidos adyacentes o el tumor puede llevar a una gran cantidad de mutaciones de EGFR, la identificación de estas alteraciones moleculares podría considerarse como un evento temprano de la carcinogénesis al menos en el pulmón. La correlación entre el desarrollo de algunas mutaciones y la activación del EGFR se

ha demostrado por la transfección del gen EGFR en cultivos de células mutantes no pequeñas de cáncer de pulmón (NSCLC), donde se observa un aumento de la autofosforilación del receptor y la activación de vías de señalización, de hecho, en las células tumorales con EGFR mutante se activan las vías de supervivencia PDK/AKT y STAT de manera preferente, y el tratamiento de estas células con un TKI induce la apoptosis ^(62, 63). Una de las funciones interesantes de EGFR en la progresión tumoral es su participación en la angiogénesis a través de la regulación positiva del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y las metaloproteinasas (MMP) ⁽⁶³⁾.

En las células de cáncer humano, la vía autócrina de EGFR controla parcialmente la producción de varios factores de crecimiento pro-angiogénicos, incluyendo VEGF y el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF). Una vez activado EGFR induce una sobre regulación de VEGF *in vitro* en células de diferentes cánceres incluyendo CRC, cáncer de próstata, el glioma humano y CECC. Contrariamente, el uso de los inhibidores de EGFR, como los anticuerpos monoclonales (MAb), dan lugar a la baja regulación simultánea de tumor inducido y la angiogénesis mediada por VEGF. Por otra parte, la transfección de VEGF en las células cancerosas los hace significativamente resistentes a los anticuerpos monoclonales anti-EGFR cuando se inyecta en ratones desnudos, lo que demuestra el vínculo funcional entre las dos vías y el papel causal de la sobreexpresión del VEGF en la resistencia adquirida a los anticuerpos monoclonales anti EGFR ⁽⁶⁴⁾.

En el cáncer humano el equilibrio entre la muerte celular y la supervivencia se altera y las células son capaces de sobrevivir en condiciones que normalmente inducen la muerte celular por apoptosis. EGFR desempeña un papel relevante en la prevención de la apoptosis, uno de los mecanismos del desarrollo del cáncer. De hecho, el EGFR es eficaz en el bloqueo de la apoptosis inducida por receptores de muerte como la familia del receptor de factor de necrosis tumoral (TNF), que incluye su receptor (TNFR), FAS, receptor de muerte 4 (DR4) y 5 (DR5). Los ligandos naturales de estos receptores son TNF, FAS ligandos (FasL) y relacionada con el TNF, el

ligando inductor de apoptosis (TRAIL). EGFR activado también puede afectar la apoptosis mediante la vía de regulación a través de RAS/ERK. La expresión de las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP), tales como c-FLIP capaces de inhibir específicamente la función de la caspasa 8, mediante la reducción de la inactivación del receptor de la apoptosis inducida. ⁽⁶⁵⁾

La estimulación de EGFR también es capaz de afectar la expresión del receptor de muerte y ligando FASL y el camino a través de la inhibición del factor de transcripción Forkhead o receptores de muerte DR5 y DR4 a través de la inhibición de p53. Esto se traduce en reducción de la inactivación del receptor mediada por apoptosis. Uno de los grupos más caracterizados de las proteínas que regulan la apoptosis es la familia Bcl-2 que incluye a dos grupos distintos de las proteínas, pro-apoptóticos y los miembros anti-apoptóticos. La señalización del EGFR a través de la estimulación de NFκB por la vía de señalización PI3K/AKT, puede alterar el equilibrio entre los dos grupos hasta la regulación de las moléculas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2, tales como Bcl-2, Bcl-xL o Mcl-1. Además, la activación de la transcripción de NFκB parece ser mayor en algunas células cancerosas. ⁽⁶⁶⁾

El punto crítico del cruce entre las vías de señalización del EGFR y la red de apoptosis se estratifica en múltiples niveles y finalmente influye en el potencial apoptótico de la célula, lo que representa uno de los puntos más importante de la supervivencia de las células cancerosas. Además de las perturbaciones en la expresión de EGFR, mutaciones y la producción del ligando, las vías de señalización intracelular posteriores están bajo el control de los receptores y son frecuentemente alteradas en las células tumorales. El aumento de la actividad del EGFR y la supervivencia celular mediada por AKT se han descrito en aproximadamente 25% de los tumores sólidos como el de mama, y mutaciones de PTEN en glioblastomas. Finalmente, la activación de EGFR se correlaciona con la desregulación de la activación constitutiva de las proteínas STAT que poseen propiedades oncogénicas como la prevención de la apoptosis en varios tipos de cáncer humano. Estas alteraciones del EGFR relacionadas con las vías de

señalización a menudo se presentan simultáneamente en la célula cancerosa, asegurando la supervivencia sostenida, metástasis y resistencia a las terapias convencionales o específicas ⁽⁶⁶⁾. En las últimas décadas se han realizado y perfeccionado técnicas que ayudan a obtener los análisis necesarios para verificar la metástasis, supervivencia y resistencia a terapias determinadas, una de ellas es la secuenciación.

Secuenciación

La secuenciación del ADN es un conjunto de métodos y técnicas bioquímicas cuya finalidad es la determinación del orden de los nucleótidos (A, C, G y T) en un segmento de ADN. Determinar la secuencia de ADN es útil en el estudio de la investigación básica de los procesos biológicos fundamentales, para conocer las mutaciones somáticas como las sustituciones de bases generadas en el ADN de distintos organismos ^(67, 68).

Automatización del método de Sanger

En el Cuadro 2 se resume algunos de los avances más importantes que han permitido el desarrollo de métodos automatizados para la secuenciación de ADN utilizando el método de Sanger.

Avance	Descripción	Periodo
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	Técnica que permite la amplificación exponencial de un fragmento de ADN	1990
Polimerasa <i>Taq</i>	Polimerasa termoestable que puede utilizarse en el PCR	1988-1990
Marcaje del ADN	El marcaje y el tipo de detección utilizado para identificar los fragmentos de ADN sintetizados	1987-1998
Secuenciadores automatizados	Desarrollo de máquinas automatizadas con la capacidad de determinar la secuencia de miles de pares de bases por día	1991-1994

Cuadro 1. Descubrimientos significativos que permitieron el desarrollo de los métodos automatizados de secuenciación de ácidos nucleicos.

Secuenciación automatizada

Los hallazgos de la década de los 80 (mejores polimerasas, PCR, marcas fluorescentes) contribuyeron al desarrollo de máquinas automatizadas capaces de determinar miles de bases de secuencia por día. Las primeras máquinas de secuenciación se fabricaron a finales de los 80. En 1986, Smith *et al.* ⁽⁶⁵⁾ reportaron una técnica de secuenciación automatizada basada en la terminación específica con cuatro diferentes fluoróforos. La mezcla de síntesis se cargaba en un solo carril de gel, en tubo, y se usaba un detector óptico para determinar la absorción de cada banda, casi al final del tubo. Esta información pasaba directamente a una computadora y permitía obtener información precisa de hasta 200 pares de bases (pb) de la secuencia. Sin embargo, habían varias áreas que podían ser optimizadas para aumentar la longitud de la secuencia obtenida: (1) el tamaño, diámetro y composición del gel electroforético, (2) los reactivos para la reacción de secuenciación, (3) las condiciones de electroforesis, (4) equipo óptico/electrónico de detección, (5) los marcadores fluorescentes. Durante el lapso entre el avance de Smith en 1986 hasta hoy en día se experimenta con otros equipos y variaciones de la técnica de secuenciación con el objetivo de mejorar el rendimiento con estas máquinas, por ejemplo: Las maquinas secuenciadoras basadas en geles tipo “slab”, usan un gel vertical para separar los fragmentos generados durante la reacción de

secuenciación y tienen distintos sistemas de detección para leer el orden de los marcadores fluorescentes ⁽⁶⁷⁾.

