

11261

22
25



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

“DETERMINAR ALTERACIONES EN LA EXPRESION Y EN EL GEN DEL RECEPTOR PARA EL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO EN LESIONES NEOPLASICAS DEL CERVIX UTERINO”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS
(B I O Q U I M I C A)**

P R E S E N T A :

BIOLOGA CATALINA TREJO BECERRIL

DIRIGIDA POR: DRA. MA. DE LOURDES GUTIERREZ XICOTENCATL

271883

MEXICO, D. F.

1999

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Este trabajo se llevó a cabo en los Laboratorios de la División de Investigación Básica del Instituto Nacional de Cancerología, SSA., y en el Laboratorio de Virus y Cáncer del CISEI del Instituto Nacional de Salud Pública, SSA., bajo la dirección de la Dra. Ma. de Lourdes Gutiérrez Xicotencatl.

La realización de este trabajo fue posible gracias al apoyo financiero recibido por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), proyectos F383-M9304 y M021-M9602; además, el tesista fue becario de dicha institución (número de registro 87864) durante el período de Enero de 1994 a Septiembre de 1995.

CON TODO MI AMOR Y CARIÑO:

A LOS DOS HOMBRES MAS IMPORTANTES Y VALIOSOS DE MI VIDA:

Enrique, mi gran amor; y David Zaid, mi pequeño hijo.

A MIS PADRES:

María y Pompeyo, quienes siempre han estado conmigo en todo momento y a los que debo lo que soy y seré.

A MIS HERMANOS:

Julián y Eloísa, que me han apoyado y ayudado siempre.

A TODOS MIS AMIGOS:

Por su amistad incondicional.

AGRADEZCO A LOS MIEMBROS DEL JURADO POR LA REVISION DE ESTA TESIS, YA QUE SUS ACERTADOS COMENTARIOS ENRIQUECIERON EL PRESENTE TRABAJO:

PRESIDENTE: DR. VICENTE MADRID MARINA

SECRETARIO: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALETA

**PRIMER VOCAL: DRA. MA. DE LOURDES GUTIERREZ
XICOTENCATL**

SUPLENTE: DR. MAURICIO SALCEDO VARGAS

SUPLENTE: DR. ALEJANDRO GARCIA CARRANCA

TAMBIEN AGRADEZCO A LOS MIEMBROS DEL COMITE TUTORIAL, POR SU INVALUABLE APOYO Y GUIA ACADEMICA DURANTE LA REALIZACION DE ESTE TRABAJO:

DRA. MA. DE LOURDES GUTIERREZ XICOTENCATL

DR. ADOLFO GARCIA SAINZ

DR. SAUL VILLA TREVIÑO

AGRADEZCO DE MANERA MUY ESPECIAL:

A LOURDES:

Ya que además de tus enseñanzas, tus consejos y apoyo académico para llevar a cabo este trabajo y sobre todo terminarlo; me brindaste tu amistad y confianza incondicionalmente.

A todas aquellas personas que de alguna forma colaboraron en la realización de este trabajo: Dr. Mauricio Salcedo Vargas; Q.F.B. Ernesto Alfaro Moreno; Dra. Claudia García Cuellar; M. en C. Jorge Meléndez Z.; Dr. Ricardo Delgado Chávez; Dr. Gilberto Solorza Luna; Dr. Leopoldo Vázquez Estrada y Biól. Humberto Valdovinos Torres.

AGRADEZCO:

A las autoridades del INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA y del HOSPITAL GENERAL "MANUEL GEA GONZALEZ".

A los Médicos Residentes, Adscritos y Sritas. Enfermeras del Servicio de Ginecología, de los anteriores centros hospitalarios.

Y a todas las Pacientes del Servicio de Ginecología.

A TODOS USTEDES NUEVAMENTE G R A C I A S.

INDICE

RESUMEN

ABSTRACT

Página

INTRODUCCION

I. Cáncer Cérvico Uterino: Aspectos Clínico Epidemiológicos	1
II. Papilomavirus Humano (HPV)	3
III. Cofactores Moleculares Importantes en el Desarrollo del CaCU	8
IV. El Factor de Crecimiento Epidérmico y su Receptor (EGF-R)	10
V. El Receptor para el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF-R) y su Papel en el Desarrollo del Cáncer	23

ANTECEDENTES	27
---------------------	----

HIPOTESIS Y OBJETIVOS	33
------------------------------	----

MATERIALES Y METODOS

Material Biológico y Características Clínicas	35
Inmunohistoquímica	36
Hibridación <i>IN SITU</i> para RNAm	38
Preparación de Membrana Celular y Separación en Geles de Acrilamida	39
Western Blot	40
Purificación de DNA Genómico e Hibridación Tipo Southern Blot	40
Extracción de DNA y Detección de Papilomavirus Humano (HPV) por PCR	41
Análisis Estadístico	42

RESULTADOS

A. Detección del EGF-R en Cérvix uterino no Neoplásico (CN) y en Cáncer Cérvico Uterino Invasor (CaCU), por Inmuno-histoquímica	43
B. Inmunoreactividad Diferencial del EGF-R en Cáncer Cérvico Uterino Invasor (CaCU)	49
C. Detección del EGF-R por Hibridación <i>IN SITU</i> , en Tejido No neoplásico de Cérvix Uterino y en CaCU	53
D. Análisis de los Subgrupos Encontrados en los Casos de CaCU de Acuerdo al Contenido de RNAm del EGF-R	58
E. Detección del EGF-R en Cérvix Uterino No Neoplásico y en Cáncer Cérvico Uterino Invasor por Western Blot	60
F. Detección de Alteraciones en el Gen del EGF-R por Southern Blot en Cérvix Uterino No Neoplásico y en Cáncer Cérvico Uterino Invasor	63
G. Tipificación de Papilomavirus Humano (HPV) en Tejido de CN y en CaCU por Medio de Amplificación por PCR	65

DISCUSION	67
------------------	----

CONCLUSIONES	79
---------------------	----

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	80
-----------------------------------	----

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

		Página
FIGURAS		
FIGURA 1	Mapa Genómico de HPV	4
FIGURA 2	Interacciones Celulares	11
FIGURA 3	Estructura del EGF-R	15
FIGURA 4	Transducción de Señales del EGF-R	20
FIGURA 5	Ciclo Celular y Factores de Crecimiento	22
FIGURA 6	Inmunohistoquímica para el EGF-R en Placenta y Músculo	37
FIGURA 7	Inmunohistoquímica para el EGF-R en CN	45
FIGURA 8	Inmunohistoquímica para el EGF-R en CaCU	46
FIGURA 9	Inmunohistoquímica Diferencial para el EGF-R con 2 Anticuerpos en CaCU	50
FIGURA 10	Expresión de RNAm del EGF-R en CN	54
FIGURA 11	Expresión de RNAm del EGF-R en CaCU	55
FIGURA 12	Curvas que muestran el contenido de RNAm del EGF-R en CN y CaCU	57
FIGURA 13	Western blot para el EGF-R en CN y CaCU	62
FIGURA 14	Southern blot para el EGF-R en CN y CaCU	64
TABLAS		
TABLA 1	Inmunohistoquímica para el EGF-R en CN y CaCU	48
TABLA 2	Inmunohistoquímica Diferencial para el EGF-R con 2 Anticuerpos en CaCU	52
TABLA 3	Contenido de RNAm del EGF-R en CN y CaCU	59
TABLA 4	Tipificación de HPV en CN y CaCU	66

RESUMEN

Diversos elementos epidemiológicos, moleculares y virales, se han asociado al desarrollo del Cáncer Cérvico Uterino (CaCU); en donde además elementos celulares como el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) y su receptor (EGF-R), también se han adicionado a éstos factores etiológicos. Hasta ahora, se tienen reportes controversiales en relación al EGF así como de su receptor y su importancia como factor diagnóstico y/o pronóstico en el CaCU. Con la finalidad de elucidar el papel biológico y posiblemente clínico del EGF-R en el CaCU, nosotros analizamos 22 muestras de tejido de pacientes con CaCU y 20 muestras control de tejido de cérvix uterino no neoplásico (CN), para identificar posibles alteraciones en el gen del EGF-R, así como en su transcrito. Nuestros resultados mostraron diferencias entre los tejidos de CN y los de CaCU tanto en la expresión del RNAm del EGF-R (por Hibridación *IN SITU*), en donde el 43% de los casos de CaCU expresaron RNAm entre 100 y hasta 300% en mayor proporción, que en los tejidos control. En lo que respecta al gen que codifica para dicho receptor, se observó amplificación (por Southern blot) en el 70% de los casos analizados de CaCU. Al revisar los niveles de proteína para el EGF-R por Western blot, se detectó que sólo el 25% de los tejidos de CaCU mostró sobre-expresión del receptor; lo cual resultó contradictorio con los datos anteriores. En general, nuestros resultados sugieren que el EGF-R está amplificado a nivel de gen y transcrito en los tejidos estudiados de CaCU y que los bajos niveles de proteína receptora encontrada en éstos, pueda ser el resultado de una estimulación de tipo intrácrina por la presencia de EGF y de Factor de Crecimiento Transformante alfa (TGF- α) expresados en células tumorales, como ya ha sido descrito antes. Es posible que las discrepancias en cuanto al significado pronóstico del EGF-R en CaCU hasta el momento, se deba a que la mayoría de los estudios realizados, se basan en el análisis de la proteína receptora y no en el análisis del gen ó del transcrito que en el caso de CaCU parecen ser los parámetros más importantes a medir.

ABSTRACT

Several epidemiological, molecular and viral factors have been implicated in the development of cervical cancer, although cellular as the epidermal growth factor and his receptor (EGF and EGF-R, respectively), have also been associated as important factors in the etiologic of this disease. Nowadays, cervical cancer studies have shown controversial results regarding the extent of EGF-R expression and its clinical significance. To determine the biological and clinical role of the EGF-R in the development of cervical cancer, we analyzed 22 biopsies from cervical cancer patients and 20 biopsies from women without cervical cancer lesion. In these tissues we look for the EGF-R protein by immunohistochemistry and Western blot, the mRNA of the receptor was identify by In Situ Hibridization and alterations in the gene were recognized by Souther blot. Our results from In Situ Hibridization showed that 43% of cervical cancer patients have elevated levels of mRNA for EGF-R (100-300%) that normal individuals. We also showed that 70% of cervical cancer patients have amplified the EGF receptor gene. When we look for the EGF-R protein levels by Western blot analysis, we found that only 25% of cervical cancer patients showed overexpression of the EGF-R protein, and the rest (75%) presented lower levels of the receptor protein than the normal population tested. All together, our data suggest that the EGF-R is amplified at the RNA and DNA levels in cervical cancer patients and that low levels of EGF-R protein found in the cancer patients, may be the result of intracine stimulation by EGF and transforming growth factor alpha (TGF- α). It is very well documented that EGF and TGF-a are two factors that are produce in tumor cells, and this could explain the low levels of the EGF-R at the protein level. It is possible that the contradictory results of the EGF-R, as prognostic factor in cervical cancer patients could be the result of looking at the protein level and not more closely to the gene and to the mRNA of the receptor, which are the two parameters that we identified as importantly to be measured in the cancer from the uterine cervix.

INTRODUCCION

I. CANCER CERVICO UTERINO: Aspectos clínico epidemiológicos

El Cáncer Cérvico-Uterino (CaCU), ocupa el segundo lugar como causa de muerte por neoplasias en mujeres, después del cáncer de mama a nivel mundial; por lo que es considerado como un problema serio de salud pública (Rorke, 1997). Cerca del 80% de casos de CaCU detectados anualmente en el mundo, provienen de países subdesarrollados (Muñoz, *et al.*, 1997; zurHausen, 1996). Sin embargo, en México el CaCU es la primera causa de muerte por neoplasias, constituyendo el 35% de los tumores malignos en la mujer, siendo ésta la enfermedad neoplásica más frecuente en mujeres de entre los 35 a 59 años de edad (Lazcano, *et al.*, 1995). En el último año el Instituto Nacional de Cancerología, registró 5000 defunciones causadas por CaCU (Lazcano, *et al.*, 1995; Secretaría de Salud, 1997; Mohar, *et al.*, 1998).

En el cérvix uterino, un crecimiento neoplásico se inicia con un crecimiento anormal en el epitelio, como puede ser la neoplasia intraepitelial cervical (NIC), la cual puede evolucionar y terminar en un crecimiento anormal invasivo, como es el caso del carcinoma cervical invasor (Stehman, 1994). Las lesiones tipo NIC se caracterizan por una proliferación y maduración celular anormal confinada únicamente al epitelio, así como la presencia de núcleos atípicos. Este tipo de lesiones cervicales, se clasifican en NIC I, II y III, de acuerdo a la cantidad de epitelio que haya sido invadido por una población celular proliferativa e inmadura anormal. Hay dos categorías histológicas de NIC: la escamosa ó epidermoide y la glandular; siendo la primera la más común (Hatch, 1994; DeVita, 1997). Algunas lesiones NIC,

regresan o permanecen sin cambios durante toda la vida de la paciente; y sólo un pequeño porcentaje progresa hacia carcinoma invasor. El tiempo de evolución de las lesiones que progresan, es muy variable pero generalmente va de entre 10 a 20 años (DeVita, 1997; Secretaría de Salud, 1997).

En el carcinoma cervical invasor, el crecimiento y maduración celular anormal atraviesa la membrana basal del epitelio e invade el tejido subyacente. Dentro del CaCU invasor hay varios tipos histopatológicos, destacando los más frecuentes como: a) el carcinoma escamoso ó epidermoide, cuyos subtipos son el queratinizante y el no queratinizante, entre otros; b) el adenocarcinoma; c) el adenoescamoso; d) el de células pequeñas; y e) el indiferenciado (Stehman, 1994; DeVita, 1997). Además, el CaCU invasor se clasifica clínicamente en Etapas de la I a la IV, de acuerdo al grado de invasión a órganos subyacentes (Stehman, 1994). A nivel pronóstico, las pacientes con CaCU epidermoide invasor tienen una mejor supervivencia a 5 años que las que presentan un adenocarcinoma ó un adenoescamoso ó uno de células pequeñas (DeVita, 1997; Secretaría de Salud, 1997).

Investigaciones recientes a nivel epidemiológico y de tipo clínico han sugerido que el riesgo de padecer CaCU es más frecuente en mujeres con un nivel socioeconómico bajo, que inician actividad sexual o se embarazan a temprana edad, con múltiples parejas sexuales, multíparas, que han tenido numerosos abortos ó bien que usen anticonceptivos de tipo oral (Secretaría de Salud, 1997; DeVita, 1997). Más recientemente se ha demostrado que agentes virales (transmitidos sexualmente), pueden ser factores etiológicos importantes en el desarrollo del CaCU, como son el virus del Herpes Simple tipo II, el virus del Epstein-Barr y más recientemente el Papilomavirus Humano (HPV) (zurHausen, 1991; DeVita, 1997).

II. Papilomavirus Humano (HPV)

En los últimos años, se ha incrementado la evidencia que demuestra que la infección del cérvix por HPV, está involucrada en más del 85% de los casos de CaCU, lo cual se ha sugerido, a partir del aislamiento del DNA de HPV de pacientes con éste tipo de neoplasia (Giri, *et al.*, 1986; Rorke, 1997). La aplicación de nuevas técnicas de ingeniería genética y de biología molecular, tales como la clonación génica y la hibridación del DNA, han permitido aislar e identificar a más de 80 diferentes tipos de HPV (Münger, 1995); de los cuales sólo 30 tipos han sido asociados con lesiones del tracto genital (zur Hausen, 1996). Dentro de estos 30 tipos de HPVs, hay 2 grupos: los de bajo riesgo como HPV 6 y 11, que se encuentran frecuentemente en verrugas genitales ó condilomas, y que muy rara vez progresan a neoplasia. Los HPV de alto riesgo como los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52 y 56, que se asocian con NICs y que a su vez, pueden progresar a cáncer invasor (De Villiers, 1989; Münger, 1995; zur Hausen, 1996). El tipo más frecuente de HPV a nivel mundial es el tipo 16; el cual se ha detectado en el 50% de los casos de NIC y lesiones invasoras del cérvix; le siguen el HPV 18 con el 12%, el HPV 45 con el 8% y el HPV 31 con el 5% (Muñoz, *et al.*, 1997).

Los HPV's son pequeños virus de DNA epiteliotrópicos, circular de doble cadena, cuyo genoma tiene aproximadamente 8 Kb. En éstos, se han identificado marcos de lectura abierta (ORF) organizados en regiones de expresión temprana (E, del inglés "early") y tardía (L, del inglés "late"), en el ciclo de vida viral. Las primeras codifican para proteínas relacionadas con la replicación (E1), transcripción (E2), transformación celular (E6, E7 y más recientemente E5); en tanto que los segundos codifican para proteínas de la cápside viral (L1 y L2) [FIGURA 1]. Además, el genoma contiene una región larga de control (LCR) de aproximadamente 1 Kb, en la que se

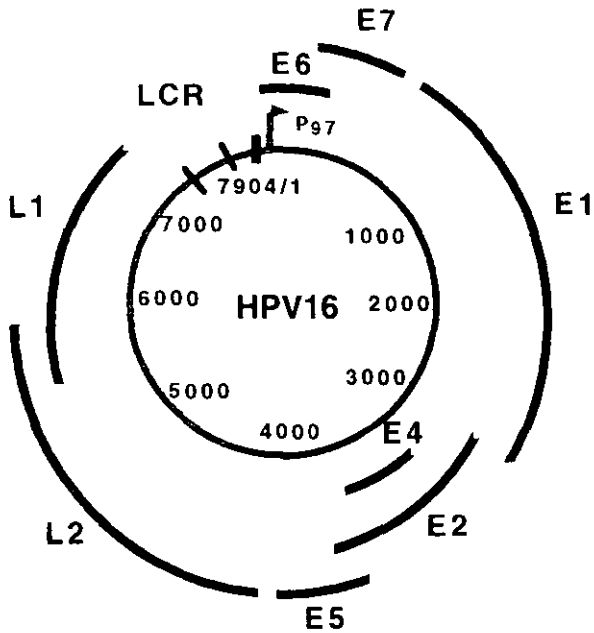


FIGURA 1. Mapa genómico de HPV 16, deducido de la secuencia de DNA. El número de nucleótidos está escrito dentro del círculo. La transcripción inicia en el sentido de las manecillas del reloj. La región control se denomina LCR, la región temprana está constituida por los genes E1 a E7 y la región tardía por los genes L1 y L2. (Tomado de Münger, K., *et al.*, 1992).

han identificado secuencias estimuladoras y represoras de la transcripción viral, así como el origen de replicación (Gariglio, 1993; zur Hausen, 1991; zur Hausen, 1996).

El mecanismo de acción de los HPVs, es el de infectar células normales de tipo basal ó germinal del epitelio, alterar el control de la maquinaria celular para utilizarla para su propia replicación y transcripción. La replicación y transcripción viral se mantiene en muy bajos niveles hasta que alcanza los estratos superiores del epitelio. En éste estrato epitelial y tal vez en respuesta a señales de diferenciación específica, la transcripción viral se acelera, la síntesis del DNA viral se inicia y los viriones se congregan. En éste medio ambiente de diferenciación celular, los virus pueden reclutar los factores celulares necesarios para su reproducción (Mansur, *et al.*, 1993; Münger, 1995). Por otra parte, se ha demostrado experimentalmente que el DNA viral en lesiones benignas ó premalignas (NICs), existe extra-cromosomalmente como un plásmido; mientras que en lesiones malignas ó invasoras y líneas celulares de CaCU, el DNA viral está integrado en el genoma celular en copias múltiples ó simples. La integración ocurre con la ruptura ó delección de los genes E1 ó E2 y preservación de los genes E6 y E7 (Münger, 1995).

Específicamente, la proteína E6 de HPVs de alto riesgo, tiene numerosas propiedades biológicas; como cooperar con la proteína E7 en la inmortalización de queratinocitos primarios humanos; regular la expresión de genes celulares, por medio de transactivación de éstos. También E6 ejerce su actividad biológica, a través de la interacción con p53; provocando su degradación. La ausencia de p53 en el sistema conduce al bloqueo de su actividad como activador transcripcional y como factor importante en el arresto del crecimiento celular cuando existe daño del DNA, lo que conlleva a una inestabilidad genómica (zur Hausen, 1991; Mansur, *et al.*, 1993; Münger, 1995; zur Hausen, 1996).