Una alternativa al marcado del cebador es el marcado de los terminadores de la cadena, un método conocido como "secuenciación por terminador fluorescente". La mayor ventaja de este método es que la secuenciación se puede llevar a cabo en una sola reacción, en lugar de en cuatro reacciones como en el método del cebador marcado. En una secuenciación por terminador fluorescente se marcan cada uno de los cuatro didesoxinucleótidos que terminan la cadena con un colorante fluorescente diferente, con fluorescencias a diferentes longitudes de onda. Este método es atractivo por su gran capacidad y rapidez y actualmente es el método de referencia en la secuenciación automatizada con analizadores de secuencia controlados por computadora. Entre sus limitaciones potenciales están los efectos de los terminadores fluorescentes en el fragmento de ADN, que producen alturas y formas de picos desiguales en los registros de secuencia de ADN del cromatograma de la electroforesis capilar. Este problema se ha resuelto en gran medida con la introducción de nuevos sistemas enzimáticos de polimerasas de ADN y colorantes que minimizan la variabilidad de la incorporación, así como métodos para eliminar la superposición de los colorantes producidos por ciertas características químicas y que pueden dar lugar a artefactos en los registros de secuencia del ADN. El método de secuenciado por terminador fluorescente junto con analizadores de secuencia de ADN de alto rendimiento se utiliza para la mayoría de los proyectos de secuenciación, pues es más fácil llevarlo a cabo y tiene un costo menor que otros métodos de secuenciación. ^(67, 68)

Automatización y preparación de las muestras

Los instrumentos modernos automáticos de secuenciación del ADN (secuenciadores de ADN) pueden secuenciar más de 384 muestras marcadas por fluorescencia de una sola vez y llevar a cabo 24 ciclos de secuenciación al día. No obstante, los secuenciadores automáticos de ADN llevan a cabo solamente

separación del ADN basada en el tamaño (por electroforesis capilar), detección y registro de la coloración fluorescente, y los datos resultantes se dan como cromatogramas que registran los picos de fluorescencia como se observa en el ejemplo de la figura 6. Se efectúan por separado las reacciones de secuenciación mediante una termocicladora, lavado y resuspensión en una solución tamponada antes de pasar las muestras al secuenciador. ⁽⁶⁸⁾ Con estos resultados podemos encontrar por medio de la comparación con bibliotecas de bases de datos cambios en la secuencia de estudio.

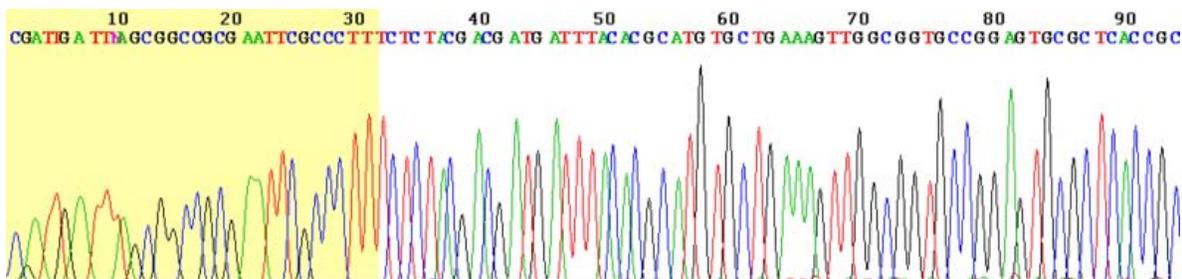


Figura 5. Ejemplo de vista del comienzo de un marco de lectura con el terminador (fondo coloreado).

Modificado de: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sanger_sequencing_read_display.gif

Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

Las búsquedas para encontrar semejanzas en las bases de datos son un pilar para la bioinformática, y los proyectos para secuenciar el ADN de los organismos han sido tareas preponderantes. La semejanza en las búsquedas puede usarse para hallar algunos genes cuyas secuencias han sido determinadas en el laboratorio, pero para las cuales no existe información biológica. ⁽⁶⁸⁾

La secuencia de los genes de interés es comparada con cada secuencia de la base de datos y aquellas que presentan similitud son identificadas. Los alineamientos con mayor parecido en sus secuencias son comparados y cuantificados. Si la secuencia de consulta se asemeja ampliamente a la secuencia de la base de datos de una función conocida, estructura o actividad bioquímica, entonces se predice que la

secuencia de consulta tiene propiedades similares. La seguridad o fuerza de las predicciones depende de la calidad del alineamiento entre las secuencias. Si más de la mitad de la secuencia de aminoácidos es idéntica a la secuencia de los alineamientos, la predicción es muy fuerte. Esta es la regla de aproximación para la búsqueda de la secuencia de consulta de un gen en la base de datos ⁽⁶⁹⁾.

Si solo las secuencias de genes son comparadas, entonces la mayor parte de las secuencias debe ser idéntica con algunos “huecos” o *gaps* para que la predicción sea fuerte. Si el grado de similitud disminuye, la confiabilidad en la predicción también disminuye. Los programas utilizados para evaluar la similitud en la búsqueda de la base de datos proveen de evaluaciones estadísticas que sirven como guías para la evaluación de la puntuación de los alineamientos ⁽⁶⁹⁾.

Para estandarizar la búsqueda dentro de la secuencia de la base de datos con la secuencia de consulta, una matriz de representación de la familia o genes relacionadas puede usarse para encontrar genes que son de la misma familia o si es que la secuencia de búsqueda presenta patrones que representen a una familia de genes y entonces se determine que pertenece a esa familia ⁽⁶⁹⁾.

La secuencia de consulta es una secuencia que también se alinea a una gran base de datos de secuencias para encontrar las secuencias más estrechamente coincidentes en la base de datos ⁽⁶⁹⁾.

Pasos del algoritmo de BLAST para encontrar una secuencia de genes:

1. La secuencia es opcionalmente filtrada para remover regiones con baja complejidad las cuales no son útiles para producir una secuencia de alineamientos importante.
2. La longitud de la lista de letras en la secuencia de consulta se leerá de once en once comenzando en las posiciones 1, 2, 3, 4 hasta la 11; luego 2, 3, 4

hasta la 11, etc., hasta que sean alcanzadas las últimas once posiciones disponibles en la secuencia ⁽⁶⁹⁾.

Usando BLOSUM 62, para la sustitución de puntajes, la secuencia de consulta que se filtró en el paso 1 es evaluada para que haya alineamiento exacto con alguna secuencia de la base de datos. Las letras también son evaluadas para que se alineen con otra combinación de 11 ácidos nucleicos, el objeto es encontrar el alineamiento de las letras de la secuencia de consulta con otras 11 letras que sean encontradas dentro de la secuencia de la base de datos. Existe un total de 8000 posibles alineamientos ⁽⁶⁹⁾.

JUSTIFICACIÓN

El cáncer de cérvix es un problema de salud pública en México por lo que es importante entender los mecanismos de señalización que se activan en este tipo de células, ya que presentan alteraciones de moléculas clave que llevan a la proliferación y al desarrollo de esta enfermedad.

Nuestro grupo de trabajo ha demostrado la presencia del receptor EGFR, aparentemente inactivo en las líneas celulares de cáncer de cérvix CALO e INBL. Por lo tanto, es importante analizar la presencia de mutaciones en el gen EGFR que pudieran generar la inactivación, específicamente en los exones 19 y 21 que se incluyen dentro del dominio tirosina cinasa, en los cuales se ha reportado la mayor cantidad de mutaciones en diversos tipos de cáncer.

Existen diferentes trabajos encaminados al estudio de mutaciones en la región citoplasmática del receptor EGFR, concretamente en la subregión con actividad tirosina cinasa, en el carcinoma de pulmón se han detectado mutaciones que son la causa del incremento en la señalización de EGFR que activa de manera selectiva diferentes vías de señalización. Estas mutaciones producen el incremento en la actividad de cinasa del receptor EGFR aunado a la fosforilación de vías como, PI3K, AKT y STAT 5. En consecuencia, el bloqueo en la señalización de EGFR a través de inhibidores de la actividad de cinasa, conlleva a la muerte de las células malignas y la disminución del tumor.

Por esta razón es importante la búsqueda de posibles mutaciones del receptor EGFR, que en este caso aparentemente no favorecen su activación constitutiva, lo que permitirá determinar si las mutaciones se pueden utilizar como marcadores para predecir el posible desarrollo de tumores malignos.

La identificación de las mutaciones más comunes de los exones 19 y 21 del receptor EGFR, las cuales concentran el mayor número de mutaciones y que forman parte



del dominio tirosina cinasa de EGFR, determinará si existe mayor probabilidad de desarrollo de cáncer altamente invasivo.



HIPÓTESIS

Se sabe que las mutaciones en los exones 19 y 21 que transcribe el dominio catálico del EGFR, generan un EGFR inactivo, por lo que se espera que las células CALO e INBL que presentan el EGFR inactivo, exhiban mutaciones en los exones 19 y 21 de este receptor.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de mutaciones en el dominio de tirosina cinasa del receptor EGF en células de carcinoma de cérvix CALO e INBL.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Extracción de ADN y amplificación por PCR de los exones 19 y 21 del receptor para EGF de células de carcinoma de cérvix CALO e INBL.
2. Establecer las condiciones experimentales para detectar las mutaciones de los exones 19 y 21 del receptor para EGF mediante la secuenciación de los productos de PCR.
3. Comparar la secuencia de ADN obtenida para el EGFR presente en las líneas celulares de cáncer de cérvix CALO e INBL, con la secuencia del EGFR en células normales humanas reportada en la base de datos de NCBI.

PROCEDIMIENTO

Cultivo celular

El material biológico consistió en líneas celulares de carcinoma de cérvix CALO (positiva para VPH 16; estadio II A) e INBL (positiva para VPH 18; estadio IV B) obtenidas a partir de biopsias de pacientes mexicanas. Estas células se encuentran criopreservadas en la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (UMIEZ) de la FES Zaragoza UNAM. Las células fueron sembradas en cajas de cultivo de 75 cm³ (Nunclon, Denmark), en medio de cultivo RPMI-1640 (Microlab, MEX) al 10% de SFB (Invitrogen, USA) y se mantuvieron en una incubadora (Forma Scientific, USA) a 37°C, 5% de CO₂ y una atmósfera húmeda a punto de rocío.

Resiembra

Esta se realizó cada tres días con una previa revisión utilizando un microscopio invertido (Micro Star American Optical) para verificar el estado y la proliferación celular de cada línea, determinando si sólo se necesitaba retirar el medio y adicionar medio fresco o la resiembra. Para esto se utilizó verseno para despegar las células adheridas a la botella de cultivo, éstas se centrifugaron a 2,000 rpm durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se adicionaron 10 ml de medio RPMI con SFB 10%.

Conteo celular

Para realizar este procedimiento, se retiró el medio contenido de cada botella de cultivo, agregando 7 mL de solución de verseno y se colocaron las botellas de cultivo dentro de la incubadora por espacio de 5 minutos con el fin de despegar las células. Después, se procedió a retirar la solución verseno y se depositó en tubos de plástico FALCON de 50mL y se agregaron 10 mL de medio RPMI sin suero, se centrifugaron

a 2,000 rpm por 5 minutos; se eliminó el sobrenadante y se agregaron 2 mL de medio de cultivo con SFB 10%, se resuspendió el botón celular de cada línea. Para finalizar, se tomaron 20 μ L de la solución resuspendida y se colocaron en una cámara de Newbauer para el conteo utilizando un microscopio óptico (Leica DME).

Extracción de ADN

Una vez realizado el conteo celular se procedió a tomar una alícuota de 3×10^6 células de CALO e INBL, se centrifugaron y se retiró el sobrenadante. Posteriormente se realizaron lavados consecutivos de los botones celulares con 1 mL de solución PBS, se centrifugó a 3,000 rpm y se eliminó el sobrenadante. Se agregó 1 mL de PBS a cada botón celular y se resuspendió para ser depositada cada muestra en una tarjeta de papel FTA (Whatman, promega) y se dejaron secar a temperatura ambiente y protegidas de la luz por 24 horas.

De cada tarjeta FTA se obtuvieron muestras de 1mm de diámetro utilizando un horador previamente esterilizado. Los discos obtenidos se colocaron en tubos Eppendorf y se les agregaron 400 μ L de reactivo FTA (Promega) por cada 10 círculos de papel FTA, se agitó por inversión lenta durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante para añadir 400 μ L de agua estéril libre de DNAsas y RNAsas invirtiendo lentamente las muestras durante 5 minutos a temperatura ambiente, se repitió este proceso de lavado con las mismas condiciones 2 veces.

Reacción de polimerasa en cadena (PCR)

Se sintetizó el cebador de 20 pares de bases de longitud de la secuencia complementaria a la del fragmento de ADN, se sintetizaron oligos para cada muestra. Se propuso una mezcla de reacción y ciclos del termociclador con las siguientes condiciones (Cuadro 2).

Concentración de los reactivos para efectuar la reacción de PCR		
Volumen total 20µl	STOCK	Volumen final
Amortiguador de PCR	10x	3µl
Cloruro de Magnesio	25 mM	3µl
DNTPs	5 mM	0.8µl
Primer (19 ó 21)	20 mM	1 µl
Enzima Taq Polimerasa	5 U/ml	0.2µl
Agua libre de RNAsas		12µl
ADN (circulo FTA)	1	2

Cuadro 2. Mezclas de reacción para la técnica PCR

Temperatura para los 30 ciclos de PCR		
	Temperatura(°C)	Tiempo (minutos)
1	95	5
2	58	1
3	72	1
4	95	1
5	29 veces del paso 2 al paso 4	
6	58	2
7	72	7
8	20	60

Cuadro 3. Los ciclos del termociclador M J Reserch PTC-2000.

Electroforesis en gel de agarosa

Se analizaron los productos de PCR en un gel de agarosa al 1.5% con TBE 1X en 100 mL de agua destilada, utilizando un horno de microondas (Panasonic modelo NN-76187) para disolver correctamente la agarosa, se dejaron reposar por 20 minutos a temperatura ambiente y se agregaron 30 µL de bromuro de etidio al 10%.

Posteriormente se realizó al vaciado de la agarosa en la cámara de electroforesis colocando el separador de carriles.

Se agregaron 8 μL de cada producto de PCR por carril, dejando un pozo para el marcador de peso molecular. Se aplicó una corriente de 90 mV por 2 horas. Para terminar, se colocó el gel en el equipo analizador de imágenes (UV Transiluminator UVP BioImaging Systems GDS-8000) utilizando el software del equipo para obtener las imágenes respectivas y con aquellos productos que reúnan las características se llevó a cabo la secuenciación.

Obtención de las muestras para la secuenciación

Se llevaron a la práctica las instrucciones del kit de recuperación de ADN para geles de agarosa Zymoclean. Se extrajo el fragmento de gel de agarosa que contiene el ADN utilizando una navaja y se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 mm para centrifugar. Se añadieron 3 volúmenes de ADB a cada volumen de agarosa en una concentración de 300 μl por cada 100 μl de agarosa. Se incubaron a 37°C de 5 a 10 minutos hasta que el gel se encuentre completamente disuelto. Se transfirieron la solución de agarosa derretida a una columna en un tubo de colección y se centrifugó por 1 minuto eliminando el sobrenadante. Para el lavado se añadieron 200 μL de Buffer de lavado y se centrifugaron por 30 segundos excluyendo el sobrenadante y repitiendo el lavado. Se añadieron $\geq 6\mu\text{l}$ de buffer de elusión a la columna, y

después se colocaron en un tubo de 1.5 mL y por último se centrifugaron por 30 segundos para extraer el ADN.

Secuenciación

Obtenido el ADN de cada muestra, éste se envió para ser secuenciado en las instalaciones de la FES Iztacala. Obtenidas las secuencias, éstas fueron comparadas con la base de datos de NCBI.

Detección de mutaciones

La detección de mutaciones se realizó mediante el proceso de la secuenciación de los productos de PCR obtenidos en secuenciador automatizado. Posteriormente se compararon las secuencias obtenidas con la base de datos de NCBI y se verificó los posibles cambios.

RESULTADOS

Establecimiento de las condiciones óptimas para la extracción de ADN por medio de la técnica FTA.

Para estandarizar la extracción de ADN por medio de la técnica FTA se utilizaron 3×10^6 células, tanto de CALO e INBL, se agregaron 100µl de PBS a cada botón celular, se resuspendieron y se colocó cada línea celular en las tarjetas FTA y se dejaron secar por dos días.

La purificación de las muestras se realizó mediante una modificación de los protocolos estandarizados (Whatman, Clifton, NJ, USA) aumentando el número de lavados, con el fin de asegurarnos que el ADN genómico se encontrará totalmente limpio de restos celulares e inhibidores en el momento de la amplificación por PCR.