Por su parte, la proteína E7 ejerce su efecto de desregulación del crecimiento celular, al unirse al gen pRb en su forma fosforilada con la consecuente liberación del factor transcripcional E2F. Además, E7 conduce a la immortalización celular en presencia de E6; pero requiere de la cooperación de otros oncogenes para inducir transformación maligna completa (Mansur, *et al.*, 1993). También induce síntesis de DNA en células quiescentes; tiene propiedades transcripcionales, para lo cual se cree que es esencial su unión con pRb; induce anormalidades cromosómicas como aneuploidías, así como inestabilidad cromosómica; activa el promotor de la ciclina A; forma complejos con factores transcripcionales como *c-jun*, *jun-B*, *jun-D* y *c-fos*; y, además, se une a otras proteínas de la familia de pRb como p107, p130; con proteínas cinasas como p33cdk2 y con ciclina A (zur Hausen, 1991; Mansur, *et al.*, 1993; Münger, 1995; zur Hausen, 1996).

El producto del gen E5 se localiza en membrana plasmática y en membrana del Aparato de Golgi; y puede ser encontrado como homodímero. La proteína oncogénica E5, tiene diversas propiedades biológicas; como su capacidad de transformación tumorigénica de queratinocitos de ratón; su capacidad de inducir a fibroblastos de ratón a crecer en agar y estimular el crecimiento de células epiteliales primarias de hígado de ratón, en cooperación con la proteína E7 de HPV 16. El impacto biológico de E5 en la progresión maligna, parece presentarse en las etapas tempranas de la infección viral, ya que al parecer el gen E5 frecuentemente se pierde en los estadios tardíos del cáncer; aunque las lesiones de tipo NICs, contienen relativamente grandes cantidades de RNAm y proteína de E5 (Münger, 1995). La presencia de E5 en etapas tempranas de la infección viral, tal vez sea importante para establecer un medio ambiente celular apropiado para que se lleve a cabo la función de los otros oncogenes tempranos (E6 y E7) (Mansur, 1993). Otras propiedades biológicas de E5 son inducir síntesis de DNA; formar complejos con ciertas proteínas

celulares como con la proteína de 16 kDa de la ATPasa. También se ha observado en el caso de Papilomavirus Bovino (BPV), que la proteína E5 es capaz de regular la actividad del receptor β del PDGF, y del receptor del CSF-1 (Martín, *et al.*, 1989). Además, la proteína E5 tiene capacidad transformante, la cual se ha determinado a partir de observaciones realizadas en células NIH/3T3 transfectadas con EGF-R y E5; en donde, al adicionarles EGF exógeno, experimentan un incremento en transformación. Adicionalmente, en estas células transformadas, el EGF-R se encuentra fosforilado ó activo continuamente en la superficie celular (anormalidad que se le atribuye a E5), aún en ausencia de EGF. Además la vida media del receptor se ve incrementada, lo que conlleva a una continúa estimulación de la síntesis de DNA, así como un aumento en los niveles de expresión de ciertos genes como *c-fos* (Banks, *et al.*, 1993; Cohen, *et al.*, 1993; Mansur, *et al.*, 1993; zur Hausen, 1996).

A pesar de que el HPV inmortaliza células como ya se ha explicado ampliamente, éstas no forman tumores en ratones desnudos ó no tienen la eficiencia para crecer en agar suave (Rorke, 1997). Además, existe una pequeña proporción de carcinomas cervicales, que no contienen secuencias detectables de HPV; lo que sugiere, que existen otros factores como mutágenos, hormonas, co-infecciones y deficiencias inmunes; que están implicados en el proceso tumorigénico del CaCU. También es posible que existan otros genes celulares que puedan ser responsables de la iniciación y mantenimiento del fenotipo maligno en estos casos de CaCU. Más aún, hay evidencias claras de que la progresión de las lesiones pre-malignas del cérvix uterino hacia la tumorigenicidad, requiere de numerosos cambios genéticos adicionales de los que probablemente sólo unos pocos son eventos moleculares críticos para la progresión de la enfermedad (Weinberg, 1989). Mutaciones puntuales del oncogén *c-ras*; la amplificación y/o rearreglos del oncogén *c-myc*; la amplificación y/o sobre-expresión del oncogén *c-erbB-2/Neu*; mutaciones en anti-oncogenes o

genes supresores de tumor como *p53* y *pRb*; pueden representar algunos de los eventos moleculares críticos para el desarrollo del CaCU (Oka, *et al.*, 1994; Münger, 1995; Rorke, 1997).

III. Cofactores Moleculares Importantes en el Desarrollo del CaCU

Tres son los proto-oncogenes, *c-myc*, *c-ras* y *c-erbB-2/Neu* y dos los genes supresores de tumores, *p53* y *pRb*, los candidatos más probablemente implicados en el desarrollo del CaCU, ya que se han detectado alteraciones de algunos de estos genes en este tipo de neoplasia. Por ejemplo, en el caso del oncogén *c-myc*, se ha reportado que se sobre-expresa más frecuentemente en CaCU de estadios avanzados que en etapas clínicas tempranas; por lo que se sugiere que puede ser de gran utilidad como factor pronóstico de la enfermedad (Tanimoto, *et al.*, 1992). Además, se ha propuesto que *c-myc* tiene un papel importante en el desarrollo del CaCU, ya que se han detectado amplificación y/o rearreglos de éste oncogén en el 90% de las biopsias analizadas de CaCU (Ocadiz, *et al.*, 1987). Por su parte, Riou, *et al.* (1988), reportó que el 35% de pacientes con CaCU epidermoide, mostraron sobre-expresión de *c-myc* y éstos pacientes a su vez tuvieron 8 veces más incidencia de recaída que el resto de las pacientes. Las alteraciones más frecuentemente reportadas para el oncogén *c-ras*, son las mutaciones puntuales. Tal es el caso de *H-ras*, uno de los tres miembros de la familia *ras*, cuyas mutaciones puntuales en el codón 12, fueron encontradas en el 20-30% de las pacientes con CaCU y con etapa clínica III y IV (Riou, *et al.*, 1988). También, en diversos estudios de neoplasias cervicales, se han reportado mutaciones puntuales en los codones 12, 13 y 61, del gen *K-ras* (Bos, 1989; Enomoto, *et al.*, 1990; Willis, *et al.*, 1993). Investigaciones recientes, han demostrado que más del 20% de las pacientes con adenocarcinoma cervical, presentan mutaciones de *K-ras* predominantemente en el codon 12 (Tenti, *et al.*, 1995); y en tumores con HPV positivo (Parker, *et al.*, 1997).

Por otra parte, en estudios recientes el oncogén *c-erbB-2/Neu* que codifica una oncoproteína con estructura similar a la del EGF-R, se ha correlacionado con el CaCU debido a la presencia de la proteína en estados avanzados del cáncer. Así, la expresión de la oncoproteína *c-erbB-2*, se ha asociado con un pobre pronóstico de pacientes con etapa clínica III de CaCU epidermoide (Oka, *et al.*, 1994). También se ha reportado, que además de la expresión de la oncoproteína *c-erbB-2*, se presenta la amplificación de su gen en el 77% de los casos analizados de adenocarcinoma cervical; lo cual también correlacionó con un pobre pronóstico de las pacientes (Kihana, *et al.*, 1994). A partir de estos resultados se pudo concluir, que la amplificación y/o rearrreglos de *c-myc*, mutaciones en *c-ras* y amplificación y/o sobre-expresión de *c-erbB-2*; son alteraciones moleculares que pueden estar implicadas con un pobre pronóstico, recaídas tempranas o con tumores más agresivos del cérvix uterino en las pacientes que presenten alteraciones en cualquiera de estos genes celulares.

Con respecto a posibles alteraciones en los genes supresores, como *p53* y *pRb* en carcinomas del cérvix uterino; es aún controversial, su papel en el desarrollo de éste tipo de neoplasia. Sin embargo, se ha observado que en adenocarcinomas cervicales, cuando *p53* se encuentra sobre-expresado en las etapas avanzadas del tumor, éstos generalmente son negativos para DNA de HPV (Parker, *et al.*, 1997); mientras que en carcinomas epidermoides del cérvix, la sobre-expresión de *p53* es menor (Holm, *et al.*, 1993; Busby-Earle, *et al.*, 1994).

En los últimos años se han adicionado, además de los factores epidemiológicos, virales y moleculares ya revisados con detalle en las secciones anteriores; otros elementos celulares que pueden ser críticos en el desarrollo del CaCU, debido a que

son factores fundamentales en los mecanismos de proliferación y diferenciación celular; éstos son los Sistemas de Factores de Crecimiento y sus Receptores (Rorke, 1997).

IV. El Factor de Crecimiento Epidérmico y su Receptor (EGFR)

Los Factores de Crecimiento Polipeptídicos (Growth Factor -GF-), son moléculas que tienen un papel crítico en los mecanismos de estimulación proliferativa de las células y en el mantenimiento de su viabilidad. También tienen una función preponderante en la diferenciación; desarrollo; quimiotáxis y activación de células inflamatorias; reparación tisular y en cierto tipo de enfermedades (Deuel, 1987). Los GF, son sintetizados y secretados por determinados tipos celulares y se encuentran distribuidos en todos los tejidos del cuerpo; además, de que son producidos tanto por células normales como transformadas. Funcionalmente, los GF operan sobre un sitio blanco específico, ya sea de una manera parácrina, autócrina, juxtácrina (en la que no está involucrado un GF soluble), o bien de una forma intrácrina (en donde el GF y su receptor son producidos y se unen intracelularmente) [FIGURA 2] (DeVita, 1997; Massagué & Pandiella, 1993).

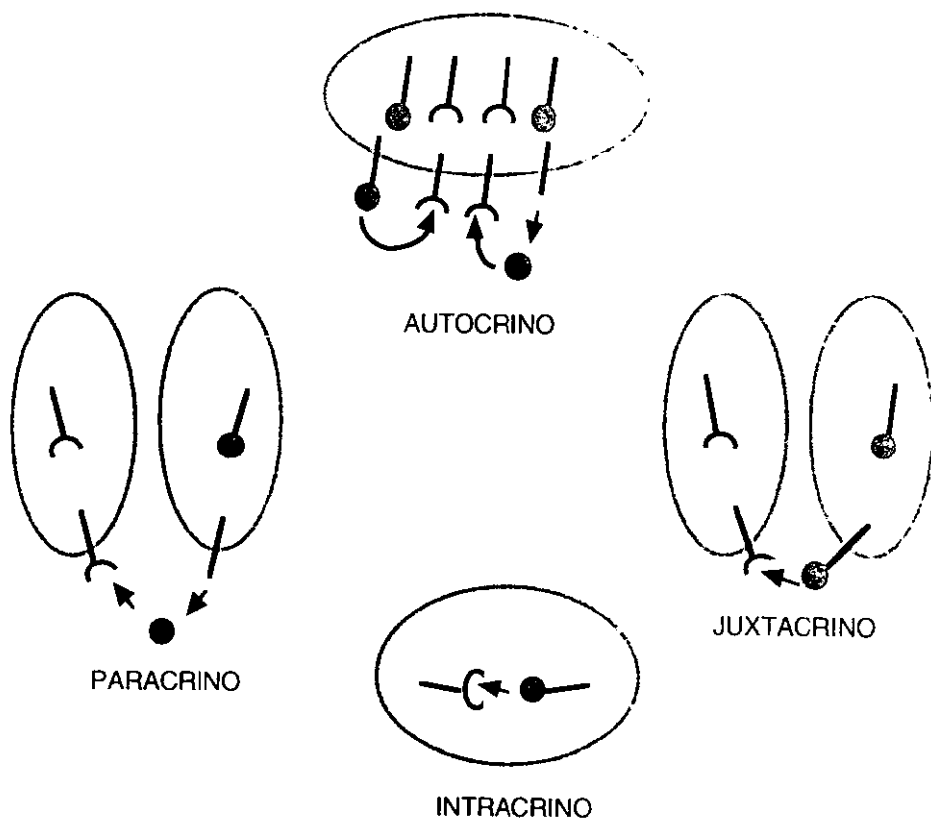


FIGURA 2. Interacciones entre las células que producen Factores de Crecimiento y sus Receptores.

Precursor del Factor de Crecimiento: ●—
 Factor de Crecimiento Soluble en el Espacio Extracelular: ○
 Receptor: —C

(Tomado de DeVita, *et al.*, 1997).

Un gran grupo de GF no soluble ó anclados a membrana, es al que pertenece la familia del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF); el cual es el mejor caracterizado (Laurence, *et al.*, 1990, Voldborg, *et al.*, 1997). En esta familia de GFs se incluye el Factor de Crecimiento Transformante-alfa (TGF- α), la Amfiregulina (AR), el Factor de Crecimiento Derivado de Schwannoma (SDGF), el Factor de Crecimiento parecido al Epidérmico que se une a Heparina (HB-EGF), el Factor de Diferenciación neu (NDF) ó Heregulina, la Betacelulina y la Cripto (Carpenter, *et al.*, 1990; Massagué & Pandiella, 1993); siendo característica de ésta familia de GF, la presencia de una o varias unidades estructurales de EGF en su dominio extracelular. El EGF maduro, es una cadena polipeptídica sencilla de 53 residuos de aminoácidos, con un peso molecular de 6 kDa y con 3 uniones disulfuro (Laurence, *et al.*, 1990). Se ha demostrado que el EGF es un modulador positivo y negativo de la proliferación de células epiteliales y fibroblastos, además de influir en la diferenciación celular de las mismas (Carpenter, *et al.*, 1990; Laurence, *et al.*, 1990). Como modulador positivo, es mitogénico ya que activa la síntesis de DNA, así como cambios comúnmente asociados con la división celular, como el incremento en los niveles de la ornitina descarboxilasa y los productos de los genes *c-jun* y *c-fos* (Massagué & Pandiella, 1993).

Otro de los GFs mejor estudiados dentro de la familia del EGF, es el TGF- α , el cual es producido por varias líneas celulares tumorales y por células transformadas por retrovirus y oncogenes (Goustin, *et al.*, 1986; Stoscheck, *et al.*, 1986; Derynck, 1988; Massagué, 1990). El TGF- α maduro, es un péptido de 50 aminoácidos que tiene el 33% de homología con el EGF y se une con indistinguible afinidad al receptor para EGF, en la mayoría de los tejidos que han sido examinados. Sin embargo, la liberación del receptor en el medio ácido de los endosomas es más rápida con TGF- α que con EGF; siendo además, el TGF- α más potente que el EGF en la activación de la angiogénesis (Derynck, 1988; Castellani, *et al.*, 1994; DeVita, 1997).

El EGF y algunos otros Factores de Crecimiento relacionados con el EGF, como el TGF- α , actúan a través del receptor para EGF (Carpenter, 1987; Waterfield, 1989). El EGF-R, proviene de una subfamilia de receptores que son homólogos entre sí por sus características estructurales y por secuencias homólogas en el dominio catalítico. Esta subfamilia además de contener al EGF-R también llamado HER ó erbB; incluye al erbB2/HER2/neu, al erbB3/HER3 y al erbB4/Tyro2 (Eccles, *et al.*, 1994).

El EGF-R se ha aislado en forma activa o parcialmente activa, de hígado de ratón, de placenta humana (Ullrich, *et al.*, 1990) y se ha localizado en diferentes tejidos humanos de origen epitelial y en tipos celulares mesenquimatosos (Gusterson, 1984; Damjanov, *et al.*, 1986). De la información obtenida de estos trabajos, se ha descrito que a nivel genético y molecular, el gen del EGF-R, se localiza en el brazo corto del cromosoma 7, en el locus p14-q12 (Kageyama, *et al.*, 1988; Oberg, 1990; Carpenter, *et al.*, 1991). El gen del receptor consta de 26 exones con algunos intrones muy grandes. Su promotor carece de caja TATA y caja CAAT, pero contiene múltiples cajas GC así como varios sitios de inicio transcripcional (Kageyama, *et al.*, 1988). También en la región promotora, hay 8 sitios de unión de proteínas nucleares (como el factor transcripcional Sp1, el cual se ha demostrado que incrementa la eficiencia en la transcripción del gen EGF-R), incluyendo a las cajas GC. Finalmente, las células que expresan EGF-R, transcriben dos especies de RNAm, uno de 10.5 Kb y otro de 5.8 Kb que hibridan con sondas de cDNA del receptor (Kageyama, *et al.*, 1988; Oberg, 1990).

A nivel bioquímico el pro-EGF-R, está precedido en el extremo NH2 terminal, por un péptido señal de 24 aminoácidos hidrofóbicos, el cual es cortado después de la inserción del receptor nascente en la membrana del retículo endoplásmico. Posteriormente, el EGF-R es glicosilado y transportado a través del aparato de Golgi hacia la membrana plasmática. Además, el EGF-R maduro se ha descrito como una

cadena polipeptídica sencilla de 1,186 residuos de aminoácidos con un peso molecular de 170 kDa (Carpenter, *et al.*, 1990; Oberg, 1990). Estructuralmente, el EGFR se divide en tres dominios que son el dominio extracelular, transmembranal y citoplásmico [FIGURA 3] (Carpenter, 1987; Carpenter, *et al.*, 1990; Voldborg, *et al.*, 1997):

A) Dominio Extracelular: Este dominio se caracteriza por su capacidad de unir al EGF y a otros 5 ligandos parecidos a éste ya anteriormente mencionados (TGF- α , AR, Cripto, Betacelulina, HB-EGF, SDGF y NDF); asimismo contiene la región NH₂ terminal la cual se puede dividir en 4 subdominios, siendo el subdominio III el responsable de unir al ligando. Estudios con EGF marcado con ¹²⁵I han demostrado que la interacción del EGF con su receptor exhiben dos estados de afinidad distintos; por un lado tenemos que, aproximadamente 10% de la población total de EGF-R tienen una constante de afinidad (Kd) de 3X10⁻¹⁰ M (receptores con alta afinidad); mientras que el resto de receptores (90%), tienen una Kd de 2X10⁻⁹ M (receptores de baja afinidad) (Carpenter, 1987). Este dominio extracelular, está constituido por 621 aminoácidos y está glicosilado en 10 u 11 residuos de asparagina. Esta glicosilación constituye aproximadamente el 40% de la masa del dominio externo, lo que puede contribuir a la extrema resistencia del EGF-R a la acción de proteasas. Además, tiene 51 residuos de cisteína, lo cual constituye un alto contenido de ésta molécula (aproximadamente 10%) en el receptor. Estos residuos están preferencialmente dispersos en 2 regiones y que tal vez tengan un papel importante en la resistencia del EGF-R hacia las proteasas (Carpenter, *et al.*, 1990).

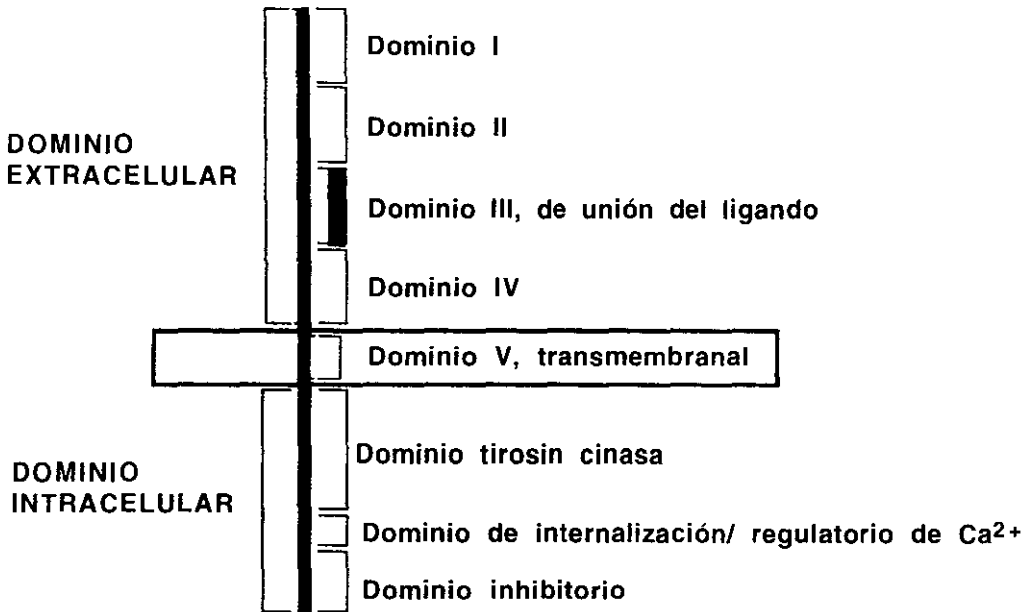


FIGURA 3. Estructura esquemática del EGF-R, con los dominios extra e intracelular.
(Tomado de Voldborg, *et al.*, 1997).

B) Dominio Transmembranal: El dominio transmembranal consta de 23 aminoácidos hidrofóbicos y parece no tener influencia en las señales de transducción a través de la membrana, pero sí importancia en el anclaje del receptor a ésta (Carpenter, *et al.*, 1991).

C) Dominio Citoplasmático: Este dominio se caracteriza por su actividad funcional intrínseca de tirosina cinasa, la cual es responsable de la transducción intracelular y amplificación de las señales extracelulares iniciadas por la interacción del EGF con el receptor (Fantl, *et al.*, 1993). Este dominio está compuesto de 542 aminoácidos; de éstos, una región de aproximadamente 300 residuos es homóloga al dominio catalítico de la proteína tirosina cinasa codificada por el gen *src*. Además, contiene un sitio de unión para ATP en el residuo de Lisina 721 y en el extremo carboxilo terminal contiene 5 sitios de autofosforilación que corresponden a los residuos de tirosina 992, 1068, 1148, 1173 y 1186 (Ullrich, *et al.*, 1990). La función más importante del EGF-R, es la de mediar la transmisión intracelular y amplificación de las señales extracelulares iniciadas por la unión del EGF en la superficie celular; esta función del EGF-R, es la llamada Transducción de Señales (Oberberg, 1990). La serie de eventos que conlleva a la transducción de señales, se resume a continuación (Fantl, *et al.*, 1993; Voldborg, *et al.*, 1997):

1. La unión de alguno de los ligando específicos al receptor, induce cambios conformacionales en el dominio extracelular de éste, promoviendo así la dimerización del receptor. Estos complejos diméricos pueden llevarse a cabo como homodímeros o bien pueden formase heterodímeros con otros miembros de la familia del EGF-R.
2. La dimerización del EGF-R, conduce a la autofosforilación. Cuando los dominios extracelulares del receptor dimerizan, los dominios citoplasmáticos se juxtaponen, lo que produce un cambio conformacional que estimula la actividad catalítica del

receptor, induciendo así, una mútua transfosforilación de las dos moléculas receptoras dimerizadas a nivel del carboxilo terminal. La autofosforilación se lleva a cabo en 5 residuos de tirosinas específicas (Tyr: 1173, 1148, 1086, 1068 y 992); la mayoría de ellos fuera del dominio catalítico, siendo la Tyr 1173 el sitio de autofosforilación más importante ya que cuando experimentalmente es removido, se ve reducida la autofosforilación en los otros residuos tirocina cinasa y la inducción del crecimiento celular por el EGF, se reduce también en un 30% (Fantl, *et al.*, 1993).

3. La transfosforilación resulta en la activación de los EGF-R diméricos que, a su vez, fosforilan substratos ó blancos citoplasmáticos con actividad de tirosina cinasas. Este hecho implica que un segundo cambio conformacional de los receptores diméridados, ocurre después de su transfosforilación; lo que permite al dominio catalítico, fosforilar otras moléculas substrato. Los residuos de tirosinas ya fosforilados del receptor, son reconocidos por proteínas intracelulares que contienen dominios SH2 (son dominios polipeptídicos homólogos conservados, codificados por el gen *src*). Entre las proteínas que contienen las regiones SH2 y que interactúan directa ó indirectamente con el EGF-R autofosforilado se encuentran las enzimas como la Fosfolipasa C (PLC- γ 1), GAP y *syk* que es una fosfatasa fosfotirosina; así como moléculas adaptadoras no enzimáticas como la subunidad p85 de la fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3), y las proteínas homólogas a *src* como Shc, Grb-2 y Nck (Fantl, *et al.*, 1993).

4. Una vez ocurridas las fosforilaciones, los receptores dimerizados y unidos a su ligando, se internalizan (lo que parece depender de la actividad tirosina cinasa del EGF-R), degradándose posteriormente por endocitosis. A su vez, los endosomas experimentan acidificación, incrementando así la disociación del complejo EGF/EGFR. Una vez endocitados, la segregación de los EGF-R no ocupados y los ocupados por su ligando, ocurre dentro de vesículas designadas como CURL (compartment of

uncoupling receptor and ligand). Los receptores no ocupados pueden regresar a la superficie celular (reciclamiento del EGF-R); mientras que los ocupados son degradados por lisosomas. Se ha observado, además, que el complejo EGF-EGFR al internalizarse, se fosforila en residuos serina y treonina en su dominio intracelular; lo que ocasiona que el receptor sea poco sensible, es decir que es menos eficiente para mediar la transducción de señales cuando es reciclado a la superficie celular.

5. La autofosforilación de los receptores dimerizados, provoca el reclutamiento de substratos que tienen una alta afinidad por el receptor, produciéndose así, la transducción de señales a través del EGF-R activado. La señal es propagada de diversas maneras, desde la membrana celular hasta el núcleo, de donde se deriva la respuesta celular; por lo que la fosforilación de tirosinas, es el evento clave en la transducción de señales mediada por el EGF-R. Específicamente, hay tres clases principales de substratos primarios del EGF-R:

a) Enzimas cuya actividad puede ser alterada directamente por la fosforilación o pueden adquirir acceso a sus substratos por translocación a la membrana plasmática; además de contener los dominios de SH2. Dentro de éste grupo de substratos enzimáticos se encuentra la Fosfatidil inositol (PI3 cinasa p110); la Fosfolipasa C (PLC γ 1 y PLC γ 2); GAP a través de la vía de ras; SH-PTP1; syp; fosfatasa fosfotirosina, entre otras (Ullrich, *et al.*, 1990; Van der Geer, *et al.*, 1996; Voldborg, *et al.*, 1997).

b) Proteínas que carecen de un dominio catalítico obvio. Estas proteínas comúnmente contienen dominios SH2 y SH3 (que es otro dominio que exhibe homología con otra región polipeptídica codificada por el gen *src*) y se conocen como adaptadores porque se piensa que sirven como intermediarios en el paso de señales entre el EGF-R y las moléculas que tienen la actividad catalítica y que se encuentran por debajo de la señal del receptor. En éste grupo se encuentran las proteínas y

colágenas homólogas a src (SHC); la subunidad p85 de la PI3 cinasa y Nck, entre otras (Ullrich, *et al.*, 1990; Van der Geer, *et al.*, 1996; Voldborg, *et al.*, 1997).

c) Proteínas estructurales cuya fosforilación puede ser responsable del rápido rearrreglo del citoesqueleto y de la membrana, eventos que comúnmente ocurren después de la activación del EGF-R. Proteínas como la caderina, la conexina, la clatrina, las cateninas, entre otras; se encuentran en éste grupo (Ullrich, *et al.*, 1990; Van der Geer, *et al.*, 1996; Voldborg, *et al.*, 1997).

Pero además de éstos sustratos primarios del EGF-R, hay una gran variedad de respuestas celulares originadas por el EGF-R activado, que se explican como una consecuencia de la acción de éstos sustratos primarios; por ejemplo, la estimulación de la vía MAP cinasa y Raf a través de Ras, que se sabe que activa factores transcripcionales específicos que conducen a la síntesis de DNA y proliferación celular; otros como la liberación de Ca^{2+} de compartimentos intracelulares a través de la vía de PLC γ [FIGURA 4] (Fantl, *et al.*, 1993; De Vita, 1997; Voldborg, *et al.*, 1997).

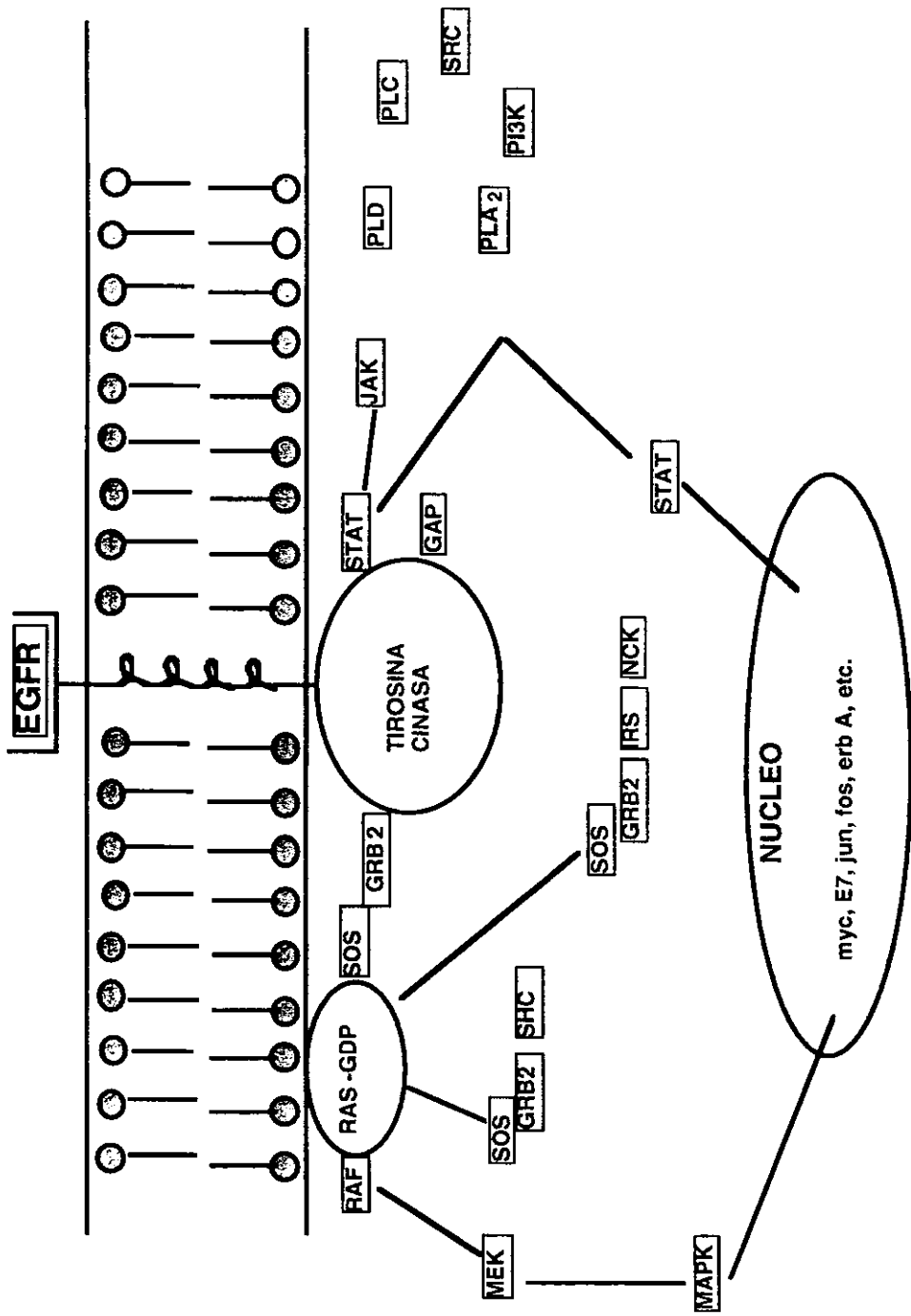


FIGURA 4. Vías de Transducción de Señales Intracelular del EGF-R.
 (Tomado de Fanti, et al., 1993).

La tirosina cinasa de EGF-R, está también involucrada en la progresión de las células a la Fase G_1 y a la Fase S del Ciclo Celular (Voldborg, *et al.*, 1997). En el ciclo celular, la respuesta mitogénica ocurre en dos partes: las células quiescentes deben primeramente ser estimuladas a avanzar a la fase G_1 del ciclo celular, por los "Factores de Competencia"; luego recorrer la fase G_1 y comprometerse a la síntesis de DNA bajo la influencia de los "Factores de Progresión". Dentro de los Factores de Competencia, se encuentran el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF), el Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGF) y el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF); mientras que en los Factores de Progresión, se encuentra el Factor de Crecimiento parecido a la Insulina (IGF-1) (DeVita, 1997).

La transición a través de la fase G_1 requiere de la estimulación sostenida de factores de crecimiento, por un período de varias horas [FIGURA 5]. Si la señal es interrumpida por un período de tiempo corto, la célula revierte al estado de G_0 . Hay también un período crítico en G_1 en el que la estimulación simultánea por ambos factores es necesaria para permitir la progresión a través del ciclo celular. Después de éste punto de restricción, sólo la presencia de un "factor de progresión", como el IGF-1, es necesario. Así que el EGF es uno de los Factores de Crecimiento que causan que las células en reposo o fase G_0 , entren y prosigan a través del ciclo celular (Aaronson, 1991; Lukas, *et al.*, 1996).

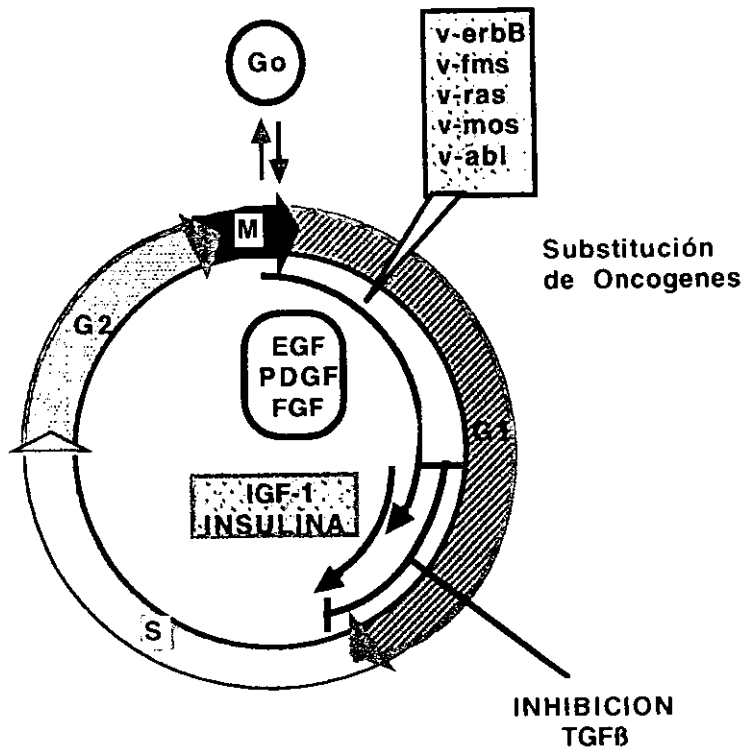


FIGURA 5. Requerimientos de factores de crecimiento durante el ciclo celular. (Tomado de Aaronson, A.S., 1991).

V. El Receptor para el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF-R) y su papel en el desarrollo del Cáncer.

Alteraciones genéticas en las vías de señalización de los GFs, están relacionadas al desarrollo anormal y a una variedad de enfermedades crónicas, incluyendo el cáncer. Las células neoplásicas, por tanto, son el resultado de la progresión de eventos genéticos alterados que incluyen, entre otros, la expresión no regulada de los GFs, sus receptores o de componentes en sus vías de señalización. El EGF, es uno de los GFs más estudiados en enfermedades de tipo neoplásico, encontrando que células tumorales de glándula salival, riñón y vejiga, lo producen y secretan (Stoscheck, *et al.*, 1986; Aaronson, 1991). Sin embargo, la evidencia que sugiere que el EGF per se esta asociado con la inducción, promoción e invasión de células tumorales no es contundente (Stoscheck, *et al.*, 1986). En contraste, se ha observado que células malignas tienen una respuesta incrementada hacia el TGF- α , además de expresar grandes cantidades de EGF-R (Stoscheck, *et al.*, 1986; Derynck, 1988).

Hasta ahora, la gran mayoría de las investigaciones en relación al EGF/TGF- α y cáncer, se han enfocado principalmente al EGF-R (Eccles, *et al.*, 1994; Voldborg, *et al.*, 1997). En un gran número de tumores humanos, el estatus del EGF-R está alterado debido a sobre-expresión y/o mutación de éste (Eccles, *et al.*, 1994; Voldborg, *et al.*, 1997). La señalización amplificada del EGF-R como consecuencia de su alteración, puede inducir un crecimiento celular descontrolado y un fenotipo maligno. Aparte de las mutaciones en el EGF-R, la sobre-expresión del mismo o de sus ligandos o la co-expresión de ligandos y receptor, puede conducir a una transducción de señales anormal mediada por el EGF-R. Esto sugiere que el receptor juega un papel importante en el desarrollo del fenotipo maligno.

Numerosas deleciones en el RNAm del EGF-R, han sido observadas en diferentes neoplasias; los primeros trabajos reportados fueron en glioblastomas (Libermann, *et al.*, 1985); pero recientemente también se han encontrado en carcinomas de pulmón de células no pequeñas (García de Pallazzo, *et al.*, 1993); cáncer de mama, y carcinoma de ovario, entre otros (Moscatello, *et al.*, 1995; Wikstrand, *et al.*, 1995). Las deleciones se localizan tanto en la porción del RNAm que codifica para el dominio extracelular como en la que codifica para el dominio intracelular del EGF-R. Un gran número de éstas deleciones son el resultado de rearrreglos genómicos así como de "splicings" alternativos en el RNAm (Sugawa, *et al.*, 1990). Dentro de las deleciones detectadas en el dominio extracelular del EGF-R, se han observado principalmente tres tipos; las cuales se han denominado como: **EGFRvI**, **EGFRvII** y **EGFRvIII** (Voldborg, *et al.*, 1997).

a) El tipo **EGFRvI**, la cual es una deleción total del dominio extracelular semejante a la oncoproteína v-erb-B (Eccles, *et al.*, 1994); en este caso el receptor se encuentra constitutivamente activo y no puede ser regulado por el EGF. Esta deleción sólo se ha observado en una línea celular derivada de un glioma maligno (Kris, *et al.*, 1985; Bigner, *et al.*, 1990).

b) El tipo **EGFRvII**, contiene una deleción en el aminoácido 83 del subdominio IV (rico en cisteínas), de la región extracelular del receptor y se ha observado en gliomas con el gen del EGF-R amplificado (Humphrey, *et al.*, 1991; Wong, *et al.*, 1992). Este tipo de EGF-R es capaz de transducir la señal de proliferación celular e invasión *in vitro* y responder a GFs de manera similar al EGF-R silvestre. Además, el EGFRvII no se ha observado que tenga alguna influencia en el fenotipo maligno del glioblastoma; por lo que puede sólo ser el resultado de la amplificación del gen del EGF-R (Humphrey, *et al.*, 1991).

c) El tipo **EGFRvIII**, es el más frecuente en neoplasias humanas y no se ha detectado en tejido normal. Presenta una mutación resultado de un rearrreglo intragénico que da como consecuencia una sobre-expresión de un transcrito que carece de los exónes 2 al 7; lo que representa 801 pares de bases. En algunos casos ésta alteración se origina por un "splicing" alternativo del RNAm. El receptor en sí, carece de los aminoácidos 6 al 273 correspondientes a los subdominios I y II, del dominio extracelular (Sugawa, *et al.*, 1990; Moscatello, *et al.*, 1995). Además este gen EGFRvIII muchas veces está amplificado; lo que origina su sobre-expresión en células tumorales (Bigner, *et al.*, 1990). Esta modificación se ha detectado en más del 50% de gliomas de alto y bajo grado (Humphrey, *et al.*, 1990); en carcinomas de pulmón (García de Pallazzo, 1993); y en cáncer de mama entre otros (Wikstrand, *et al.*, 1995). Es importante mencionar, que la sobre-expresión del EGFRvIII, no excluye una posible sobre-expresión del EGF-R silvestre. El EGFRvIII, no es capaz de unir ligando ya que carece del sitio de unión; por lo que está constitutivamente activado de tal manera que estimula la proliferación celular e incrementa la tumorigenicidad de células de glioma transfectadas en ratones desnudos (Nishikawa, *et al.*, 1994). Además, este receptor mutado tiene niveles de activación menores a los del EGF-R silvestre y no es internalizado (Huang, *et al.*, 1997).

De las modificaciones más importantes en el receptor, se tiene la amplificación del gen de EGF-R, la cual se ha detectado en diversos tumores como carcinomas de pulmón y de esófago (Hunts, *et al.*, 1985); en líneas celulares de carcinoma escamoso humano (Yamamoto, *et al.*, 1986); en carcinoma de ovario entre otros (Henzen-Logmans, *et al.*, 1992), pero donde mayormente se ha detectado es en glioblastomas en donde aproximadamente el 40% de ellos presentan esta modificación en el receptor (Libermann, *et al.*, 1985; Malden, *et al.*, 1988; Schlegel, *et al.*, 1994).

Otra modificación importante es la sobre-expresión del EGF-R, la cual se ha observado frecuentemente, con el uso de diversas técnicas de detección (inmunohistoquímica, ensayos de unión, citofluorometría, western blot, ELISA), en distintos tumores. Tal es el caso del cáncer de mama (Spitzer, *et al.*, 1988; Barker, *et al.*, 1989; Torregrosa, *et al.*, 1997); cáncer de vejiga (Smith, *et al.*, 1989; Lipponen, *et al.*, 1994; Ruck, *et al.*, 1997); cáncer de colon (Radinsky, *et al.*, 1995); cáncer de próstata (Glynne-Jones, *et al.*, 1996); y carcinoma de endometrio, entre otros (Lelle, *et al.*, 1993).