La técnica FTA facilitó la extracción y purificación del ADN debido a que, cuando las células entran en contacto con el soporte, lisa las membranas celulares, desnaturaliza las proteínas e inmoviliza los ácidos nucleicos. Asimismo, elimina la necesidad de espacio en congelador, mejora la accesibilidad de la muestra, reduce el espacio y los costos de almacenamiento.



1. Recortar 20 discos (punch, trozo de papel FTA de forma circular de 1 mm de diámetro recortado con el instrumento Harris Micro-punch©) y depositarlo en un tubo Eppendorf.
2. Añadir 800µl de FTA Purification Reagent, agitando por inversión lenta por un lapso de 5 minutos.
3. Se elimina la parte soluble y se agregaron 400µl de agua estéril libre de DNAsas y RNAasas invirtiendo lentamente las muestras por espacio de 5 minutos.
4. Este proceso de lavado se repitió dos veces con las mismas condiciones.
5. Las muestras se dejaron secar durante 2 días.

Figura 6. Estandarización de las condiciones para extracción de ADN con la técnica FTA.
Modificado de: www.whatman.com/References/FTAforBloodDNA.pdf

Establecimiento de las condiciones óptimas para la obtención de los productos de PCR.

A fin de estandarizar las concentraciones óptimas de reactivos para la obtención una amplificación adecuada de los productos de las líneas celulares CALO e INBL, fue necesario realizar varias PCR. En los ensayos iniciales se utilizaron las propuestas por el fabricante (cuadro 2).

Debido a que la amplificación no se logró bajo estas condiciones, fue necesario modificar las concentraciones y manejo de los reactivos. Las condiciones adecuadas se presentan en los cuadros 4 y 5.

Optimización de la técnica con las líneas celulares CALO e INBL

Para establecer las condiciones de PCR en los exones 19 y 21 de la proteína EGFR, en primer lugar se obtuvieron los productos de PCR utilizando los oligos o “primers” reportados en los resultados de nuestro grupo de investigación. (Cuadro 6)

Se establecieron las condiciones experimentales para obtener los productos de PCR con base en la información proporcionada por el fabricante (Cuadro 2).

Posteriormente se realizaron algunas modificaciones, hasta que se logró establecer las concentraciones de los reactivos para los exones 19 y 21 en la línea celular CALO (Cuadro 4).

Debido a que las condiciones definidas para la línea celular CALO no fueron adecuadas para la línea INBL se realizaron modificaciones en las concentraciones de los reactivos para amplificar el exón 19 de INBL, hasta que se logró establecer las concentraciones de los reactivos (Cuadro 5).

Para el exón 21 de INBL se establecieron las condiciones hasta encontrar las concentraciones de los reactivos; 0.23 μ L de enzima, 1 μ L de DNTP's (25Mm), 2.5 μ L de MgCl₂ (25Mm) y 3 μ L amortiguador de PCR (10x), que representaron las condiciones óptimas para la amplificación de los productos de PCR, para el exón 21 INBL.

Las condiciones para llevar a cabo la reacción de PCR por el termociclador fueron las descritas en el cuadro 2.

Volumen total 20 μ L	STOCK	Volumen final
Amortiguador de PCR	10x	3 μ L
Cloruro de Magnesio	25 mM	2.5 μ L
DNTPs	5 mM	0.9 μ L
Oligo de interés	20 nM	1 μ L
Enzima Taq	5 U/mL	0.22 μ L
Agua libre de RNAsas		12.38 μ L
ADN(círculo FTA)	2	2

Cuadro 4. Mezcla de Reacción para los exones 19 y 21 CALO

Volumen total 20 μ L	STOCK	Volumen final exón 19	Volumen final exón 21
Amortiguador de PCR	10x	3 μ L	3 μ L
Cloruro de Magnesio	25 mM	2.5 μ L	3 μ L
DNTPs	5 mM	0.9 μ L	1 μ L
Oligo de interés	20 nM	1 μ L	1 μ L
Enzima Taq	5 U/mL	0.22 μ L	0.23 μ L
Agua libre de RNAsas		12.38 μ L	11.7 μ L
ADN(círculo FTA)	1	1	1

Cuadro 5. Mezcla de Reacción para los exones 19 y 21 INBL

EGFR004 EXÓN 19 FORWARD	CGTAAACGTCCCTGTGCTAGG
EGFR004 EXÓN 19 REVERSE	CCTTATCTCCCCTCCCCGTAT
EGFR004 EXÓN 21 FORWARD	ATCTGGCTCGTCTGTGTGTG
EGFR004 EXÓN21 REVERSE	GCAGCTGGACTCGATTTTCCT

Cuadro 6: Secuencia de los oligos (primers) utilizados.

Una vez establecidas las condiciones para obtener los productos del PCR con los oligonucleótidos sintetizados comercialmente, se amplificaron las muestras de ADN obtenido a partir de las líneas celulares CALO e INBL y se analizaron en geles de agarosa.

Cuando se estableció la pureza de los productos de cada línea celular, se clasificaron como: CALO 19, CALO 21, INBL 19 e INBL 21 para en un futuro poder

determinar las posibles mutaciones, por medio de secuenciación por terminación de cadena, en los exones correspondientes.



Figura 7: Peso molecular del gen EGFR (300 pb) en las muestras de las líneas CALO e INBL. Carril 1: marcador de peso molecular; carril 2: CALO 19 004; carril 3: INBL 19 004; carril 4: CALO 21 004; carril 5: INBL 21 004.

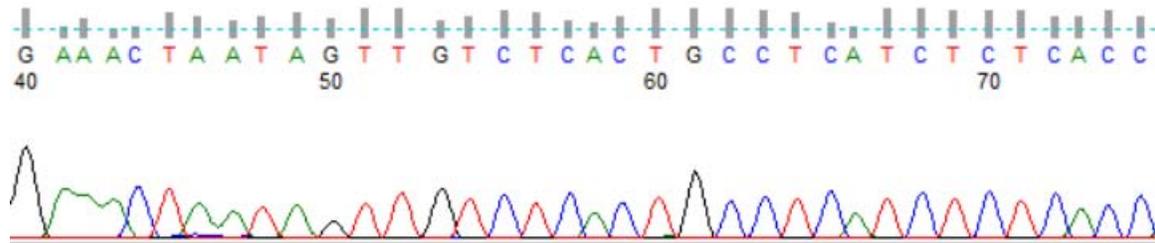
Secuenciación

Establecidas las condiciones óptimas para obtener los productos del PCR con los oligonucleótidos sintetizados comercialmente, se amplificaron muestras de ADN obtenidas de las líneas celulares CALO e INBL y se analizaron en geles de agarosa. Se clasificaron como: CALO 19-F, CALO 19-R, CALO 21-F, CALO 21-R, INBL 19-F, INBL 19-R, INBL 21-F e INBL 21-R para determinar las mutaciones en los exones 19 y 21 respectivamente de cada línea celular. Se enviaron para obtener la secuencia con el ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, CA, USA) utilizando el kit para secuenciación Big Dye v3.1 Cycle sequencing Applied Biosystems en la FES Iztacala de la UNAM.

A) Calo 21 004 Forward

AGAGTGAGTTACTTTTTCCACAGAGGGAACTAATAGTTGTCTCACTGCCTCATCTCTCACCA
TCCAAGGTGCCTATCAAGTGGATGGC

B) Electroferograma de la muestra Calo 21 004 Forward.