De las anomalías detectadas y reportadas para el EGF-R en biopsias y/o muestras de cáncer del cérvix humano, la más frecuente es la sobre-expresión (Miyazawa, *et al.*, 1992). En la mayoría de estos trabajos, se dan evidencias claras de que el EGF-R, puede jugar un papel fundamental como factor pronóstico en el CaCU, cuando la sobre-expresión del receptor se correlaciona con un mal pronóstico de las pacientes analizadas. Sin embargo, ésta asociación es todavía controversial, ya que existen otros reportes como los de Sato *et al.*, (1991), Hayashi *et al.*, (1991) y más recientemente el de Scambia *et al.*, (1998) cuyos resultados no correlacionan con ningún factor pronóstico clínico de éste tipo de neoplasia. Por lo tanto, la sobre-expresión del EGF-R en el CaCU hasta el momento, no ha aportado información precisa para establecer y definir el papel biológico del EGF-R en el desarrollo de éste tipo de neoplasia.

ANTECEDENTES

El Receptor para el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF-R), participa activamente en los mecanismos de control celular como la proliferación y diferenciación; por lo que una expresión o función anormal del mismo, puede estar involucrado en la iniciación y progresión de diversas neoplasias humanas, incluyendo la del Cérvix Uterino.

Las anomalías del EGFR detectadas y reportadas en tumores del cérvix uterino humano, han sido predominantemente a nivel de sobre-expresión del receptor y básicamente se ha determinado cuantitativamente (niveles altos del receptor), así como cualitativamente (expresión o presencia alterada del receptor).

Las observaciones realizadas con respecto a la presencia del EGF-R en CaCU, por ensayos inmunohistoquímicos, se iniciaron con el trabajo de Gullick, *et al.* (1986) donde reportaron la sobre-expresión del EGF-R en tejidos de CaCU epidermoide. Más tarde, Göppinger, *et al.* (1989), como resultado del análisis de 43 biopsias de tejido cervical, encontró que la inmunoreactividad para el EGF-R en el epitelio escamoso normal, está confinada a las capas basal y parabasal del epitelio. Sin embargo, en todas las lesiones de tipo NIC, la señal positiva para el receptor en el inmuno ensayo fué homogénea a lo largo de toda la lesión, además de presentar un elevado contenido de EGF-R. Por su parte Berchuck, *et al.* (1990), también demostró por inmunohistoquímica que el EGF-R es característico de queratinocitos basales del epitelio cervical normal. En contraste, el receptor fué expresado por células escamosas indiferenciadas, a lo largo de toda la capa epitelial en lesiones como metaplasia escamosa, condiloma y carcinoma *in situ*; sólo en los casos de CaCU invasor, la presencia de EGF-R fué de moderada a fuerte en toda la lesión.

Un estudio interesante, es el de Maruo, *et al.* (1992), en el que además de encontrar inmunoreactividad para el EGF-R en la mayoría del epitelio displásico y cáncer *in situ* como lo reportado anteriormente; en los carcinomas invasores observó grandes diferencias en la expresión del EGFR en la mayoría de los tipos histopatológicos. Así, en los casos de carcinoma epidermoide no queratinizante de células grandes y en los queratinizantes, mostraron alto contenido del receptor. Mientras que en los carcinomas epidermoides no queratinizantes de células pequeñas, no presentaron inmunoreacción para el EGF-R. Estos resultados sugieren que la sobre-expresión del EGF-R, puede estar involucrada en las etapas iniciales de la tumorigénesis del CaCU y sugiere que la expresión del EGF-R puede estar muy relacionada con el grado de diferenciación en el que se encuentren las células en el momento de la transformación.

Otro grupo de investigadores (Hale, *et al.*, 1993), analizó distintos tipos histopatológicos de CaCU y confirmaron la correlación existente entre la sobre-expresión del EGF-R con un pobre pronóstico clínico, pero sólo para los casos de CaCU adenoescamosos y no en los epidermoide y adenocarcinomas. Interesantemente, ésta asociación se encontró primordialmente en casos de CaCU con nódulos linfáticos negativos. Sin embargo, en estudios como el de Hayashi, *et al.* (1991), no pudo correlacionar la expresión del EGF-R y la presencia de nódulos linfáticos, concluyendo así que la expresión del EGF-R, es independiente del significado pronóstico.

Por otra parte, se han realizado observaciones interesantes con referencia a los niveles del EGF-R en tejido neoplásico del cérvix, a través de ensayos de unión con EGF marcado con ¹²⁵I. En este tipo de ensayos, por ejemplo Bauknecht, *et al.* (1989), demostró la presencia del EGF-R en el 83% de los casos analizados de CaCU; y de

éstos, el 30% tuvieron incrementado los niveles del receptor comparado con el tejido control no maligno.

Por su parte, Pfeiffer, *et al.* (1989), encontró grandes cantidades de EGF en estratos de tumores cervicales de pacientes con nódulos linfáticos metastásicos y con una sobrevida menor a los 5 años. Además, las pacientes con altos niveles de EGFR (>100 fmoles/mg proteína), tuvieron un alto porcentaje de recurrencias o murieron debido al CaCU comparadas con aquellas pacientes que fueron negativas para el receptor. Por lo que éstos investigadores sugieren que los niveles de EGF-R, son indicativos de carcinomas cervicales biológicamente más agresivos.

Lagrange, *et al.* (1993) utilizando también ensayos de unión, demostró que además de los niveles elevados del EGF-R en tumores del cérvix, existía diferencia en los niveles del receptor encontrados en tumores epidermoides que en los adenocarcinomas. Al correlacionar sus resultados con algunos parámetros clínicos de importancia, encontraron que los tumores con altos niveles de EGF-R fueron más radiosensibles que los tumores con bajos niveles del receptor. Sin embargo, en el trabajo realizado por Scambia *et al.*, (1998), en una serie de 90 pacientes con CaCU; sugieren que el EGF-R no posee ningún valor pronóstico para las pacientes; ya que no encontraron ninguna correlación entre la expresión del EGF-R con la presencia de nódulos linfáticos metastásicos, edad, grado histológico, tamaño tumoral, respuesta a tratamiento y sobrevida.

Utilizando otras técnicas de detección para el EGF-R, otros investigadores también han reportado alteraciones del EGF-R en CaCU; así por ejemplo, en ensayos de ELISA, utilizando un anticuerpo monoclonal anti-EGF-R, Kim *et al.* (1996), encontró que en el 73% de los casos de CaCU invasor y en el 25% de los NICs, se presenta una sobre-expresión del EGF-R; y cuando correlacionaron sus resultados con algunos

parámetros clínicos, encontraron que los tumores mayores de 4cm, tuvieron altos niveles de EGFR; por lo que se sugiere un comportamiento biológico más agresivo y con mayor proliferación de éstos tumores. Por su parte, vanDam, *et al.* (1991), usando el método de citofluorometría, encontró que el 38% de los casos mostraron una sobre-expresión del receptor. Mientras que Kimming, *et al.* (1997), utilizando el mismo método, encontró que sólo el 10% de los casos mostraron sobre-expresión del receptor. Finalmente Mittal, *et al.* (1990), por Hibridación *IN SITU* demostró que la expresión del RNAm para el receptor en tejido de pacientes con NICs, fue generalmente homogénea en toda la lesión y se incrementó conforme la lesión fue de moderada a severa. En general estos resultados sugieren que el EGF-R se sobre-expresa en sólo un pequeño grupo de pacientes con CaCU y que ésta sobre-expresión del receptor va ligada a un comportamiento biológico más agresivo, con mayor proliferación del tumor y con un pobre pronóstico de sobrevida para el paciente.

Los reportes son diversos pero poco numerosos; sin embargo, aunque la mayoría de estos trabajos, dan evidencias de que el EGF-R puede jugar un papel fundamental como factor pronóstico en CaCU, en otros trabajos no se ha podido determinar la importancia del EGF-R en la carcinogénesis del cérvix. Tal vez ésta controversia se deba, a que la sobre-expresión del EGF-R que se observó en los diferentes ensayos, varió desde 6 hasta 81% de positivos en pacientes con CaCU. Es posible, que las discrepancias en éstos resultados se deba a los diferentes grados de sensibilidad que se alcanzan con las distintas técnicas que fueron empleadas. Sin embargo, aún no queda claro si los niveles de expresión del receptor o modificaciones en el gen pueden ser empleadas como factor pronóstico y de sobrevida para pacientes con diferentes grados de lesiones de CaCU.

Por otro lado, es importante definir, si es posible que las anomalías reportadas para el EGF-R, son producto de alteraciones tanto en el gen que codifica al receptor, como alteraciones en su transcrito. Además no se ha podido identificar si el papilomavirus (HPV), participa en la modulación de la expresión del EGF-R durante el desarrollo del CaCU. En reportes previos Göppinger, *et al.* (1989) por un lado y von Doeberitz *et al.* (1990) por otro, no pudieron demostrar ninguna correlación entre la presencia de HPV y niveles incrementados del EGF-R. Sin embargo, no fué hasta años recientes que se han publicado diversos reportes en los que se dan evidencias que involucran a los oncogenes de HPV en la regulación, a diversos niveles, de la expresión del EGF-R. Es así como los experimentos de Straight, *et al.* (1993), trabajando con líneas celulares de fibroblastos y queratinocitos humanos, sugieren que el producto del gen E5 de HPV16, altera el reciclamiento del EGF-R, lo que incrementa la vida media del mismo. Más aún, Banks *et al.*, (1993) postulan que en lesiones de bajo grado ó premalignas del cérvix, el producto de E5 puede estimular las señales del EGF-R en respuesta a bajos niveles de ligando (EGF); lo que a su vez eleva los niveles de expresión de *c-fos* a nivel nuclear. Recientemente, Ben-Bassat, *et al.* (1997), observó un decremento en el crecimiento celular de queratinocitos humanos transfectados con HPV 16, al introducir inhibidores del EGF-R. Por su parte, Hu, *et al.* (1997), demostró que la introducción de unidades de transcripción de un antisentido de E6/E7 de HPV 18 y un sentido de Rb ó una combinación de ambas unidades transcripcionales en células HeLa, resulta en el decremento de los niveles de expresión protéica de EGF-R; aunque no se vieron afectados los niveles de transcripción (RNAm) de éste.

Debido a que el CaCU es la neoplasia de mayor incidencia en nuestro país como ya se explicó muy ampliamente, es necesario y fundamental tener un mayor conocimiento biológico y molecular del mismo; para poder definir en un futuro, nuevas

estrategias de diagnóstico, pronóstico y terapia que ayuden a reducir el número de casos de CaCU que se presentan en México. Hasta el momento, la alteración más importante que se ha reportado para el EGF-R en pacientes con CaCU, es la sobre-expresión. Sin embargo, esto no ha sido suficiente para discernir el papel biológico del EGF-R en la carcinogénesis del CaCU. Es posible que la sobre-expresión del receptor sea producto de alteraciones tanto en el gen del EGF-R (amplificación, deleción), como de su transcrito (RNAm). Es por ello, que nosotros estamos interesados en determinar y definir el papel del EGF-R en el desarrollo del CaCU, a través de la identificación de variaciones en la expresión del EGF-R y si ésto es el resultado de una sobre-expresión a nivel traduccional o si es el gen el que se ve modificado en los pacientes con CaCU.

HIPOTESIS

Dado que el EGF-R tiene un papel importante en los mecanismos que regulan la proliferación celular y debido a que éste es uno de los receptores que se ha visto afectado en diversos tipos de cáncer; se espera observar algún tipo de alteración en pacientes con CaCU, ya sea a nivel de proteína y RNA (incremento en los niveles de expresión del receptor ó de sus transcritos), ó a nivel del gen (amplificación, delección) que lo codifica.

OBJETIVO GENERAL

Identificar posibles alteraciones en el receptor para el EGF, a nivel transcripcional (proteína y RNAm) y/ó a nivel del gen, en pacientes con Cáncer Cérvico Uterino Invasor.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.** Determinar posibles alteraciones en la expresión protéica del EGF-R en biopsias de pacientes con CaCU, utilizando las técnicas de Inmunohistoquímica y Western Blot.
- 2.** Determinar posibles alteraciones en los niveles de transcripción del RNAm del EGF-R en biopsias de pacientes con CaCU, por medio de Hibridación *IN SITU* .
- 3.** Determinar alteraciones, como amplificación y/o deleciones del gen que codifica para el EGF-R en biopsias de pacientes con CaCU, por Southern Blot.

MATERIALES Y METODOS

Material Biológico y Características Clínicas:

Un total de 22 pacientes con Cáncer Cérvico-Uterino (CaCU) Epidermoide Invasor libres de tratamiento (edad promedio 46.77 ± 13.61 años); y 20 mujeres sin lesión neoplásica del cérvix uterino (CN), como grupo control (edad promedio 43.2 ± 8.64 años); fueron analizadas. La muestra de tejido se obtuvo por biopsia ó por excisión quirúrgica, del Servicio de Ginecología del "Instituto Nacional de Cancerología" y del Servicio de Gineco-Obstetricia del Hospital General "Manuel Gea González", respectivamente. De las 22 pacientes con CaCU, 12 tuvieron un diagnóstico histopatológico de Carcinoma Epidermoide No Queratinizante; 8 presentaron Carcinoma Epidermoide Queratinizante y 2 tuvieron otros tipos histopatológico (Adenocarcinoma y Carcinoma *IN SITU*). Y del total de las pacientes, 15 (68.2%), tuvieron un estatus hormonal de menstruantes y 7 (31.82%), fueron menopáusicas.

De las 20 pacientes con CN, 12 tuvieron un diagnóstico histopatológico de Cervicitis Crónica Inespecífica y las otras 8, además de Cervicitis, presentaron asociado otro tipo de padecimiento; como hiperplasia ó degeneración coilocítica ó quistes mucinosos ó degeneración glandulocítica ó metaplasia epidermoide. Y del total de las pacientes, 14 (70%) tuvieron un estatus hormonal de menstruantes, en tanto que las 6 (30%) restantes, presentaron un estatus hormonal de menopausia.

Todos los tejidos tuvieron un peso mínimo de 300 mg y desde el momento en que se obtuvo el tejido y durante todo el procesamiento del mismo, se manipuló a 4°C. Cada uno de los tejidos ó muestras colectadas, se lavaron con solución salina fría de NaCl al 0.9%, hasta que no hubo residuos de sangre, necrosis y detritus celular. Finalmente, las muestras se colocaron en papel aluminio, se etiquetaron y almacenaron a -70°C, hasta su siguiente procesamiento.

Inmunohistoquímica:

Se determinó la presencia del EGF-R en el tejido de CaCU y en el de CN, a través de la técnica de Inmunohistoquímica por marcaje indirecto (ABC), descrita por Göppinger, *et al.* (1989). Para el ensayo se usaron 2 anticuerpos anti-EGF-R; uno que reconoce el dominio extracelular del receptor (clona EGFR-1 de Amersham, Inglaterra); y otro que reconoce el dominio intracelular del mismo receptor (clona Ab-4 de Oncogene, USA). Brevemente, el ensayo se llevó a cabo en cortes de tejidos congelados de 5µm de grosor, los cuales se fijaron en acetona y rehidrataron con buffer de fosfatos (PBS: KCl 2.6mM, KH₂PO₄ 1.5mM, NaCl 0.140 M y NaH₂PO₄ 8.2mM). Posteriormente se incubaron con el anticuerpo EGFR-1 (dil: 1:10) ó con el anticuerpo Ab-4 (dil: 1:75) por 18 hrs a 40°C; y después con un segundo anticuerpo biotilnado (IgG) por 1 hr a 37°C, revelando con 3-3-diaminobencidina como cromógeno y contrastando con hematoxilina de Harris. La inmunoreactividad ó señal específica positiva, se identificó por la presencia de una tinción de color café.

Cortes de tejido humano de placenta y de músculo liso de útero, se incluyeron como control positivo y negativo, respectivamente. Para todos los tejidos, se evaluó la presencia de Vimentina (Dako; California, USA) para identificar que los tejidos se encontraban en buen estado. Además, en un corte de cada tejido, se omitió el primer anticuerpo, como control interno negativo; para determinar inmunoreacción no específica por peroxidasa endógena.

La evaluación semicuantitativa de la intensidad inmunoreactiva en las células tumorales de los tejidos de CaCU, se definió en una escala de tres puntos de acuerdo a Itakura, *et al.*, (1994), de la siguiente manera: **1. (++)** = inmunoreactividad **fuerte** para el EGF-R; aquella cuya intensidad fué equivalente a la observada en el trofoblasto placentario; **2. (+)** = inmunoreactividad **moderada** para el EGF-R, aquella cuya intensidad fué menor a la observada en el trofoblasto placentario; y **3. (-)** = inmunoreactividad **negativa** para el EGF-R, equivalente a lo observado en el músculo liso de útero [FIGURA 6, A y B].

Además, se llevó a cabo la clasificación del Patrón de Distribución de las células inmunoreactivas para el EGF-R, como: **1. H m** = patrón **Homogéneo**; tejido que mostró tener en todas sus células, una inmunoreactividad para EGF-R ya sea fuerte

(++) ó moderada (+); 2. Ht = patrón **Heterogéneo**; tejido que mostró tener en un mismo corte, una combinación de inmunoreactividad fuerte (++) y moderada (+) para el EGF-R.



FIGURA 6 Tinción inmunohistoquímica para el Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF-R), en cortes de tejido congelado humano de placeta (control positivo) y músculo liso de útero (control negativo). A) Localización de la inmunoreacción en el trofoblasto placentario [Ver Flecha] (100X). B) Tejido muscular no inmunoreactivo (100X).

Hibridación *IN SITU* para RNAm:

Los tejidos fueron tratados para detectar RNAm por Hibridación *In Situ*; de acuerdo a la técnica reportada por Mittal, *et al.* (1990), con algunas modificaciones realizadas para tejidos congelados. Brevemente, cortes de tejidos congelados de 8 μm de grosor, se fijaron en acetona y deshidrataron con alcoholes graduales (30, 70 y 100%); se colocaron a 65°C por 3 min y luego a 4°C por 5 min, quedando listos para la Hibridación. La sonda de cDNA del EGF-R utilizada, fué un fragmento de 1.838 Kb cortado con Eco R1 del plásmido pHER-A64-1 (American Type Culture Collection, USA); la cual se marcó con dCTP [³⁵S] por el método de Nick Translation (Amersham, Inglaterra). Cortes de tejido humano de placenta y de músculo liso de útero, se incluyeron como control positivo y negativo respectivamente, para demostrar la especificidad de la señal de hibridación. Además, como controles internos de la técnica, se usó el plásmido 18S ribosomal como control positivo y como controles negativos el vector pBR 322 además de "cocktail" de hibridación sin sonda. Se registró como señal no específica, la señal de hibridación localizada sobre el estroma del tejido de CN.

Sonda ya marcada (1.1 X 10⁴ cpm/ μg DNA), se colocó en el cocktail de hibridación (0.02% de ficoll, 0.02% de polivinilpirrolidona, Sero Albúmina Bovina 1 mg/ml, EDTA 5 mM, DTT 10 mM, 10% de dextran sulfato, NaCl 0.6M, Tris 10 mM, DNA de salmón 0.2 mg/ml y 40% de formamida); se desnaturalizó a 96°C por 5 min y se añadió sobre cada corte de tejido. Los cortes fueron colocados en una cámara húmeda y la Hibridación se continuó por 18hrs a 37°C en un horno de hibridación (Lab-line). Los cortes de las muestras se lavaron 2 veces con 2XSSC (NaCl 3M, Citrato de Sodio 0.3M, pH 7.0), y 40% de Formamida por 10 min a 40°C; un lavado con 2XSSC por 15 min a 40°C; una incubación con RNAsa en PBS por 1 hr a 37°C; un lavado con 2XSSC por 10 min a 25°C; un lavado con 1XSSC por 10 min a 25°C y un lavado con PBS por 10 min a 25°C. Posteriormente, los cortes fueron deshidratados con alcoholes graduales; se incubaron con emulsión fotográfica por 7 días a 4°C, se revelaron con Kodak D-19 y contratiñieron con Hematoxilina-Eosina.

El análisis de los resultados se llevó a cabo en un microscopio óptico (Olympus, Japón), con el objetivo de 100X. La evaluación se realizó, contando el número de granos observados sobre 10 campos consecutivos de 10 células cada campo (100 células totales/ tejido), y se consideró el número total de granos/célula y el número total de granos/100 células como referencia para el contenido de RNAm en el tejido.

Preparación de Membrana Celular y Separación en Geles de Acrilamida:

De los tejidos, se aisló una fracción de membrana celular por el método reportado por Nicholson, *et al.*, (1988). Brevemente, el tejido se homogenizó con politrón y se centrifugó por 10min a 800xg a 4°C. El sobrenadante resultante, se centrifugó por 35min a 100,000xg y el botón membranal que se obtuvo, se resuspendió en solución de homogenización (Tris-HCl 10mM pH 7.4, NaCl 50mM, PMSF 200µM, Aprotinina 10 µg/ml). Proteínas totales fueron cuantificadas por el Método de Bradford (1976). La fracción membranal así aislada, fué analizada por el método de electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE); utilizando el sistema de 2 fases de Laemmli (1970). El gel separador se preparó con 6% de acrilamida/0.2% de bis-acrilamida, 0.1% de SDS, Tris-HCl 375mM (pH 8.9), 0.05% de TEMED y 0.05% de persulfato de amonio. Sobre este gel separador, se colocó el gel concentrador que consistió de 4.5% de acrilamida/0.12% de bisacrilamida, 0.1% de SDS, Tris-HCl 125mM (pH 6.8), 0.1% de TEMED y 0.1% de persulfato de amonio. La fracción membranal, se hirvió durante 5 min en el amortiguador de muestra (2% de SDS, 0.01% de Azul de Bromofenol, 10% de Glicerol, TRIS-HCl 100mM, pH 6.8). Cien microgramos de proteína total de la fracción membranal de las muestras, se hirvieron en buffer de muestra (2% de SDS, 0.01% de Azul de Bromofenol, 10% de Glicerol, TRIS-HCl 100mM, pH 6.8) por 5 min y fueron separadas en un gel al 6% por 4hrs a 200V. Finalmente, el gel fué procesado para Western blot, como se describe a continuación, ó se realizó tinción de proteínas con azul de Coomassie (0.05% de azul de coomassie, 40% de metanol).

Western Blot:

Después de la separación electroforética, las proteínas del gel fueron transferidas a una membrana de Nitrocelulosa (0.45µm, Millipore, USA) como es descrita por Towbin *et al.*, (1984), en una mini-cámara de transferencia (Bio-Rad, USA), a 4°C por 6h a 50V. El buffer de transferencia que se utilizó, contenía Tris-HCl 25mM, Glicina 192 mM, 20% de Metanol, pH 8.3. Una vez llevada a cabo la transferencia, el filtro se bloqueó durante 30 min, con Cetus-blockig cocktail (7.5% de Glicina, 5% de leche descremada, 1% de Ovoalbúmina y 5% de SFB) y se lavó 3 veces con TBST (Tris-HCl 10mM, NaCl 150mM, 0.05% de Tween 20, pH 8.0). El filtro se incubó con el primer anticuerpo anti-EGF-R (dilución 1:75, clona Ab-4, Oncogene, USA) por 16 hrs a 4°C con agitación continua, después de lo cual se lavó 3 veces con TBST. Posteriormente se incubó con el segundo anticuerpo anti-conejo (IgG) acoplado a peroxidasa por 3 hrs siguiendo las condiciones del kit de Quimioluminiscencia (Amersham, UK). Finalmente, el filtro se expuso a un film XOMAT por 2 min y los niveles del EGF-R encontrados por Western Blot, se cuantificaron por Densitometría (Densitómetro Bekman).

Purificación de DNA Genómico e Hibridación Tipo Southern Blot:

La determinación de alteraciones en el gen del EGF-R, se llevó a cabo por análisis de Southern Blot, de acuerdo a lo reportado por Maniatis, *et al.*, (1989). Primeramente se purificó DNA genómico por el método de Proteinasa K (Maniatis, *et al.*, 1989). El DNA aislado (10µg), se digirió con enzima EcoRI a 37°C por 18 hrs; se precipitó con acetato de sodio 0.3M y el DNA se recuperó por centrifugación a 14000 rpm en una microcentrífuga (Beckman E2) por 10 min a 25°C. El DNA así aislado, fué separado en un gel de agarosa al 0.8% y transferido a membrana de Nylon (Amersham, Inglaterra). El filtro se prehibridó durante 2 hrs a 37°C, en solución de prehibridación (6XSSC, 5XDenhardt's, 10% de dextran sulfato, fosfato de sodio 50mM, DNA de esperma de salmón 100 µg/ml, pH 6.5). La sonda de EGF-R utilizada, fue un fragmento de cDNA de 1.838 Kb cortado con EcoR1 del plásmido pHER-A64-1

(American Type Culture Collection, USA), la cual fué marcada con dCTP [α - 32 P] (3000 Ci/nmol⁻¹, Amersham, Inglaterra), por el método de Random Primers (kit de Amersham, UK), siguiendo las instrucciones del kit. El filtro se hibridó con la sonda marcada en cocktail de hibridación (6XSSC, 5XDenhardt's, Sero Albúmina Bovina 1 mg/ml, 10 mM, 10% de dextran sulfato, fosfato de sodio 50 mM, DNA de esperma de salmón 100 μ g/ml, 50% de Formamida, 0.02% de SDS, pH 6.5), por 16hrs a 65°C. Posteriormente, el filtro se lavó con 2XSSC/50% de Formamida por 5 min a 65°C; dos lavados con 0.2XSSC por 15 min a 65°C; un lavado con 0.1XSSC por 15 min a 25°C y un lavado con PBS por 10 min a 25°C. Finalmente el filtro se expuso con film XOMAT por 7 días a -70°C. La amplificación del gen del EGF-R, fué estimada por medio de cuantificación densitométrica (Densitómetro Bekman).

Extracción de DNA y Detección de Papilomavirus Humano (HPV) por PCR:

Se determinó la presencia de DNA de HPV en las muestras de tejido de CN y de CaCU, utilizando la técnica de Amplificación de DNA por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). El DNA fué aislado de acuerdo a la técnica de Bauer, *et al.*, (1992); para lo cual los tejidos fueron digeridos por 2hrs a 56°C en Laureth 12 al 1%.

Los oligos utilizados fueron el MY09 y el MY11 que reconocen una región conservada del gen L1ORF correspondiente a la posición 6580-7030, y que permite amplificar un fragmento de aproximadamente 450pb de diferentes tipos de HPV (Manos, *et al.*, 1989). También fueron incluidos una pareja de oligos para β -globina (Bauer, *et al.*, 1991), que amplifican un fragmento de 260pb de éste. La reacción de PCR fué llevada a cabo en buffer de reacción para PCR con 300ng de DNA de la muestra problema, 0.05mM de cada oligo MY09/MY11 para HPV ó 0.05mM de los oligos pCO4/GH20 para β -globina. La reacción se llevó a cabo por 35 ciclos de 30seg a 95°C, 30seg a 55°C y 1 min a 72°C. Posteriormente, el DNA amplificado fué digerido con las enzimas de restricción BamHI y RsaI, para identificar el patrón de restricción de los HPV tipos 16 y 18. En los casos en que el patrón de restricción no coincidió con el esperado, se utilizaron otras enzimas como Ddel, HaeIII y PstI principalmente (Bauer, *et al.*, 1991).

Los resultados de la tipificación de HPV por la técnica de restricción anteriormente descrita en los tejidos control de CN, no fueron los esperados de acuerdo a lo reportado en la literatura; por lo que fragmentos de estos tejidos, fueron enviados para su análisis al laboratorio de la Dra. Cossette Wheeler, donde la tipificación de los mismos, se realizó de acuerdo a la técnica de blot en línea reversa descrita por Gravitt, *et al.*, (1998). Esta técnica emplea el producto de PCR marcado con biotina, el cual se hibrida a una sonda de oligonucleótidos de distintos HPV's, que están, a su vez, inmovilizados en una membrana de nylon de 75 X 6mm. Los genotipos de HPV's de alto riesgo incluidos en la membrana, son: 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 55, 56, 58, 59 y 68; y los de bajo riesgo son: 6, 11, 40, 42, 53, 54, 57 y 66. Este método de tipificación es altamente sensible y específico.

Análisis Estadístico

Se utilizaron dos pruebas estadísticas para el análisis de los resultados obtenidos: **a)** La prueba de χ^2 (Chi²): para el análisis del porcentaje de tejido inmunoreactivo, para el EGF-R; con el análisis de los niveles protéicos del EGF-R medidos por densitometría; en el análisis de sobre-expresión del RNAm; y para el análisis de los niveles de amplificación del gen del EGFR medidos por densitometría. **b)** La prueba de Kruskal-Wallis: para el análisis del porcentaje de células con RNAm del EGF-R; y para el análisis del contenido de RNAm del EGF-R, entre los 3 subgrupos de CaCU.

RESULTADOS

A. Detección del EGF-R en Cérnix Uterino No neoplásico (CN) y en Cáncer Cérnix Uterino Invasor (CaCU), por Inmunohistoquímica.

El análisis inmunohistoquímico, ha demostrado ser una técnica útil para determinar la presencia y/o sobre-expresión del receptor del EGF en cáncer de mama (Torregrosa, *et al.*, 1997); además de ser una herramienta importante morfológicamente para diferenciar las células cancerosas o neoplásicas de las normales.

En nuestro trabajo se mostró la presencia del EGF-R por ensayos inmunohistoquímicos, en cortes histológicos de tejido en congelación de cérvix humano no neoplásico y canceroso, preparados como se describió en Materiales y Métodos. Los resultados mostraron, que hubo una inmunoreactividad ó señal positiva fuerte (++) para el EGF-R en los tejidos de CN (FIGURA 7); la cual predominantemente se localizó en membrana celular (FIGURA 7A, mem). También se observó una inmunoreactividad moderada (+), pero difusa en el citoplasma celular (FIGURA 7A, cit). La señal positiva, se detectó con la misma intensidad y distribución tanto con el anticuerpo que reconoce el dominio extracelular (EGFR-1, Amersham, UK), como con el que reconoce el intracelular del receptor (Ab-4, Oncogene, USA). Otra característica adicional del CN, fué que la señal positiva para el receptor, estuvo confinada únicamente a las capas basal y parabasal del epitelio, siendo la inmunoreacción del tipo fuerte (++) y moderada (+), respectivamente (FIGURA 7B, basal y p/basal). Esta señal, no se detectó en la capa superficial ni en el estroma adyacente al epitelio en éste tejido no neoplásico (FIGURA 7C, sup y estroma).

Con respecto a los casos de CaCU, aunque la inmunoreactividad para el EGF-R se localizó predominantemente en membrana celular, siendo ésta del tipo fuerte (++) (FIGURA 8A, mem) con el anticuerpo EGFR-1, no se observó una señal clara a nivel de citoplasma debido a que en células tumorales la relación núcleo-citoplasma se pierde; por lo que no es evaluable (FIGURA 8A). Además en el caso de los tejidos tumorales, la inmunoreacción se localizó en la mayoría de la lesión neoplásica, en comparación con los controles, debido a que la morfología de los estratos epiteliales se pierde en tumores invasivos.

Una característica que se observó constantemente tanto en los tejidos control como en los casos de CaCU, fue la presencia de 2 tipos de patrones de distribución de la señal ó de inmunoreacción de tipo Heterogéneo (FIGURA 7B y FIGURA 8B, respectivamente) y Homogéneo (FIGURA 7C y FIGURA 8C, respectivamente).

Al realizar el análisis de los patrones de distribución del receptor en los distintos tejidos, se observó que el 100% de las muestras control mostró señal positiva para el EGF-R; de éstos, el 55% (11/20) presentó un patrón de distribución de la señal de tipo Heterogéneo, donde la inmunoreacción abarcó un 50% del tejido total (TABLA 1). En tanto que el 45% (9/20) restante de los CN, tuvieron un patrón de distribución de la señal de tipo Homogénea, y esta señal positiva abarcó sólo un 25% del tejido (TABLA 1). A diferencia de los CN, en los casos de CaCU la inmunoreactividad positiva para el EGF-R se detectó en el 91% (20/22) de los casos analizados; y sólo en el 9% (2/22) de éstos, no se detectó señal con el anticuerpo EGFR-1. De la misma manera, 55% (11/20) de los casos de CaCU con señal positiva para el EGFR, mostraron un patrón de distribución de tipo Homogéneo, con más del 50% del tejido tumoral positivo (TABLA 1) . Por otra parte, el 45% (9/20) de los casos restantes de CaCU positivos para el EGF-R, presentaron un patrón de distribución de tipo Heterogénea, con más del 50% del tejido tumoral positivo para EGF-R.

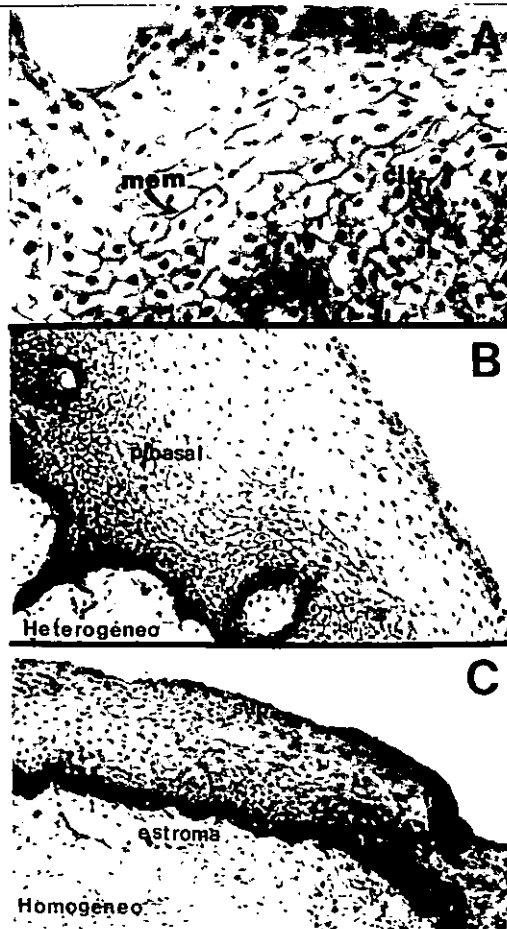


FIGURA 7 Tinción inmunohistoquímica para el Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF-R), en cortes de tejidos congelados de cervix uterino humano no neoplásico (CN), con el anticuerpo EGFR1. **A)** Localización celular de la inmunoreacción en el epitelio cervical no neoplásico (400X). **B)** Patrón de distribución de la inmunoreacción de tipo Heterogéneo (200X). **C)** Patrón de distribución de la inmunoreacción de tipo Homogéneo (200X). mem=membrana celular; cit=citoplasma; p/basal = parabasal; sup = superficial.

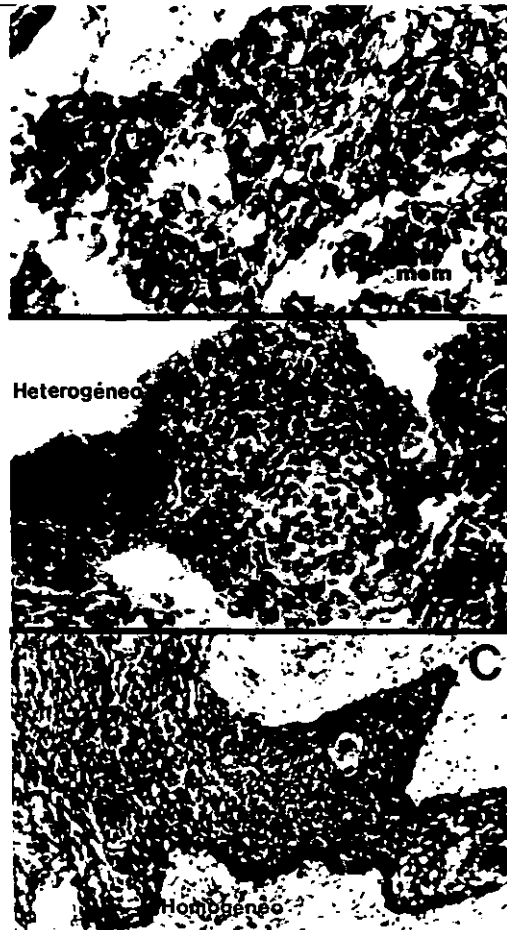


FIGURA 8 Tinción inmunohistoquímica para el Receptor del EGF en cortes de tejidos congelados de cáncer cérvico uterino invasor (CaCU), con el anticuerpo EGFR1. **A)** Localización celular de la inmunoreacción en el epitelio cervical neoplásico (400X). **B)** Patrón de distribución de la inmunoreacción de tipo Heterogéneo (200X). **C)** Patrón de distribución de la inmunoreacción de tipo Homogéneo (200X). mem = membrana celular.

Dentro de estos casos, 7 de ellos mostraron señal positiva para el receptor en más del 50% de tejido tumoral; mientras que los otros 2 casos fué en menos del 50% (TABLA 1).

Por otra parte, al realizar una comparación entre el porcentaje de tejido inmunoreactivo para el EGF-R entre los tejidos controles y el observado en los casos de CaCU, se determinó que el 90% de los casos de cáncer presentó un mayor porcentaje de tejido reactivo (>50%); mientras que en los CN, en su mayoría la señal detectada en los tejidos no fué mayor del 50%; lo cual fué estadísticamente significativo ($p < 0.05$).

Es importante mencionar, que en todos los casos analizados de CN y de CaCU, se detectó una apropiada inmunoreactividad de todas las células con el anticuerpo anti-Vimentina, lo que sugiere una adecuada preservación antigénica en los tejidos y una especificidad de los anticuerpos para los antígenos estudiados.

TABLA 1. INMUNOHISTOQUIMICA DEL RECEPTOR PARA EL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO (EGF-R) EN CERVIX UTERINO NO NEOPLASICO (CN) Y EN CANCER CERVICO UTERINO INVASOR (CaCU).

Tipo de Tejido	Patrón de Distribución del EGFR		Intensidad de la reactividad celular para el EGFR*
	PATRON	# CASOS	
CN	Homogéneo (basal)	9 (45%)	++
	Heterogénea (basal/parabasal)	11 (55%)	+++ / +
CaCU	Homogéneo	11 (50%)	+ (1) ++ (10)
	Heterogéneo	9 (41%)	+++ / + ++ / +
	Negativo	2 (9%)	-

- * Se utilizó el anticuerpo de la clona EGFR-1, que reconoce un epítipo del dominio extracelular del receptor.
- + Moderadamente Positivo
- ++ Fuertemente Positivo
- +++ / + Fuerte y Moderadamente Positivo
- Negativo

B. Inmunoreactividad Diferencial del EGF-R en Cáncer Cérvico Uterino Invasor (CaCU)

Al realizar el análisis inmunohistoquímico del EGF-R en los tejidos de CaCU con el anticuerpo (EGFR-1) que sólo reconoce el dominio extracelular del receptor, se encontró que 2 casos fueron negativos para éste. Para tratar de identificar si éstos tejidos en realidad carecían del receptor, se utilizó otro anticuerpo que reconoce el dominio intracelular del EGF-R (Ab-4). Para ello, se analizaron los 2 casos negativos ya mencionados; 3 casos de CaCU que fueron positivos para el receptor usando el primer anticuerpo, pero con un porcentaje de tejido inmunoreactivo <50% y 3 casos con el 100% de tejido inmunoreactivo. Interesantemente, los 2 casos que originalmente fueron negativos para el anticuerpo EGFR-1 (FIGURA 9A y C), resultaron positivos para el receptor cuando se probaron con el anticuerpo Ab-4, que reconoce el dominio intracelular del receptor (FIGURA 9B y D). Estos resultados nos sugieren, que el EGF-R sí se encuentra presente en estos tejidos y que por alguna razón que hasta ahora no se ha determinado, resultaron negativos con el anticuerpo EGFR-1. En uno de estos casos positivos, la inmunoreacción abarcó el 50% del tejido tumoral (FIGURA 9B); mientras que en el otro, la inmunoreactividad se localizó en el 100% del tejido (FIGURA 9D); siendo en ambos casos, la señal de tipo moderado (+) y con un patrón de distribución de tipo Homogéneo, como se describe en la TABLA 2.

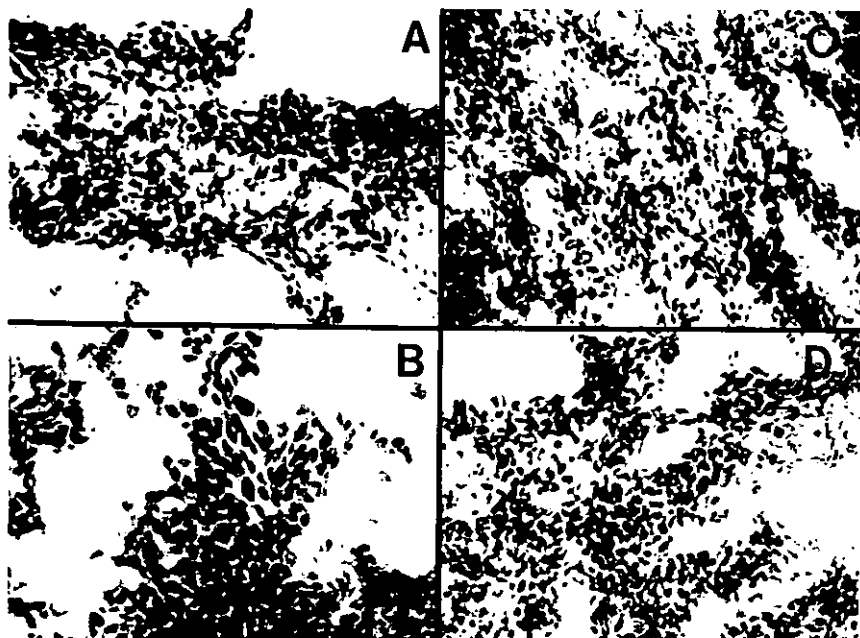


FIGURA 9 Tinción inmunohistoquímica diferencial para el Receptor del EGF, en cortes de tejidos congelados de cáncer cérvico uterino invasor (CaCU). A y C. Epitelio cervical neoplásico no inmunoreactivo (negativo) con el anticuerpo EGFR1 (200X). B y D. Mismo epitelio neoplásico de A y C, pero con inmunoreacción (positivo) con el anticuerpo Ab-4 (200X).