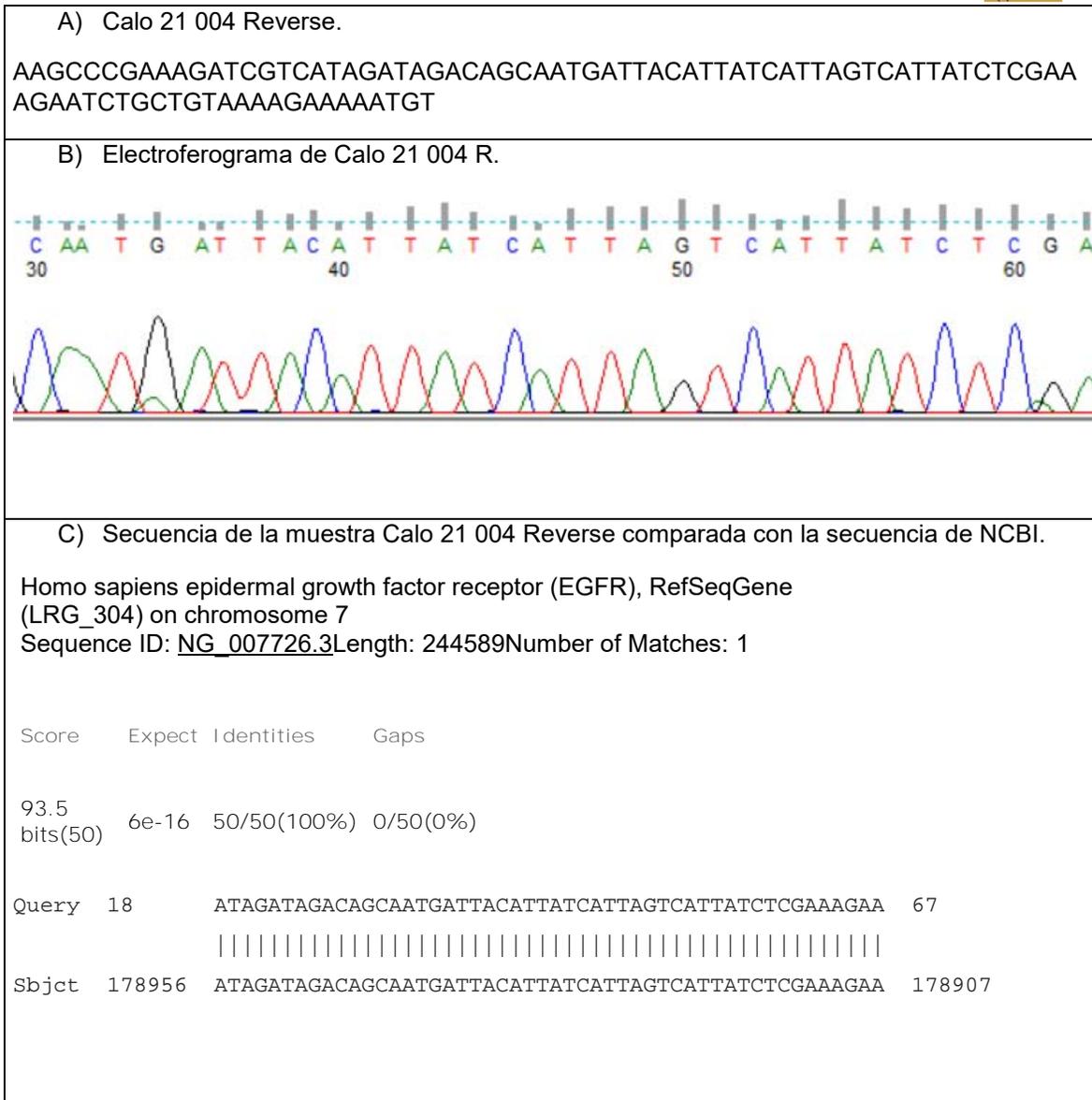
C) Secuencia de la muestra Calo 21 004 F comparada con la secuencia de NCBI.

Homo sapiens epidermal growth factor receptor (EGFR), RefSeqGene (LRG_304) on chromosome 7

Sequence ID: NG_007726.3 Length: 244589 Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps
158 bits(85)	2e-35	90/92(98%)	2/92(2%)
Query 1	AGAGTGAGTT- A CTTTTTCC-ACAGAGGGAACTAATAGTTGTCTCACTGCCTCATCTCT 58		
Sbjct 178663	AGAGTGAGTT A CTTTTTCC A ACAGAGGGAACTAATAGTTGTCTCACTGCCTCATCTCT 178722		
Query 59	CACCATCCCAAGGTGCCTATCAAGTGGATGGC 90		
Sbjct 178723	CACCATCCCAAGGTGCCTATCAAGTGGATGGC 178754		

Cuadro 9: A) Secuencia de ADN representativa de la línea celular CALO exón 21 dirección 5' 3' (Forward). B) Electroferograma que muestra los picos de absorción de nucleótidos identificados por el secuenciador automatizado (ABI Prism 7500, Applied Biosystems, CA, USA) C) Comparación de secuencia de la muestra CALO 21 004 F (Query) y la secuencia obtenida de la base de datos de NCBI para EGFR (Sbjct).

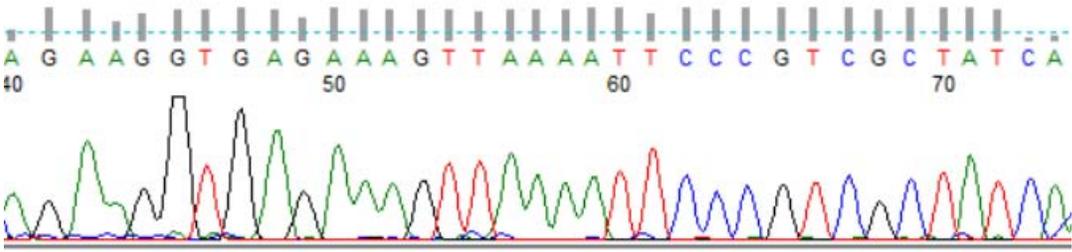


Cuadro 10: A) Secuencia de ADN representativa de la línea celular CALO exón 21 dirección 3' 5' (Reverse). B) Electroferograma que muestra los picos de absorción de nucleótidos identificados por el secuenciador automatizado (ABI Prism 7500, Applied Biosystems, CA, USA) C) Comparación de secuencia de la muestra CALO 21 004 R (Query) y la secuencia obtenida de la base de datos de NCBI para EGFR (Sbjct).

A) INBL 19 004 Forward

TAAAAACCAAACTCTCTGTCTAGGGACTCTGGATCCCAGAAGGTGAGAAAGTTAAAATTCC
 CGTCGCTATCAACGAATTAAGAAGCAACATCTCCGAAAGCCAACAAGGAAATCCTCGATG
 TGAGTTTCTGCTTTGCTGTGTGGGGGTCCATGGCTCTGAACCTCAGGAAACAAAAA

B) Electroferograma de la muestra INBL 19 004 Forward.



C) Comparación de la secuencia de la muestra INBL 19 004 Forward con la de NCBI.

Homo sapiens epidermal growth factor receptor (EGFR) gene, exon 19 and partial cds
 Sequence ID: [KJ685773.1](#) Length: 99 Number of Matches: 1