Al analizar con el segundo anticuerpo los 3 casos de CaCU que presentaron <50% de tejido inmunoreactivo con el anticuerpo EGFR-1, se observó que 2 de ellos elevaron su porcentaje de inmunoreactividad a 80 y 100% cuando se probaron con el anticuerpo Ab-4. Cabe mencionar que además dos de éstos 3 casos de CaCU tuvieron un cambio en el patrón de distribución que fué de Homogéneo a Heterogéneo (TABLA 2). En el caso de los tejidos de CaCU con 100% de inmunoreactividad con el anticuerpo EGFR-1, se encontró que 2 de ellos no modificaron su patrón inmunoreactivo con el anticuerpo Ab-4. Sin embargo, uno de ellos presentó una disminución en el porcentaje de inmunoreactividad hasta del 50% con el anticuerpo Ab-4, además de cambiar el patrón de distribución de Homogéneo a Heterogéneo (TABLA 2). El patrón diferente de inmunoreacción y menor cantidad de receptor que se presentó en este caso de CaCU, fué inesperado y por ahora con los resultados que se tienen no se puede explicar este comportamiento (TABLA 2).

**TABLA 2. PATRON DE DISTRIBUCION DEL RECEPTOR PARA EL FACTOR DE CRECIMIENTO EPI-
DERMICO (EGF-R) CON EL USO DE 2 ANTICUERPOS****

Patrón de Distribución para el EGF-R	Intensidad de la Inmunoreactividad celular para el EGF-R			
	α-EGFR CLONA EGFR-1 (% de tejido reactivo)		α-EGFR CLONA Ab-4 (% de tejido reactivo)	
Homogéneo	++	(50%)	++/+	(100%)
	++	(100%)	++	(100%)
	++	(100%)	++/+	(50%)
Heterogéneo	++/+	(50%)	++/+	(80%)
	++/+	(50%)	+	(50%)
	++/+	(95%)	+	(100%)
Negativo	=	(NA)	+	(50%)
	=	(NA)	+	(100%)

** α-EGFR-1, que reconoce un epítipo de la porción extracelular del receptor; y α-Ab-4, que reconoce un epítipo de la porción intracelular del receptor.

+ Moderadamente Positivo

++ Fuertemente Positivo

++/+ Moderado y Fuertemente Positivo

NA No Aplica

C. Detección del EGF-R por Hibridación *IN SITU*, en Tejido No neoplásico de Cérvix Uterino y en CaCU

Para los ensayos de Hibridación *IN SITU*, se seleccionaron sólo 5 casos representativos de los 21 tejidos de CN; ya que en los ensayos de inmunohistoquímica, todos ellos resultaron ser muy semejantes en su comportamiento inmunoreactivo para el receptor. De los casos de CaCU, todos se evaluaron por Hibridación *IN SITU*; ya que todos resultaron ser muy heterogéneos en su comportamiento inmunoreactivo para el EGF-R. Los resultados de estos ensayos se muestran en la FIGURA 10. En el caso de los tejidos de CN, se observó que el RNAm del EGF-R a nivel celular, se encontró distribuido homogéneamente tanto en el núcleo (n) como en el citoplasma (c); y a nivel de tejido, la señal se localizó primordialmente en los estratos basal (b) y parabasal (p); mientras que en el estrato superficial (s), la señal se observó en menor proporción. En todos los casos de CaCU, a diferencia de los tejidos control, el RNAm para el EGF-R se observó en todo el epitelio neoplásico, como se muestra en la FIGURA 11; esto es en parte, debido a la pérdida de los diferentes estratos en el tejido tumoral. Asimismo, la localización del RNAm dentro de la célula, fue primordialmente nuclear, ya que en los tumores invasores de cérvix, la relación núcleo-citoplasma se pierde; de tal forma, que casi no hay citoplasma y el núcleo ocupa la mayor parte de la célula.

Para llevar a cabo el análisis cuantitativo de los resultados para Hibridación *IN SITU*, se contó el número de células que tuvieron señal positiva para RNAm de EGF-R/100 células; y por otra parte, se contó el número total de granos/célula en 100 células, para poder obtener una aproximación del total de RNAm en el tejido. Los resultados mostraron que en los tejidos de CN en promedio, el 85% de las células tuvieron una señal positiva para el EGF-R; mientras que para los casos de CaCU éste

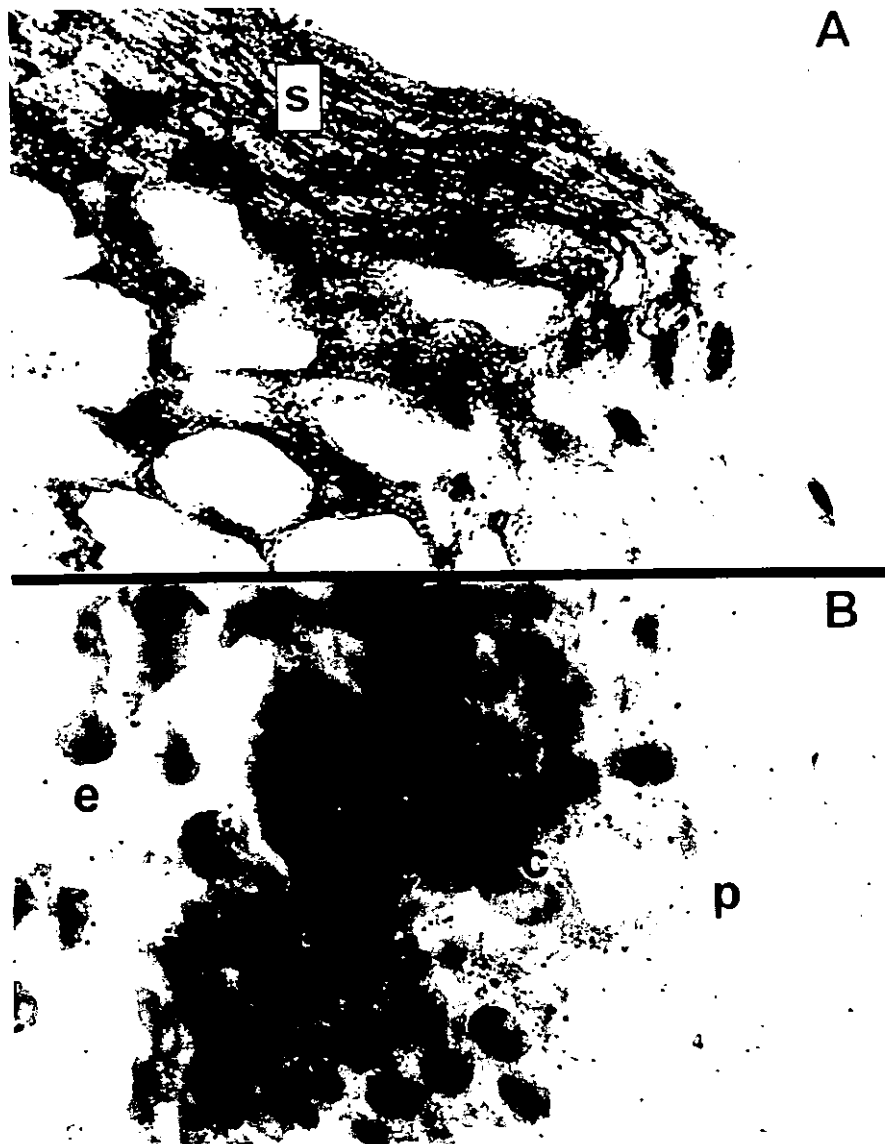


FIGURA 10 Patrón de expresión del RNAm del Receptor de EGF detectado por Hibridación *IN SITU*, en cortes de tejidos congelados de epitelio de cérvix uterino humano no neoplásico (CN), y se hibridaron con la sonda de 1.8 Kb (EcoR1) del plásmido pHER64, marcada con ^{35}S , como se indica en materiales y métodos. **A)** Localización celular del RNAm del EGF-R en el estrato superficial (s) del epitelio cervical no neoplásico (1000X). **B)** Patrón de expresión del RNAm del EGF-R, en el estrato basal (b) y parabasal (p) del epitelio cervical no neoplásico (10000X). c=citoplasma; n=núcleo; e=estroma.



FIGURA 11 Patrón de expresión del RNAm del Receptor de EGF detectado por Hibridación *IN SITU*, en cortes de tejidos congelados de epitelio de cáncer cérvico uterino invasor (CaCU), hibridados con la sonda de 1.8 Kb (EcoR1) del plásmido pHER64, marcada con ^{35}S , como se indica en materiales y métodos. Localización celular del RNAm del EGF-R en el epitelio neoplásico (1000X). c=citoplasma; n=núcleo.

porcentaje se elevó, en promedio 95%, lo que fué estadísticamente significativo ($p < 0.05$). Además, cabe hacer notar que en el epitelio del CN, el RNAm del EGF-R se detectó en estratos celulares del epitelio que carecen de diferenciación y que muestran una actividad proliferativa alta; como son el estrato basal en mayor grado y en el estrato parabasal en menor proporción.

Por otra parte, el número de granos total de RNAm por tejido de CN fué de $319 \pm 69/100$ células; mientras que para los casos de CaCU, se observó que el tejido tumoral presentó en promedio 403 ± 187 granos/100 células, lo que fué un poco mayor a lo cuantificado en CN, aunque no fué estadísticamente significativo. Sin embargo, cabe hacer notar, que al analizar cada caso de CaCU se observó que en el 43% (9/21) de éstos, se detectó un mayor número de granos/100 células (555 ± 152) comparado con lo cuantificado en el total de los tejidos de CN; lo que fué estadísticamente significativo ($p < 0.05$).

Cuando se graficaron los porcentajes de células con RNAm, se pudo observar de acuerdo a las medianas obtenidas, que sí existe una tendencia clara al aumento en el porcentaje de células que presentan RNAm del EGF-R (FIGURA 12A); el cual fué mayor en las pacientes con CaCU (mediana: 98% de células) que en los tejidos control (mediana: 85% de células). Adicionalmente, cuando se graficó el número total de granos/muestra (FIGURA 12B), las medianas fueron muy semejantes tanto en los tejidos control (290 granos/tejido) como en CaCU (275 granos/tejido). Sin embargo, a pesar de no haber diferencias en las medianas, se pudo definir 3 subgrupos de entre los tejidos de CaCU (FIGURA 12B), los cuales describiremos a continuación.

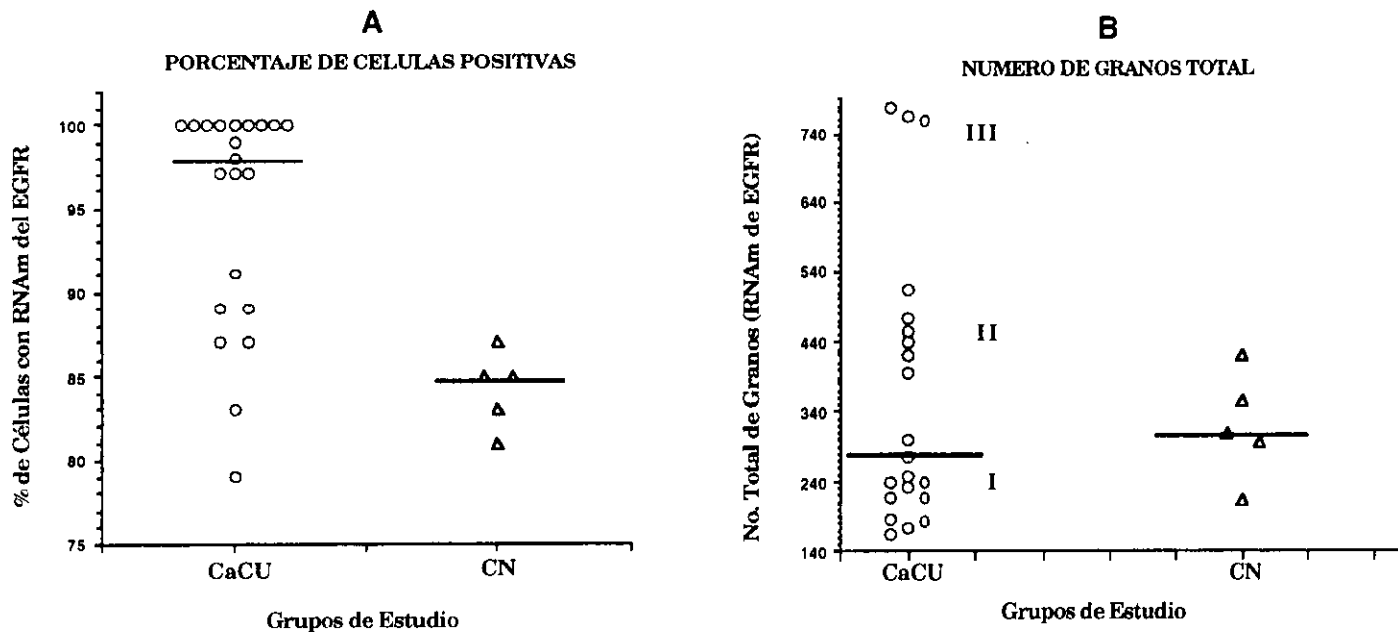


FIGURA 12

Análisis de la cantidad de RNAm del EGF-R detectado por Hibridación *in situ* en tejidos de cérvix uterino humano no neoplásico (CN) y de cáncer cérvico uterino invasor (CaCU).

A) Porcentaje de células positivas para el RNAm del EGF-R en los tejidos analizados.

B) Número total de granos de RNAm del EGF-R en los tejidos estudiados.

D. Análisis de los Subgrupos Identificados en los Casos de CaCU de Acuerdo al Contenido de RNAm del EGF-R

De acuerdo con los resultados obtenidos para el contenido de RNAm del EGF-R, se realizó un análisis detallado en donde se correlacionaron éstos datos, con parámetros clínicos (edad, sobrevivida, estado endocrinomenopáusico) e histopatológicos. El análisis estadístico de estos datos, no mostraron correlación alguna con el contenido de RNAm. Sin embargo, el contenido total de RNAm (número total de granos) para el EGF-R, definió la existencia de 3 subgrupos dentro de los 22 casos de CaCU analizados (FIGURA 12B). Estos 3 subgrupos a los cuales denominamos I, II y III, mostraron diferencias significativas en sus contenidos de RNAm del EGF-R (ver TABLA 3). El subgrupo I, incluyó los casos de CaCU que se comportaron de manera semejante a los tejidos de CN; ya que el número total de granos de RNAm en promedio para este subgrupo fué de 221 ± 40 . En el subgrupo II se observó un promedio de 449 ± 37 granos totales por tejido cuantificado. De la misma manera, el promedio de células que fueron positivas para RNAm del EGF-R en el subgrupo II fué del 98%, siendo mayor al encontrado para el subgrupo I (92%) y además estadísticamente significativo ($p < 0.05$). Finalmente, el subgrupo III registró el número más alto de granos promedio por muestra, lo cual fué de 765 ± 8 y con un porcentaje de células con RNAm para EGF-R del 100%. El incremento en el número de granos totales por tejido observado en el subgrupo III fué del 65% en relación al subgrupo II y de más del 300% en relación al subgrupo I, lo cual fué estadísticamente significativo ($p < 0.05$), como se muestra en la TABLA 3. Al realizar el análisis estadístico de Kruskal-Wallis, se encontró diferencias significativas y se confirmó la existencia de los 3 subgrupos en relación al contenido de RNAm del EGF-R en los casos de CaCU estudiados.

TABLA 3. ASOCIACION DEL CONTENIDO DE RNAm PARA EL EGF-R, ENTRE CANCER CERVICO UTERINO INVASOR (CaCU) Y CERVIX UTERINO NO NEOPLASICO (CN).

TIPO DE TEJIDO	GRUPOS (no)	PORCENTAJE DE CELULAS POSITIVAS ^a	No. TOTAL DE GRANOS ^b
CN	(5)	85 ± 1.0*	319 ± 69.0**
CaCU	I. (13)	92 ± 7.0	221 ± 40.0
	II. (6)	98 ± 1.4	449 ± 37.0
	III. (3)	100 ± 0.0	765 ± 8.0

a células positivas para el RNAm del EGF-R

b número total de granos observados para el RNAm del EGF-R en 100 células

* $p < 0.05$ al hacer la comparación de Porcentaje de Células con RNAm del EGFR de CN vs CaCU-II y CN vs CaCU-III; según la prueba estadística de Kruskal-Wallis.

** $p < 0.05$ al hacer la comparación de Número Total de Granos Observados de RNAm del EGFR de CN vs CaCU-II y CN vs CaCU-III; según la prueba estadística de Kruskal-Wallis.

E. Detección del EGF-R en Cérvix Uterino No neoplásico y en Cáncer Cérvico Uterino Invasor por Western Blot.

Se llevaron a cabo ensayos de Western Blot, para determinar posibles alteraciones en la expresión protéica del EGF-R en los casos de CaCU, al compararlos con los tejidos de CN. Cabe aclarar, que no todas los tejidos de CN y CaCU se sometieron al ensayo de Western Blot; sólo aquellos tejidos (5 de CN y 8 de CaCU), en los que la cantidad de proteína total obtenida, fué suficiente para los ensayos (100µg/muestra). Lisados de la línea celular humana A431, de carcinoma epidermoide de vulva se utilizaron como control positivo en los ensayos, debido a que estas células presentan altos niveles del receptor (1×10^6 EGF-R/célula).

El análisis de Western blot se llevó a cabo con el anticuerpo Ab-4 que reconoce el dominio intracelular del EGF-R, con la finalidad de identificar todas las posibles formas del receptor ya que en ocasiones, el dominio extracelular de éste se encuentra bloqueado o truncado y no es posible identificarlo con otro tipo de anticuerpo. Los resultados de estos ensayos se muestran en la FIGURA 13; en donde se observó la presencia de una banda protéica de 170 kDa de peso molecular en todas los tejidos de cervix uterino; tanto de CN como de CaCU analizados. Además de la banda de 170 kDa, se observó otra proteína de aproximadamente 130 kDa en el 50% (4/8) de los casos de CaCU (FIGURA 13; pacientes 3, 4, 6 y 8) y en el 20% (1/5) de los tejidos de CN (FIGURA 13; CN I). Esta segunda banda de 130 kDa ya ha sido previamente reportada en otro tipo de tumores y se ha identificado como un EGF-R truncado (Schlegel, *et al.*, 1994). También se observó en uno de los casos de CaCU, la presencia de una banda de aproximadamente 97 kDa, que podría representar un producto de degradación del receptor debido a proteasas dependientes de calcio (FIGURA 13, paciente 6).

Los niveles de proteína del EGF-R (banda de 170kDa), se analizaron por densitometría, observándose que dos de los casos de CaCU (25%) presentaron niveles más altos del receptor que los detectados en los tejidos de CN (FIGURA 13, tumores 4 y 6); en tanto que el 75% restante de los casos de CaCU, presentaron niveles protéicos del EGF-R menores a los detectados en los tejidos de CN. Los valores obtenidos para los niveles del EGF-R por densitometría en los tejidos de CN fueron de 4 ± 2 Unidades Densitométricas; mientras que en los casos de CaCU fueron de 2 ± 2 Unidades Densitométricas y de 6 ± 1 Unidades Densitométricas para los 2 casos de CaCU con niveles altos del receptor; lo que fué estadísticamente significativo ($p < 0.065$).