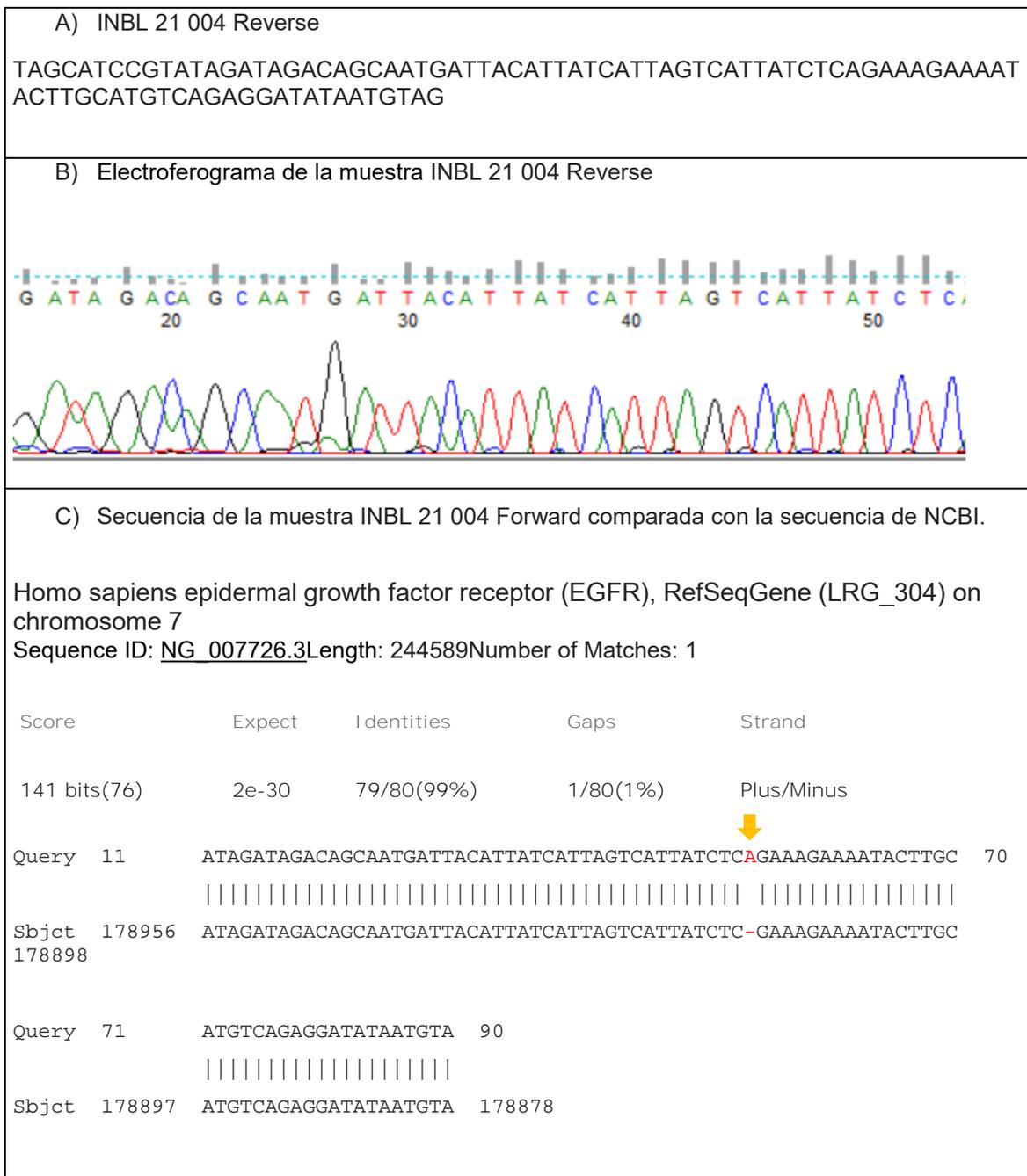
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
167 bits(90)	9e-38	96/99(97 %)	0/99(0 %)	Plus/Plus

```

Query 26  GGACTCTGGATCCCAGAAGGTGAGAAAGTTAAAATTCCCGTCGCTATCAACGAATTAAAA 85
          |||
Sbjct 1   GGAGTCTGGATCCCAGAAGGTGAGAAAGTTAAAATTCCCGTCGCTATCAAGGAATTAAGA 60

Query 86  GAAGCAACATCTCCGAAAGCCAACAAGGAAATCCTCGAT 124
          |||
Sbjct 61  GAAGCAACATCTCCGAAAGCCAACAAGGAAATCCTCGAT 99
  
```

Cuadro 11: A) Secuencia de ADN representativa de la línea celular INBL exón 19 dirección 5' 3' (Forward). B) Electroferograma que muestra los picos de absorción de nucleótidos identificados por el secuenciador automatizado (ABI Prism 7500, Applied Biosystems, CA, USA) C) Comparación de secuencia de la muestra INBL 19 004 F (Query) y la secuencia obtenida de la base de datos de NCBI para EGFR (Sbjct).



Cuadro 14: A) Secuencia de ADN representativa de la línea celular INBL exón 21 dirección 3' 5' (Reverse). B) Electroferograma que muestra los picos de absorción de nucleótidos identificados por el secuenciador automatizado (ABI Prism 7500, Applied Biosystems, CA, USA) C) Comparación de secuencia de la muestra INBL 21 004 R (Query) con la base de datos de NCBI.

Muestra	Posición	Cambios
Calo 19 004 Forward	167140, 167161, 167199, 167210 y 167220.	Delección de C
	167137	C por T (Transición)
	167146	G por A (Transición)
	167200	C por G (Transición)
	167202	Transversión T por A
	167204	Transversión T por A
	167205	Transversión G por C
	167208	Transversión C por G
	167211	Transversión T por A
	167221	C por T (Transición)
Calo 19 004 Reverse	167443	Delección de C
	167379	Transversión T por A
	167382	Delección de A
	167385	A por G (Transición)
Calo 21 004 Forward	178673 y 178683	Delección de A
Calo 21 004 Reverse.		No se observa ningún cambio o mutación puntual.
INBL 19 004 Forward	4	Transversión G por C
	51	Transversión G por C
	59	G por A (Transición)
INBL 19 004 Reverse	160791	Delección A
	160789	Delección T
	160721	Inserción A

	160639	Delección A
	160789	Transversión A por C
	160730	Transversión C por A
	160722 y 160723	Transversión A por T
INBL 21 004 Forward	178657, 178673 y 178683	Delección A
	178661 y 178662	Delección C
	178730	C por T (Transición)
INBL 21 004 Reverse	178914	Inserción de A

Cuadro 15: Se observan los cambios (mutaciones) en cada una de las muestras y en la posición donde se presentan.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los trabajos relacionados con la sobreexpresión de EGFR se han realizado en su mayoría en cáncer de pulmón y mama ⁽⁵⁵⁾, sin embargo, se ha descrito la sobreexpresión de EGFR en otros tipos de cáncer ^(55, 56). Investigaciones de nuestro equipo permitieron establecer la existencia de EGFR el cual se encuentra inactivo en las líneas de cáncer de cérvix CALO e INBL ⁽⁷⁰⁾.

Debido a que existe una relación entre la activación de EGFR y el desarrollo del cáncer metastásico ⁽⁴⁹⁾ nos dimos a la tarea de establecer si dicha desregulación se debía a la presencia de mutaciones del dominio tirosina cinasa de EGFR. ^(48, 49)

Se eligieron dos exones comprendidos dentro del dominio tirosina cinasa ya que dentro de estos se han descrito mutaciones significativas en cáncer de mama y pulmón ⁽⁴⁴⁾ por lo que decidimos probar si se presentaban en células de cáncer de cérvix. Por esta razón se diseñaron oligos que representan las secuencias de cinasa de tirosina y se analizó el alineamiento insilico en los datos reportados en la base de NCBI.

Posteriormente se buscaron las condiciones idóneas para la reacción de polimerasa en cadena. Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa para comprobar el tamaño y la integridad de los productos. Los productos de PCR verificados, se enviaron para la secuenciación y análisis bioinformáticos de los resultados.

Para analizar los datos obtenidos se compararon las secuencias de nuestras muestras con la secuencia reportada para EGFR en la base de datos de NCBI para buscar posibles mutaciones o la presencia de algún polimorfismo. De cada una de las muestras se obtuvieron las secuencias en donde se definieron los siguientes rubros de nuestro interés: Identidad (Identities) que mide el porcentaje de semejanza entre la secuencia obtenida de nuestra muestra (Query) y la que se encuentra en la base de datos de NCBI (Sbjct) y Gaps que se definen como un espacio dentro de la secuencia, ya sea en la muestra Query o en el Sbjct. Es por

estas dos variables que se puede observar los cambios presentes en las secuencias obtenidas (cuadro 15).

Se ha reportado que EGFR se encuentra sobreexpresado y activo constitutivamente en distintos tipos de cáncer ^(17, 47, 49), sin embargo, nuestro grupo de trabajo reportó particularmente en las líneas celulares CALO e INBL es que el EGFR se encuentra inactivo ⁽⁷⁰⁾.

Una posible explicación de la falta de fosforilación de la tirosina del EGFR en las líneas celulares CALO e INBL es la presencia de mutaciones. Las mutaciones que se encontraron en nuestras muestras corresponden a inserciones, deleciones o transversiones dentro de una región importante que comprende el sitio de unión del ATP ^(28, 29, 43, 44) el sitio de unión del sustrato y el asa de activación ^(26, 28, 45). Por lo que es posible que estas mutaciones puedan incidir en la inactivación del EGFR en estas líneas celulares.

Las características que muestra la proteína EGFR en las líneas celulares CALO e INBL muestran un comportamiento comparable con la proteína de la misma familia, HER 3, en cuyo caso carece de algunos residuos importantes para la catálisis en su dominio tirosina cinasa por lo que se encuentra inactivo, sin embargo, esta heterodimeriza con los otros miembros de la familia EGFR y mediante la interacción alostérica, HER 3 puede servir como activador de los otros miembros de la familia de receptores EGFR. ^(22, 29) Estas características de pseudocinasa al parecer son las que puede estar presentando EGFR en las líneas celulares estudiadas.

Se sabe de la existencia de mutaciones activadoras en la familia de receptores ErbB⁽²³⁾ que se encuentran localizadas a lo largo de los dominios que conforman al receptor, sin embargo, solo un número reducido de casos se han detectado en muestras de tumores. Las mutaciones encontradas en este proyecto no han sido reportadas anteriormente, por ende, el análisis más detallado podría ayudar a establecer de manera más óptima la asociación de las diferentes clases de mutaciones, la relación de estas con la presencia de tumores, el desarrollo de diferentes tipos de cáncer, la activación o inactivación de los receptores para establecer una terapia específica para cada paciente ^(37, 38, 39, 42).



Con los resultados obtenidos de este proyecto, nuestro grupo de trabajo encontró que estos cambios inciden en el dominio αC de la proteína y determinó el cambio de los aminoácidos que la componen. (A. Valle-Mendiola. Artículo enviado).

CONCLUSIONES

Con el objetivo establecido en este proyecto, se desarrollaron las condiciones óptimas para la obtención de productos de PCR para los exones 19 y 21 que nos permitieron identificar la presencia de mutaciones puntuales en todas las muestras, excepto en CALO 19 004 Reverse lo que podría derivar en la inactivación del dominio tirosina cinasa de la proteína EGFR en las líneas celulares CALO e INBL.

En la actualidad el cáncer de cérvix se ha convertido en un problema de salud pública importante, es por eso que la búsqueda de nuevas alternativas para el análisis del comportamiento celular y la transducción de señales ha sido una herramienta muy útil desarrollada en estos años. Muchos mecanismos son los que intervienen en la formación del cáncer, algunos de ellos son la sobreexpresión de los factores de crecimiento, su activación o presencia de mutaciones en sus dominios.

El análisis para determinar la presencia de mutaciones que puedan influir en el comportamiento de estos factores que conlleven a la activación de distintas cascadas de señalización y estas, a su vez, estén constantemente fosforiladas pueden generar malignidades en las células. Al activarse estos factores de crecimiento ocurre una fosforilación que desencadena cascadas de señalización.

Es necesario que se establezca la búsqueda de mejores alternativas seguras y eficientes para los estudios y el análisis de las vías de señalización de esta familia de proteínas.

PERSPECTIVAS

Buscar mutaciones en otros exones (18-21) mediante el diseño de nuevos primers.

Establecer de manera óptima la asociación de las diferentes clases de mutaciones, la relación de estas con la presencia de tumores y el desarrollo de diferentes tipos de cáncer; la activación o inactivación de los receptores para establecer una terapia específica para cada paciente.

Tratar de identificar las mutaciones reportadas como mutaciones inactivadoras del dominio tirosina cinasa del EGFR en líneas de carcinoma de cérvix CALO e INBL.

Determinar el cambio de los aminoácidos que componen a las mutaciones encontradas.

BIBLIOGRAFÍA.

1. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
2. Biología celular y molecular 2016 Lodish H. et. Al 7ª edición Medica Panamericana 2016 pp. 1113
3. Alonso P, Lozano E, Hernández M. Cáncer cérvico uterino. Diagnóstico, prevención y control. Edi Pan Mex 2000: 254
4. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dickshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide. IARC CancerBase 2016; 11
5. Forouzanfar MH, Foreman KJ, Delossantos AM, et al. Breast end cervical Cancer in 187 countries between 1980 and 2010: A sistematic analysis. Lancet 2011; 378:1461-1484.
6. Thomison J, Thomas LK, Shroyer KR. Human papillomavirus: Molecular and citologic/histologic aspects related to cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. Hum Pathol 2008; 39:154.
7. Crosbie EJ, Einstein MH, Franceschi S, Kitchener HC. Human papilomavirus and cervical cáncer. Lancet 2013; 382-889.
8. Hwang LY, Ma Y, Benningfield SM, et al. Factors that influence the rate of epithelial maturation in the cérvix in healthy young women. J adoles heal 2010; 44:103.
9. López-Saavedra, Lizano-Soberón. Cáncer cervicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina, 2006, Unid de Invest Biom en Cáncer. UNAM-INCAn.
10. Huh WK. Human papillomavirus infection: A concise review of Natural History. Obstetrics and gynecology 2009; 114:139-143
11. Schiffman M, Krüger Kjaer S. Natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia. JNCI monographs, 2003; 31:14-19.
12. Steenbergen RDN, de Wilde J, Wilting SM, Brink AATP, Snijders PJF, Meijer CJLM. HPV-mediated transformation of anogenital tract. J Clin Virol 2005; 32S.

13. Mc Murray HR, Nguyen D, Westbrook TF, McAnce DJ, Biology of human papillomaviruses. *Int J exp pathol* 2001; 82:15-33.
14. Von Knebel Doeberitz M. New markers for cervical displasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *Eur J Cancer* 2002; 38: 2229-2242.
15. Peter Thomsen, Bo van Deurs, Bodil Norrild and Lars Kayser; The HPV16 E5 oncogene inhibits endocytic trafficking. *Oncogene* 2000; 19:6023-6032
16. Jayshree RS, Sreenivas A, Tessy M, Krishna S. Cell intrinsic & extrinsic factors in cervical carcinogenesis. *J Med Res.* 2009; 13: 286-295.
17. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2010;141:1117-34.
18. Burgess A. EGFR family: Structure, physiology, signaling and therapeutics targets, *Growth Factors*, 2008; 26: 263-274.
19. Riese D, Gallo R, Settleman J. Mutational activation of ErbB family receptor tyrosine kinases: insights into mechanisms of signal transduction and tumorigenesis, *Bioessays* 2007; 29: 558-565.
20. www.cellsignaling.com
21. Roskoski R. The ErbB2/Her2 receptor protein-tyrosine kinases and cancer. *BBRC* 2004; 319:1-11
22. Shanon E, Telesco R. Atomistic insights into regulatory mechanisms of the Her2 tyrosine kinase domain: A molecular dynamics study. *Biophysical journal* 2009; 2321-2334
23. Wang E, Narasana A, Torres P, Xiang B, Wu F, Yang S, Carpenter G, Gazdarg F. HER2 kinase domain mutation results in constitutive phosphorylation and activation of Her2 and EGFR and resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Cancer cell* 2006; 10:25-38
24. Qing-Bai She, Chandralapaty S, Qing Ye, Lobo J, Haskell K, Leander K, DeFeo-Jones D, Huber H, Rosen N. Breast tumor cells with PI3K mutation or Her2 amplification and selectively addicted to act signaling. *Plos one* 2008; 3(8): 3065.

25. Mounawar M, Mukeira A, Le Calvez F, Hong J, Renard H, Patterns of EGFR, HER2, TP53 and KRAS mutations and relationship to smoking story. *Cancer Res* 2007; 67(12):5667-5672.
26. Castiglion F, Tagliabue E, Campiglio M, Pupa M, Balsari A. Roll of exón 16-deleted Her2 in breast carcinomas. *Endocr Relat cáncer* 2006;13: 221-232.
27. Huang Y, Li X, Jiang J, Frank S. Prolactine modulates phosphorylation signaling and trafficking of epidermal growth factor receptor in human T47D breast cells. *Oncogene* 2006; 25: 7565-7576.
28. Morrison C, Zanagnolo V, Ramirez N. Her2 is an independent prognostic factor in endometrial cáncer assosiation with outcome in a large cohort surgically staged patients. *J Clin oncol* 2006; 24:2376-2385.
29. Min Luo, Li Wu Fu; Redundant kinase activation and resistance of EGFR-tyrosine kinase inhibitors; *Cancer Res* 2014; 4(6): 608-628
30. Abba M, Mourón A, Güersi A. amplificación del proto-oncogen Her2/Neu, asociada a la infección por VHP de bajo riesgo, en citología exfoliativa cervical. *Rev Mex Patol Clin.* 2000:47(1):26-3.
31. Konecny G, Venkatesan N, Dering J, Ginther C, Finn R, Rahmed M. Activity of a novel Her2 and EGFR dual kinase inhibitor in human endometrial cáncer cell. *BJC* 2008; 98: 1076-1084.
32. Grushko J, Filiaci V, Mundt J, Riderstrale K, Olopade O, Fleming G. An exploratory analysis of Her2 amplification and overexpression in advanced endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 2008; 198:3-9.
33. Kim H, Chan R, Dankort D, Zuo D, Najoukas M, Park M, Muller J. The c-Src tyrosine cinase associates with the catalitic domain of ErbB2, implications for ErbB2 mediated signaling and transformation. *Oncogen* 2005; 24: 7599-7607.
34. Payne W, Holden A, Layfield J. detection of EGFR and Her2 activatin mutations in squamous cells carcinoma involving the head and neck. *Mod Pathol.* 2006; 19:634-640.