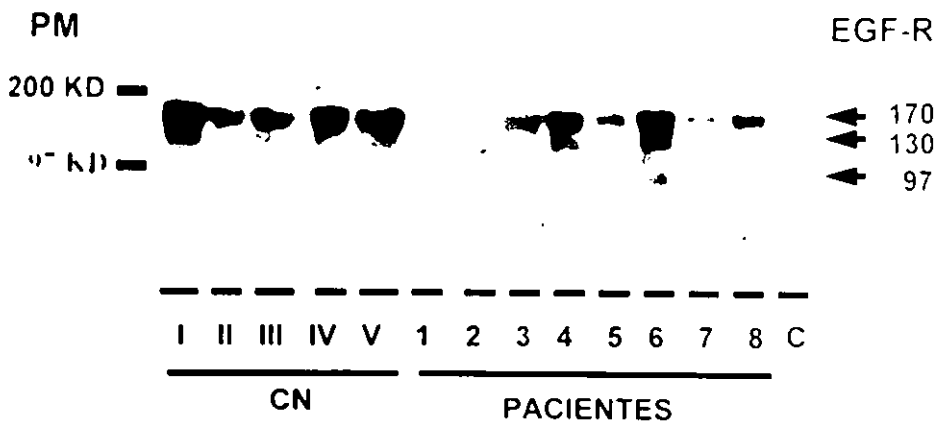


FIGURA 13 Análisis de Western blot para el receptor del EGF, de la fracción membranal de biopsias humanas. De las muestras analizadas, se incluyeron biopsias de pacientes con Cáncer Cérvico Uterino Invasor (1 al 8), Cérvix Uterino No Neoplásico (CN; I al V); y células A431 como control positivo para el receptor (C). La fracción membranal de los tejidos analizados, fué extraída y transferida a membrana Inmobilon P, como se describe en Métodos. El filtro se trató con el anticuerpo Ab-4 (Oncogene) a una dilución 1:75 y desarrollado con ECL de acuerdo a las instrucciones del kit. Las flechas muestran las diferentes bandas detectadas para el EGF-R. PM: peso molecular en kilodalton (kD).

F. Detección de Alteraciones en el Gen del EGF-R por Southern Blot en Cérvix Uterino No neoplásico y en Cáncer Cérvico Uterino Invasor

Se llevaron a cabo ensayos de Southern Blot para determinar posibles alteraciones en el gen que codifica para el EGF-R en los casos de CaCU, comparado con tejidos de CN. En este ensayo se utilizó, DNA genómico de células humanas A431 (que contienen de 15 a 25 copias del gen del EGF-R); y DNA genómico de placenta humana (como control normal). Cabe aclarar que no todos los tejidos de CN y CaCU, se analizaron por Southern Blot; sólo aquellos tejidos (2 de CN y 7 de CaCU) de los cuales se obtuvo DNA en suficiente cantidad y en buenas condiciones (no degradado), para los ensayos (10µg de DNA/muestra).

Para el análisis de hibridación por Southern blot, se digirieron cantidades iguales de DNA genómico con la enzima EcoRI (tanto para los tejidos de CN como para los de CaCU). El fragmento de 1.8Kb cortado con EcoRI del plásmido pHER64, se marcó con ³²P y se utilizó como sonda en el ensayo como se describió en Materiales y Métodos. Los resultados mostraron que el 71% (5/7) de los casos de CaCU analizados, tuvieron amplificación del gen del EGF-R como se muestra en la FIGURA 14 (pacientes 2, 3, 4, 6 y 7). El fragmento genómico EcoRI amplificado fué el de aproximadamente 5.3kb; mientras que en los tejidos de CN estudiados se observó una sola copia del gen del EGF-R (FIGURA 14, CN I y II). Basados en la cuantificación densitométrica del Southern Blot, se estimó que el gen del EGF-R está amplificado en las células A431 de acuerdo a lo reportado en la literatura (15 a 20 veces), y de 3 a 5 veces en los 5 casos de CaCU; en comparación con el gen del EGF-R de placenta humana y de los tejidos de CN, lo cual fué estadísticamente significativo ($p < 0.05$).

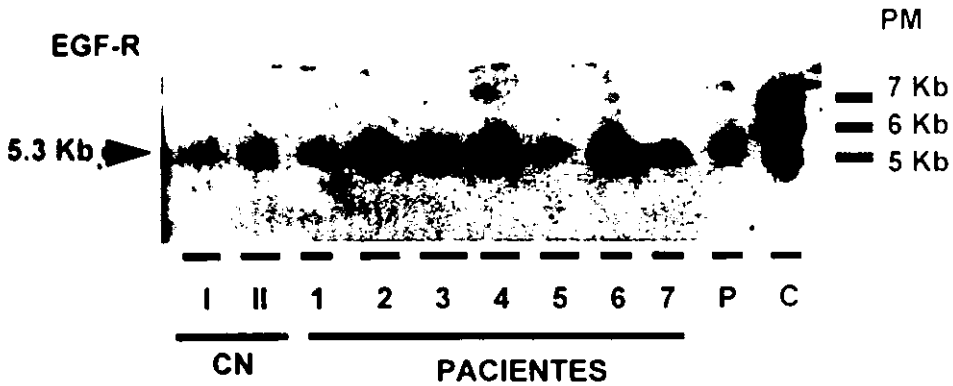


FIGURA 14

Análisis de Southern blot del DNA genómico de tejido de Cérvix No Neoplásico y de Cáncer. El DNA fué extraído de los tejidos de cérvix, digerido con EcoR1 y transferido a membrana de nylon como se indica en materiales y métodos. Las muestras de DNA de Cérvix Uterino No Neoplásico (CN), Cáncer Cérvico Uterino Invasor (pacientes 1 al 7), Placenta Humana (P) y células A431 (C), se hibridaron con la sonda de 1.8Kb (EcoR1) del plásmido pHER64, marcada con ^{32}P , como se indica en materiales y métodos. El filtro se expuso con XOMAT film por 7 días. La flecha muestra el gen normal de 5.3 Kb del EGF-R. PM: peso molecular en kilobases (kb).

G. Tipificación de Papilomavirus Humano (HPV) en Tejido de CN y en CaCU Invasor por Medio de Amplificación por PCR.

La TABLA 4 muestra los resultados obtenidos de la tipificación de HPV en los tejidos de CN y en los casos de CaCU. Nuestros resultados mostraron que todos los tejidos analizados de CaCU, fueron positivos para HPV. De los principales tipos de HPV detectados en las muestras, se encontraron los de alto riesgo como fueron los tipos 16, 18, 33, 35, 39, 45 y 58. De entre todos los diferentes tipos de papilomas, el tipo 16 fué el más frecuente con un 68% (15/22). En segundo lugar de importancia, se encontró al HPV tipo 18 con un 5% (1/22), aunque la combinación de los tipos de HPV 16/18 se presentó en el 14% (3/22). También se observaron tejidos con más de un tipo de papilomavirus; sin embargo, ésta condición fué en muy baja proporción de los tejidos de CaCU (1/22).

Al analizar los tejidos control por la técnica de Bauer, *et al.*, (1992), se encontró que todos ellos (5 muestras), fueron positivos para HPV. Sin embargo, mediante ésta técnica no fué posible realizar la tipificación de HPV. Por ello, fué necesario utilizar una técnica más sensible como la reportada por Gravitt, *et al.*, (1998), la cual se describió en materiales y métodos. A través de este ensayo, fué posible la tipificación de HPV en los tejidos control, y se encontró que el tipo 16 fué el más frecuente (40%; 2/5), seguido del tipo 18 (20%; 1/5) y una muestra resultó con 3 tipos de papiloma (16, 18 y 45). Finalmente, aún utilizando esta técnica más sensible, no fué posible tipificar el HPV de una de las muestras control.

Debido a que se analizó un número reducido de muestras de tejidos controles para la determinación de la presencia de DNA de HPV y además de que todas ellas resultaron ser positivas para este virus, no fue posible evaluar la importancia que pudiera tener este factor etiológico en relación a las variaciones en los niveles del EGF-R.

TABLA 4. TIPIFICACION DEL PAPILOMAVIRUS HUMANO (HPV), EN CERVIX UTERINO NO NEOPLASICO (CN) Y EN CANCER CERVICO UTERINO INVASOR (CaCU).

TIPO DE TEJIDO	NO. DE CASOS	TIPO DE PAPILOMAVIRUS DETECTADO	% DE MUESTRAS POSITI- VAS PARA HPV (Proporción)
CN	5	16	40 (2/5)
		18	20 (1/5)
		16, 18, 45	20 (1/5)
		+a	20 (1/5)
CaCU	22	16	68 (15/22)
		18	5 (1/22)
		16/18	14 (3/22)
		16, 33, 35, 58	5 (1/22)
		39	5 (1/22)
	45	5 (1/22)	

a Positivo para HPV, pero tué posible tipificarlo.

DISCUSION

Debido a que se tiene el conocimiento de que los Factores de Crecimiento y sus Receptores, tienen un papel central en la regulación del desarrollo de procesos neoplásicos, la expresión y acción de varias de éstas moléculas celulares en neoplasias humanas han sido extensamente estudiadas. Así, durante las pasadas dos décadas, diversos investigadores han descrito la amplificación del gen para el EGF-R así como la sobre-expresión de esta proteína receptora en muchos tumores humanos (Libermann, *et al.*, 1985; Sainsbury, *et al.*, 1987; Wong, *et al.*, 1992; García de Pallazo, *et al.*, 1993; Khalifa, *et al.*, 1994; Lipponen, *et al.*, 1994; Schlegel, *et al.*, 1994; Pfeiffer, *et al.*, 1996). Sin embargo, gran heterogeneidad en los resultados en relación a la sobre-expresión, intensidad y localización del EGF-R, así como en el significado pronóstico del mismo, han sido observados tanto dentro, como entre varios tipos tumorales. Tal es el caso del CaCU invasor que, aunque son diversos los reportes publicados con respecto al EGF-R en éste tipo de tumor; en realidad poco se conoce acerca del patrón y mecanismo de expresión de este receptor en neoplasias del cérvix; y menos aún, se ha podido determinar, la relevancia biológica del EGF-R en el desarrollo carcinogénico del cérvix uterino. En este trabajo se examinaron veintidos tumores de CaCU invasor, para determinar posibles alteraciones en la localización y niveles de expresión de la proteína receptora del EGF así como del RNAm y posibles mutaciones y/o amplificación en el gen que lo codifica, con la finalidad de conocer y definir la probable importancia biológica del EGF-R en el CaCU.

Como primer nivel de análisis, se determinó posibles alteraciones en la localización y niveles de expresión de los receptores del EGF por inmunohistoquímica y Western Blot respectivamente; utilizando para ello, los anticuerpos EGFR1 y el Ab-4 dirigidos contra el dominio extracelular e intracelular del receptor respectivamente.

La localización y distribución del EGF-R que se observó en el estrato epitelial de los tejidos control del CN, estuvo confinada a la capa basal y parabasal del epitelio, y se perdió en las células que migran hacia la superficie del mismo; lo cual fué semejante a la descrita previamente en otros reportes en los que trabajaron con tejido cervical humano (Gusterson, *et al.*, 1984; Göppinger, *et al.*, 1989; Berchuck, *et al.*, 1990; vanDam, *et al.*, 1991 y Dellas, *et al.*, 1996). Estas observaciones confirman lo sugerido por Göppinger, *et al.*, (1989) y Berchuck, *et al.*, (1990) en cuanto a que la expresión del EGF-R en el epitelio del tracto genital femenino, es característico de queratinocitos indiferenciados con actividad proliferativa; además de la existencia de una posible inhibición de la expresión del EGF-R en la fase terminal de diferenciación presentada por las células del estrato superficial del epitelio. Sin embargo, hay trabajos como el de Pfeiffer, *et al.*, (1998) que utilizando una técnica autoradiográfica en combinación con morfometría, reportó recientemente que los niveles de EGF-R en el epitelio cervical normal, fueron más altos en las células de la capa superficial del epitelio, comparados con los estratos proliferativos basal y parabasal del mismo; lo cual se contrapone totalmente con lo observado por otros autores y con nuestros resultados. Tal vez ésta discrepancia en lo reportado por Pfeiffer *et al.*, (1998), se deba básicamente a las distintas técnicas utilizadas así como a las diferentes sensibilidades de éstas.

Otro aspecto importante de los tejidos control de CN analizados, fué que la inmunoreacción para el EGF-R mostrada en la capa basal del epitelio, siempre fué fuerte (++); en tanto que la de la capa parabasal siempre fué moderada (+). Esta

observación coincide con lo reportado por Göppinger, *et al.*, (1989); Bauknecht, *et al.*, (1989) y Dellas, *et al.*, (1996).

Con respecto a los casos de CaCU la inmunoreacción del EGF-R fué detectada en el 91% de los casos analizados y la reacción fué localizada en las células epiteliales a lo largo de toda la lesión neoplásica; observación que coincide con lo reportado por otros investigadores (Göppinger, *et al.*, 1989; Bauknecht, *et al.*, 1989; Berchuck, *et al.*, 1990; Hayashi, *et al.*, 1991 y Dellas, *et al.*, 1996). Un aspecto importante, fué que en el 45% de los casos de CaCU inmunoreactivos para el EGF-R, el patrón de distribución de la señal fué del tipo Heterogénea; lo cual es equivalente a la mostrada por las células basales y parabasales de los tejidos control. Esta observación es novedosa para CaCU invasor; ya que autores como Gullick, *et al.*, (1986); Göppinger, *et al.*, (1989); Berchuck, *et al.*, (1989); Bauknecht, *et al.*, (1989) y Dellas, *et al.*, (1996); mencionan que los casos de CaCU que analizaron, tuvieron una inmunoreacción fuerte para el EGF-R, pero ésta fue homogénea en toda la lesión. Es posible que la diferencia entre nuestros resultados y los reportados por otros investigadores, se deba a que nosotros utilizamos tejidos en congelación. Esto permite que los tejidos y sitios antigénicos de las proteínas en estos cortes histológicos, estén mejor preservados, y en consecuencia, la sensibilidad y especificidad del sistema que utilizamos para visualizar al receptor, sea mejor en éste tipo de cortes histológicos.

Varios trabajos como los de vanDam, *et al.*, (1991); Maruo, *et al.*, (1992); y Dellas, *et al.*, (1996); utilizando la técnica inmunohistoquímica para determinar la presencia del EGF-R en CaCU, reportaron sobre-expresión de éste en los casos que analizaron. Nosotros no podemos hablar de sobre-expresión del EGF-R en los casos de CaCU que estudiamos, ya que las observaciones realizadas, fueron semi-

cuantitativas y comparativas con las determinadas en los tejidos de CN. Sin embargo, pudimos observar, que el 90% de los casos de CaCU inmunoreactivos, presentaron un mayor porcentaje de tejido reactivo (>50%), comparado con los tejidos control de CN en donde en su mayoría presentaron 25% de tejido reactivo. Esto nos sugiere que hay una mayor cantidad de células neoplásicas del CaCU, que expresan el receptor en comparación con el tejido de CN, lo que daría tal vez una medida indirecta de células en proliferación, y que sugiere la presencia de crecimiento tumoral. Esta observación se confirmó, con los resultados obtenidos en los ensayos de Hibridación *IN SITU* y que más adelante abordaremos.

Por otra parte, los dos casos de CaCU que resultaron negativos para el EGF-R con el anticuerpo EGFR-1, dieron una reacción positiva con el anticuerpo Ab-4 que reconoce la región intracelular del receptor. Esta observación sugiere, que el epítipo extracelular del receptor que reconoce el anticuerpo EGFR-1, no se encuentra accesible al anticuerpo por estar bloqueado ó truncado siendo incapaz éste de reconocerlo, como ya se ha reportado para otros tumores (Humphrey, *et al.*, 1988; Humphrey, *et al.*, 1991 y Moscatello, *et al.*, 1995). También es posible que ésta modificación, pudiera corresponder a alguna de las mutaciones del dominio extracelular del EGF-R que han sido descritas con anterioridad (EGFRvI, EGFRvII y EGFRvIII; Voldborg, *et al.*, 1997).

El análisis de Western Blot nos mostró que los tejidos control de CN como los casos de CaCU, contienen una banda protéica de 170 kDa que corresponde a la proteína receptora madura del EGF. Este hallazgo es relevante, ya que no existen reportes en relación a los niveles protéicos del EGF-R por Western Blot, en tejido normal y neoplásico del cérvix uterino. Esto se debe, básicamente, a los problemas técnicos que conllevan los ensayos de Western Blot, ya que el número de receptores

por célula en sí, es bajo; lo que requiere una gran cantidad de proteína para poder detectar alguna señal del EGF-R. También es posible que la alta ineficiencia en la transferencia de moléculas de alto peso molecular, como es el EGF-R (170 kDa), reduzcan los límites de detección del sistema. Además, cabe destacar, que tanto en los tejidos control de CN (20%) como en los casos de CaCU (50%); se detectó una segunda banda protéica de 130 kDa, la cual ya ha sido reportada previamente por Malden, *et al.*, (1988) y por Schlegel, *et al.*, (1994), en tumores de glioblastoma; y que para ellos representa un receptor truncado del EGF, producto de un rearreglo del gen que codifica a dicho receptor.

En el análisis cuantitativo del Western blot, se observó que los niveles protéicos del EGF-R en el 100% de los tejidos control de CN, fueron 2 veces más altos que los niveles del receptor determinados en el 75% de los casos de CaCU; lo que demuestra la falta de sobre-expresión del EGF-R en éstos casos de CaCU que nosotros analizamos. Este resultado no coincide con lo reportado previamente por Malden *et al.*, (1988), Schlegel, *et al.* (1994) y Moscatello, *et al.*, (1995), quienes trabajando con glioblastomas, carcinomas de mama y ovario respectivamente, encontraron altos niveles protéicos del EGF-R en los tumores, comparados con bajos niveles detectados en los tejidos normales. Además, investigaciones recientes utilizando ensayos de unión ó inmunoenzimáticos, han reportado altos niveles de expresión del EGF-R en CaCU comparados con los niveles detectados en el epitelio normal de cérvix (Lagrange, *et al.*, 1993 y Kim, *et al.*, 1996). Sin embargo, en el último año, estudios de citofluorometría (Kimming, *et al.*, 1997); o de autoradiografía en combinación con morfometría (Pfeiffer, *et al.*, 1998); han demostrado que los casos de CaCU tienen significativamente reducidos los niveles del EGF-R, en comparación con los detectados en el epitelio normal del cérvix; lo cual apoyaría lo observado por nosotros en los ensayos de Western blot.

Los resultados contradictorios en relación a la expresión del EGF-R en el tejido cervical ya sea tumoral o normal, es posible que se deba a los distintos métodos empleados para determinar cuantitativamente los niveles de expresión del receptor; ya que la sensibilidad de cada uno de los ensayos, es diferente. Otra posibilidad, es que en aquellas técnicas donde se requiere de homogenización del tejido, la cantidad de receptores para el EGF esté subestimando; ya que en el homogenado celular existe una mezcla de células epiteliales y estroma, siendo en éste último tipo celular de baja expresión para el EGF-R (Kohler, *et al.*, 1989 y Berchuck, *et al.*, 1990). Una tercera posibilidad un tanto mecanística, es que probablemente los niveles de expresión de los ligandos que se unen al EGF-R, como el EGF y principalmente el TGF- α , se encuentren presentes en altas concentraciones en éste tipo de neoplasia (Bauknecht, *et al.*, 1989; Xynos, *et al.*, 1992; Konishi, *et al.*, 1994; Dellas, *et al.*, 1996 y Pfeiffer, *et al.*, 1997); lo que podría resultar en una subestimación del contenido de EGF-R, debido al bloqueo y/o a la utilización del receptor por un mecanismo de estimulación de tipo intrácrina. Tal es el caso observado de las células NIH3T3 transformadas con diferentes oncogenes (*ras*, *mos*, *src*, *fms*, *fes*, *met* y *trk*); que al expresar niveles elevados de TGF- α en particular, presentan una reducción del 75 al 95% en el número total de EGF-R en superficie celular (Ciardiello, *et al.*, 1990); lo que apoya nuestra teoría de subestimación del receptor, debido a una estimulación de tipo intrácrina.

Como segundo nivel de análisis, se trató de determinar posibles alteraciones en el patrón de expresión del RNAm del EGF-R, por Hibridación *IN SITU*. El patrón de expresión del RNAm del EGF-R en los tejidos control de CN que se analizaron, se localizó únicamente en áreas que mostraron actividad proliferativa y carentes de diferenciación; es decir, en los estratos basal y parabasal del epitelio cervical; lo cual fué semejante a lo descrito previamente (Mittal, *et al.*, 1990; y Glynne-Jones, *et al.*,

1996), y que coincide con lo observado en los ensayos de inmunohistoquímica antes revisados. Ambos resultados, nos confirman el hecho de que la expresión del EGF-R en el epitelio del tracto genital femenino, es característica de células indiferenciadas con actividad proliferativa (Göppinger, *et al.*, 1989; y Berchuck, *et al.*, 1990). Cabe mencionar, que el uso en inmunohistoquímica de un anticuerpo que reconoce el dominio extracelular del receptor, y la utilización de una sonda, en hibridación *IN SITU*, que codifica para ésta misma región del receptor; permite una comparación directa entre el RNAm y la expresión protéica del receptor; lo que nos confirma la especificidad y veracidad de los resultados obtenidos.