35. Normanno N, Bianco C, Strizzi L, Mancinno M, Maiello M, De Luca A. The ErbB receptors and their ligands in cáncer: An overview, current drug targets. 2005; 6: 634-640.
36. Burgess A, Cho H, Eigenbrot C, Ferguson K, Garret D, Sliwkowsky M, Ward W, Yocoyama S. An open and shut case? Recent insights into the activation of EGFR/ErbB receptors. *Mol Cell* 2003; 12: 541-552.
37. Karunagaran D, Azahar E, Beerli D, Chen X, Grass-Porta D, Ratzin B, Seger, Hynes E, Yarden. ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors; implications in breast cancer. *EMBO J* 1996; 15(2) 254-264.
38. Garret N, Mckern N, Lou M, Elleman T, Adams T, Lovrecz G, Zhu H, Walker F, Frenkel M, Hoyne P, Jorissen R, Nice E, Burgess A, Warf, Crystal structure of a troncated epidermal growth factor receptor extracellular domain. Bound to transforming growth factor-b *Cell* 2002; 110: 763-773.
39. Prenzel N, Zwick E, Leserer M, Ulrich A. Tyrosine kinase signaling in breast cancer. Epidermal growth factor receptor: Convergence point for signal integration and diversification. *Brast Cancer Res.* 2000; 2: 184-190.
40. Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2003; 103: 211-225.
41. Bryan T, Hennesy, Debra L. Smith, Prahlad T. Ram, Yiling Lu and Gordon B Mills. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug. *Nature Drug Discover* 2005; 4: 988-1004.
42. Ogiso H, Ishitani R, Nureki O, Fukai S, Yamakana M, Kim H, Saito K, Sakamoto A, Inoue M, Shirouzu M, Yokoyama J. Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell* 2002; 110: 775-787.
43. Soung Y, Lee J, Kim S, Wang P, Jo K, Somatic mutation of the ErbB4 kinase domain in human cancers. *International Journal of Cancer* 2006; 118:1426-1429.
44. Zheng J, Knighton D, Ten Eyck L, Karlsson R, Xuong N, Taylor S, Sowadsky J. Crystal Structure of catalytic subunit of c-AMP dependent protein kinase

- complexed with Mg-ATP and peptide inhibitor. *Biochemistry* 1993; 32: 2154-2161.
45. Cho HS, Mason K, Ramyar KX, Stanley AM, Gabelli SB, Denney Jr. DW, Leahy DJ. Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature* 2003; 421:756-760.
46. Red Brewer M, Yun CH, Lai D, Lemmon MA, Eck MJ, Pao W. Mechanism for activation of mutated epidermal growth factor receptor in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110: E3595-604.
47. Sordella R, Bell DW, Haber DA, Settleman J. Gefinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways. *Science* 2001; 305: 1163-1167.
48. Greulich H, Chen T-H, Feng W, Jänne PA, Alvarez JV, Zappaterra M, Bulmer SE, Frank DA, Hahn WC, Sellers WR, Meyerson M. Oncogenic transformation by inhibitor-sensitive and resistance EGFR mutants. *PLoS Med* 2005; 2, e 313: 1167-1176.
49. Mulloy R, Ferrand A, Kim Y, Sordella R, Pell DW, Haber DA, Anderson KS, Settleman J. Epidermal Growth Factor Receptor mutants from human lung cancers exhibit enhanced catalytic activity and increased sensitivity to gefinitib. *Cancer Res* 2007; 67:2325-2330.
50. Ji H, Li D, Chen L, Shimamura T, Kobayashi S, McNamara K, Mahmood U, Mitchell A, Sun Y, Al-Hashem R, et al. The impact of human EGFR kinase domain mutations on lung tumorigenesis and in-vivo sensitivity to EGFR targeted therapies. *Cancer cell* 2006; 9:485-495
51. Ji H, Yuza Y, Shimamura T, Li D, Protopopov A, Jung BL, McNamara K, Xia H, Glatt KA, et al. Epidermal Growth Factor Receptor variant III mutations in lung tumorigenesis and sensitivity to tyrosine kinase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:7817-7822.
52. Lee JC, Vivanco I, Beroukhi R, Huang JH, Feng WL, DeBiasi RM, Yoshimoto K, King JC, Nghiemphu P, et al. Epidermal growth factor receptor activation in glioblastoma through novel missense mutations in the extracellular domain. *PLoS Med* 2006; 3e: 485: 2264- 2273.

53. Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A. The Discovery of receptor tyrosine Kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev* 2004; 4:361-370.
54. Herbst RS, Shin DM. Monoclonal antibodies to target epidermal growth factor receptor-positive tumors: A new paradigm for Cancer therapy. *Cancer* 2002; 94: 1593-1611.
55. Ennis BW, Lippman ME, Dickson RB. The EGF receptor system as a target for antitumor therapy. *Cancer Invest* 1991; 9: 553- 562.
56. Ford AC, Grandis JR. Targeting epidermal growth factor receptor in head and neck cancer. *Head Neck* 2003; 25:67-73.
57. Scaltriti M, Baselga J. The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. *Clin Cancer Res* 2006; 12:5268-5272
58. Daaka Y, G proteins in cancer: the prostate cancer paradigm. *Sci STKE* 2004; 216.
59. Osborne CK, Wakeling AE, Ali S, Weiss H, et al. Mechanisms of tamoxifen resistance: increased estrogen receptor-HER2Neu cross-talk in ER/HER2 positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 926-935
60. Kuan CT, Wikstrand CJ, Bigner DD. EGF mutant receptor VIII as a molecular target in cancer therapy. *End Relat Cancer* 2001; 8: 83
61. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, et al. Activating mutations in epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non small cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004; 350: 2129-2139
62. Paez JG, Janne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, et al. EGFR mutations in lung cancer: Correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004; 304: 1497-1500.
63. Blencke S, Ullrich A, Daub H. Mutation of treonine 766 in the epidermal growth factor receptor reveals a hotspot for resistance formation against selective tyrosine kinase inhibitors. *J Biol Chem* 2003; 278: 15435-15440.
64. Vitoria-Petit A, Crombet T, Jothy S, Hicklin D, Bohlen P, Schlaeppli JM, et al. Acquired resistants to the antitumor effect of epidermal growth factor

- receptor-blocking antibodies in vivo. A role for altered tumor angiogenesis. *Cancer Res* 2001; 61: 5090-5101.
65. Liu Z, Li H, Derouet M, Filmus J, Lacasse EC, Korneluk RG, et al. Oncogen triggers up-regulation of cIAP 2 and XIAP in intestinal epithelial cells: epidermal growth factor receptor-dependent and independent mechanisms of ras-induced transformation. *J Biol Chem* 2005; 280: 37383- 37392.
66. Henson, E.S., & Gibson, S.B. Surviving cell death receptor 4 expression through epidermal growth factor (EGF) signal transduction pathways: implications for cancer therapy. *Cell Signal* 2006; 18: 2089-2097.
67. Espinosa – Asuar L: Guía práctica para la técnica de PCR., (2005); 517 – 525.
68. De Necochea R, Canul JC. Secuenciación de Ácidos Nucleicos. *Inst Biotec UNAM* 2004; 13-29.
69. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
70. Soto-Cruz I., Rangel-Corona R., Valle-Mendiola A., Moreno-Morales X., Santiago-Pérez R., Weiss-Steider B., Cáceres-Cortés J.R. (2008) The tyrophostin B42 inhibits cell proliferation and HER-2 autophosphorylation in cervical carcinoma cell lines. *Cancer Invest.* 26:136-144