Con respecto a los casos de CaCU, el patrón de expresión del RNAm del EGF-R, se localizó en todo el epitelio neoplásico; lo que era predecible, por los resultados obtenidos en los ensayos inmunohistoquímicos en éstos mismos tejidos tumorales y por lo reportado por Glynne-Jones, *et al.*, (1996). La localización del RNAm del EGFR en tejido tumoral invasor del cérvix se observó en núcleo; lo cual fué semejante a lo reportado por Glynne-Jones, *et al.*, (1996) en células tumorales de próstata. Al analizar los resultados cuantitativos del ensayo de Hibridación *IN SITU*, se observó primeramente, que en los casos de CaCU hubo un porcentaje mayor de células que expresaron RNAm para el EGF-R, en comparación con lo observado en los tejidos de CN. Este alto porcentaje de células que expresan RNAm para el EGF-R en células tumorales del cérvix, no se relacionó con un mayor porcentaje de tejido inmunoreactivo para el EGFR a nivel de inmunohistoquímica; lo que probablemente demuestra, la importancia del procesamiento postraducciona del EGF-R. Además, en el análisis se determinó que el 43% de los casos de CaCU, sobre-expresaron RNAm para el EGF-R, comparado con lo obtenido en tejidos de CN.

Por otra parte, el hecho de haber demostrado la existencia de 3 subgrupos bien definidos de acuerdo al contenido de RNAm para el EGF-R dentro de los casos de CaCU analizados, nos muestra que hay una gran heterogeneidad celular en los tejidos tumorales. De los 3 subgrupos analizados se pudo observar un grupo con niveles de expresión del receptor semejantes a lo observado en los tejidos de CN (subgrupo I); un grupo de expresión intermedia del EGF-R a nivel de transcrito (subgrupo II) y los casos en los que se observó un alto contenido de RNAm (subgrupo III), sobrepasando hasta en un 300% el contenido detectado en los tejidos control. A pesar de tener estos grupos muy definidos en relación a la expresión del RNAm, no nos fué posible correlacionar ésto con algún parámetro clínico de importancia para CaCU; además de que fué un número reducido de casos el que se analizó en éste estudio. Sin embargo, lo que sí podemos concluir, es que la técnica de Hibridación *IN SITU*, además de ser más sensible que la inmunohistoquímica; es una herramienta particularmente útil en el estudio de tejidos de cérvix uterino, porque demuestra la distribución topográfica del RNAm del EGF-R en un tejido.

En el tercer nivel de análisis, se determinaron posibles alteraciones en el gen que codifica para el EGF-R por Southern Blot. Los resultados mostraron que el 100% de los tejidos de CN y sólo un 29% de los casos analizados de CaCU, presentaron una sola copia del gen. El restante 71% de los casos de CaCU analizados, mostraron amplificación del gen de EGF-R. Este resultado es de destacar, ya que sólo existen 2 trabajos en los cuales llevaron a cabo el análisis del gen del EGF-R en cérvix uterino neoplásico; como es el reporte de Gullick, *et al.*, (1986), quienes estudiaron un sólo caso de CaCU y no demostraron alteración alguna en el gen del receptor. El otro trabajo es el de Bernstein, *et al.*, (1988), quienes trabajando con cinco líneas celulares derivadas de CaCU epidermoide, detectaron sólo en una de ellas, amplificación del gen del receptor.

En general, el análisis a nivel del gen del EGF-R se ha llevado a cabo en pocos tipos tumorales; siendo el glioblastoma el más estudiado al respecto y en donde se ha determinado amplificación de hasta un 40% de las muestras analizadas para el gen del receptor (Liberman, *et al.*, 1985); ó bien rearrreglo del gen en el 18% de los casos que se estudiaron (Malden, *et al.*, 1988 y Schlegel, *et al.*, 1994). En todos éstos reportes, el patrón de hibridación para el gen del EGF-R, en el DNA genómico de los tejidos tumorales es la amplificación; lo cual es similar al mostrado por A431, cuando se usa el mismo fragmento de cDNA del gen del EGF-R, como sonda (1.838 Kb). Nuestros resultados derivados del análisis de Southern Blot en tejido tumoral y normal de cérvix uterino, coinciden en parte con los reportes anteriores, en donde se detectó la banda de 5.3 Kb que coincide con la banda del receptor normal, sólo que amplificada. En estos casos no se observaron las bandas de 7 y 8 Kb como lo reportado para glioblastomas y para células A431, ya que al parecer es sólo amplificación lo observado en nuestras muestras y no rearrreglos ó deleciones en el gen (Schlegel, *et al.*, 1994). También es posible que la cantidad de DNA analizada haya sido reducida y en el experimento no se pudieran detectar estas otras bandas.

En cuanto al grado de amplificación del gen del receptor detectado en los casos analizados de CaCU, este parece estar amplificado hasta 3 veces; lo cual es menor a lo reportado en glioblastomas (Libermann, *et al.*, 1985; Malden, *et al.*, 1988 y Schlegel, *et al.*, 1994); cáncer de pulmón (Hunts, *et al.*, 1985) y estómago (Lemoine, *et al.*, 1991); que van de 10 a 30 veces de amplificación. Sin embargo, el grado de amplificación del gen del receptor que nosotros detectamos (1 a 3 veces), fué similar al reportado en líneas celulares derivadas de carcinoma epidermoide (Yamamoto, *et al.*, 1986); lo cual nos sugiere que el grado de amplificación de este gen, puede ser diferente dependiendo del tipo de tejido.

En general, cabe destacar que la alteración y/ó rearrreglo del gen del EGF-R, no es un evento muy común que haya sido reportado ya sea en líneas celulares (Yamamoto, *et al.*, 1986) ó en tejido tumoral humano (Hunts, *et al.*, 1985; Lemoine, *et al.*, 1991 y Bauknecht, *et al.*, 1993); a pesar de la frecuente sobre-expresión del EGF-R en diferentes tipos de cáncer. De esta manera la amplificación del gen, puede explicar el incremento de la expresión protéica del receptor, pero sólo en un número limitado de situaciones. Por lo que nuestros resultados adquieren enorme interés para ser analizados en un mayor número de pacientes.

Como un análisis complementario debido a la posible correlación entre Papiomavirus humano (HPV) y EGF-R, se realizó la determinación de la presencia de DNA de HPV por los métodos indicados. El análisis de tipificación de HPV, nos mostró que todos los tejidos estudiados, tanto de CN como los de CaCU, fueron positivos para éste virus. La presencia de HPV en los casos de CaCU era de esperarse, debido a la participación que tiene este virus como factor etiológico en el desarrollo de este tipo de cáncer (zur Hausen, 1991). Sin embargo, el hecho de que todas las muestras analizadas de CN hayan resultado positivas para HPV, se debe tomar con reserva, debido a que el número de tejidos control en los que se tipificó HPV, fué muy reducido y que tal vez los tejidos normales utilizados no fueron idealmente libres de infección por HPV, aunque presentaron una citología normal. Debido a que el HPV se presentó tanto en tejidos normales como en los de CaCU, no se pudo evaluar la importancia de éste factor etiológico en relación al desarrollo del CaCU y la presencia del EGF-R.

Finalmente, ya que si fué posible identificar alteraciones en el receptor para el EGF en los diferentes niveles que se analizaron (proteína, RNAm y DNA) en pacientes con CaCU invasor; se trató de correlacionar los resultados obtenidos con algunos de los parámetros clínicos de importancia para éste tipo de neoplasia: como edad,

diagnóstico clínico e histopatológico y sobrevida; con la reserva que el número de casos incluidos en el estudio, fué reducido para fines de significancia estadística; pero que sin embargo, nos proporcionó puntos de referencia para futuros estudios al respecto.

Al hacer el análisis de correlación entre los resultados obtenidos en cada nivel de estudio del EGF-R en su conjunto, con los parámetros clínicos antes mencionados; se encontró que el 30% (4/13) de las pacientes que presentaron amplificación en el gen del EGF-R y altos niveles de RNAm mostraron tumores más agresivos; ya que a 5 años de seguimiento, presentaron actividad tumoral progresiva. Lo cual nos puede sugerir, que las alteraciones del EGF-R a nivel de RNAm y DNA, son parámetros que probablemente nos den mayor información en cuanto a la agresividad del tumor en pacientes con CaCU; más que la sobre-expresión de la proteína receptora (factor que se ha tomado como pronóstico y que se ha cuestionado en los últimos años). Es posible que los niveles de expresión protéica del EGF-R sean subestimados; debido a su utilización a través de un mecanismo de estimulación de tipo intrácrina. Por lo que es necesario llevar a cabo un estudio con un mayor número de casos de CaCU, para concretar éstas observaciones preliminares.

La carencia de significado pronóstico del EGF-R en CaCU, puede deberse a diversos factores; como: 1) el uso de diferentes técnicas para evaluar la presencia de la proteína receptora; 2) la subestimación de la presencia del EGF-R en biopsias de pacientes, ya que contienen poblaciones de células tumorales y normales en el mismo tejido; lo que diluye los altos niveles del receptor; 3) la regulación del EGF-R puede ser tejido-específico; así que el significado biológico del sistema EGF ó TGF- α /EGF-R, dependerá del tejido en estudio (Scambia, *et al.*, 1994 y Wikstrand, *et al.*, 1998); y 4) es posible que niveles incrementados de EGF/TGF- α pudieran conducir a una subestimación del contenido de proteínas receptoras debido al bloqueo y/ó a la

pérdida de receptores por estimulación intrácrina, como lo observado en células NIH3T3 (Ciardiello, *et al.*, 1990). Al respecto, los pocos trabajos realizados en relación a la determinación de los niveles de EGF/TGF- α en tejido cervical y su posible importancia en CaCU, aún siguen siendo controversiales (Bauknecht, *et al.*, 1989; Pfeiffer, *et al.*, 1989; Deltas, *et al.*, 1996; Pfeiffer, *et al.*, 1998). Sin embargo, la determinación tanto de los niveles específicos de EGF y TGF- α así como el contenido real de sus receptores (EGF-R) en el mismo tejido tumoral de CaCU, será de suma importancia para dilucidar el papel que tiene el sistema EGF/TGF- α /EGF-R en el desarrollo biológico y clínico del CaCU.

CONCLUSIONES

1. Por ensayos de Inmunohistoquímica, se detectó que el 90% de los casos de CaCU, mostraron un mayor porcentaje de tejido reactivo para el EGF-R con respecto al tejido control de CN.
2. Por ensayos de Western blot, se observó que sólo el 25% de los casos de CaCU, mostraron sobre-expresión protéica del EGF-R con respecto al tejido control de CN.
3. Por ensayos de Hibridación *IN SITU*, se detectó que el 90% de los casos de CaCU, mostraron un mayor porcentaje de células (95%) que expresan RNAm para el EGF-R con respecto al tejido control de CN (84%).
4. También por ensayos de Hibridación *IN SITU*, se detectó que el 43% de los casos de CaCU, sobre-expresan RNAm para el EGF-R con respecto al tejido control de CN.
5. Dentro de los casos de CaCU, se detectaron 3 subgrupos de acuerdo al contenido de RNAm para el EGF-R: el subgrupo I, con un contenido de RNAm semejante al observado en el tejido control de CN; el subgrupo II, con un contenido de RNAm 100% más que el detectado en el CN y el subgrupo III, con un contenido de RNAm 300% más que el observado en el CN.
6. Por ensayos de Southern blot, se observó que el 70% de los casos de CaCU, mostraron amplificación del gen que codifica para el EGF-R con respecto al tejido control de CN.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aaronson, S. Growth Factors and Cancer. Science. 254:1146-1152. (1991).
- Banks, L., and Matlashewski, G. Cell Transformation and the HPV E5 Gene. Papillomavirus Report. 4(1):1-4. (1993).
- Barker, S., Panahy, C., Puddefoot, J.R., *et. al.* Epidermal Growth Factor Receptor and Oestrogen Receptors in the non-Malignant Part of the Cancerous Breast. Br. J. Cancer. 60:673-677. (1989).
- Bauer, H.M., Greer, C.E., Manos, M.M. (1992). Determination of Genital HPV Infection Using Consensus PCR. In Diagnostic Molecular Pathology: A Practical Approach. (CS Herrington & McGee, JOD., eds.), pp 131-152. Oxford University Press, Oxford UK.
- Bauknecht, T., Kohler, M., Janz, I., *et. al.* The Occurrence of Epidermal Growth Factor Receptors and the Characterization of EGF-like Factors in Human Ovarian, Endometrial, Cervical and Breast Cancer. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 115:193-199. (1989).
- Bauknecht, T., Angel, P., Kohler, M., *et. al.* Gene Structure and Expression Analysis of the Epidermal Growth Factor Receptors, Transforming Growth Factor Alpha, myc, jun, and Metallothione in Human Ovarian Carcinomas. Cancer. 71:419-429. (1993).
- Ben-Bassat, H., Rosenbaum-Mitrani, S., Hartzstark, Z., *et. al.* Inhibitors of Epidermal Growth Factor Receptor Kinase and of Cyclin-dependent Kinase 2 Activation Induce Growth Arrest, Differentiation, and Apoptosis of Human Papillomavirus 16-Immortalized Human Keratinocytes. Cancer Res. 57:3741-3750. (1997).
- Bernard, H.U., Chan, S.Y., Manos, M.M., *et. al.* Identification and Assessment of Known and Novel Human Papillomaviruses by Polymerase Chain Reaction Amplification, Restriction Fragment Length Polymorphisms, Nucleotide Sequence, and Phylogenetic Algorithms. J. Infect. Dis. 170:1077 - 1085. (1994).
- Berchuck, A., Soisson, A.P., Olt, G.J., *et. al.* Epidermal Growth Factor Receptor Expression in Normal and Malignant Endometrium. Am. J. Obstet. Gynecol. 161:1247-1252. (1989).
- Berchuck, A., Rodríguez, G., Kamel, A., *et. al.* Expression of Epidermal Growth Factor Receptor and HER-2/Neu in Normal and Neoplastic Cervix, Vulva, and Vagina. Obstet Gynecol. 76(3):381-387. (1990).

- Berchuck, A., Rodríguez, G., Kamel, A., *et. al.* Epidermal Growth Factor Receptor Expression in Normal Ovarian Epithelium and Ovarian Cancer. Am. J. Obstet. Gynecol. 164:669-674. (1991).
- Bernstein, W., Zou, Z., Black, R., *et. al.* Association of Interferon-Gamma Induced Growth Inhibition and Modulation of Epidermal Growth Factor Receptor Gene Expression in Squamous Cell Carcinoma Cell Lines. J. Biol. Regul. Homeost. Agents. 2(4):186-192. (1988).
- Bigner, S.H., Humphrey, P.A., Wong, A.J., *et. al.* Characterization of the Epidermal Growth Factor Receptor in Human Glioma Cell Lines and Xenografts. Cancer Res. 50:8013-8017. (1990).
- Bos, J.L. ras Oncogenes in Human Cancer: a Review. Cancer Res. 49: 4682-4689. (1989).
- Bradford, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Anal. Biochem. 72:248-254. (1976).
- Busby-Earle, R.M., Steel, C.M., Williams, A.R., *et. al.* p53 Mutations in Cervical Carcinogenesis -Low Frequency and Lack of Correlation with Human Papillomavirus Status. Br. J. Cancer. 69: 732-737. (1994).
- Carpenter, G. Receptors for Epidermal Growth Factor and other Polypeptide Mitogens. Annu. Rev. Biochem. 56:881-914. (1987).
- Carpenter, G. and Cohen, S. Epidermal Growth Factor. Minireview. J. Biol. Chem. 265(14):7709-7712. (1990).
- Carpenter, C.D., Ingraham, H.A., Cochet, C., *et. al.* Structural Analysis of the Transmembrane Domain of the Epidermal Growth Factor Receptor. J. Biol. Chem. 266(9): 5750-5755. (1991).
- Castellani, R., Visscher, D., Wykes, S., *et. al.* Interaction of TGF- α and EGFR in Breast Carcinoma. Cancer. 73:344-339. (1994).
- Ciardiello, F., Valverius, M., Colucci-D'Amato, L., *et. al.* Differential Growth Factor Expression in Transformed Mouse NIH-3T3 Cells. J. Cell. Bioch. 42:45-57. (1990).
- Cohen, B.D., Goldstein, D.J., Rutledge, L., *et. al.* J. Virol. 67:5303-5311. (1993).
- Damjanov, I., Mildner, B. and Knowles, B.B. Immunohistochemical Localization of the Epidermal Growth Factor Receptor in Normal Human Tissues. Lab. Invest. 55(5):588-592. (1986).

- Dellas, A., Schultheiss, E., Almendral, A., *et. al.* Assessment of EGFR and TGF- α expression en Relationship to HPV Status and KI-67 Distribution in Cervical Intraepithelial Neoplasms. Int. J. Cancer. 69:165-169. (1996).
- Derynck, R. Transforming Growth Factor α . Cell. 54:593-595. (1988).
- Deuel, T.F. Polypeptide Growth Factors. Review. Annu. Rev. Cell. Biol. 3:443-492. (1987).
- De Villiers, E.M. Heterogeneity of the human Papillomavirus Group. J. Virol. 63:4898-4903. (1989).
- DeVita, V., Hellman, S. and Rosenberg, S. Cancer: Principles and Practice of Oncology. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, USA. 1997.
- Devitt, J.L., Chew, K., Sauter, G., *et. al.* Prevalence and Prognostic Significance of HER2/neu and Epidermal Growth Factor Receptor in Ovarian Cancer. J. Exp. Clin. Cancer Res. 14(4):329-334. (1995).
- Eccles, S.A., Modjtahedi, H., Box, G., *et. al.* Significance of the e-erbB Family of Receptor Tyrosine Kinases in Metastatic Cancer and Their Potential as Targets for Immunotherapy. Invasion Metastasis. 14:337-348. (1994).
- Enomoto, T., Inoue, M., Perantoni, A., *et. al.* K-ras Activation in Neoplasms of the Human Female Reproductive Tract. Cancer Res. 50:6139-6145. (1990).
- Fantl, W.J., Johnson, D.E. and Williams, L.T. Signalling by Receptor Tyrosine Kinases. Annu. Rev. Biochem. 62:453-481. (1993).
- García de Pallazzo, I., Adams, G.P., Sundareshan, P., *et. al.* Expression of Mutated Epidermal Growth Factor Receptor by non Small Cell Lung Carcinomas. Cancer Res. 53:3217-3220. (1993).
- Giri, I. and Danos, O. Papillomavirus Genomes: from sequence data to biological properties. Trends in Genetics. 2:227. (1986).
- Glynn-Jones, E., Goddard, L., Harper, M.E. Comparative Analysis of mRNA and Protein Expression for Epidermal Growth Factor Receptor and Ligands Relative to the Proliferative Index in Human Prostate Tissue. Hum. Pathol. 27(7):688-694. (1996).
- Göppinger, A., Wittmaack, F.M., Wintzer, H.O., *et. al.* Localization of Human Epidermal Growth Factor Receptor in Cervical Intraepithelial Neoplasias. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 115:259-263. (1989).

- Goustin, A.S., Leof, E. B., Shipley, G.D., *et. al.* Growth Factors and Cancer. Cancer Res. 46:1015-1029. (1986).
- Gravitt, P.E., Peyton, C.L., Aple, R.J., and Wheeler, C.M. Genotyping of 27 human papillomavirus types by using L1 consensus PCR products by a single hybridization, reverse line blot detection method. J. Clin. Microbiol. 36(10):3020-3027. (1998).
- Gullick, W.J., Marsden, J.J., Whittle, N., *et. al.* Expression of Epidermal Growth Factor Receptors on Human Cervical, Ovarian, and Vulval Carcinomas. Cancer Res. 46:285-292. (1986).
- Gusterson, B., Cowley, G,m Smith, J,A., *et. al.* Cellular Localisation of Human Epidermal Growth Factor Receptor. Cell. Biol. Intern. Reports. 8(8):649-658. (1984).
- Hale, R.J., Buckley, C.H., Gullick, W.J., *et. al.* Prognostic Value of Epidermal Growth Factor Receptor Expression in Cervical Carcinoma. J. Clin. Pathol. 46:149-153. (1993).
- Hatch, K. Preinvasive Cervical Neoplasia. Seminars in Oncology. 21(1): 12-16. (1994).
- Hayashi, Y., Hachisuga, T., Iwasaka, T., *et. al.* Expression of ras Oncogene Product and EGF Receptor in Cervical Squamous Cell Carcinomas and its Relationship to Lymph Node Involvement. Gynecol. Oncol. 40:147-151. (1991).
- Henzen-Logmans, S.C., Berns, E.M., Klijn, J.G., *et. al.* Epidermal Growth Factor Receptor in Ovarian Tumors: Correlation of Immunohistochemistry with Ligand Binding Assay. Br. J. Cancer. 66(6):1015-1021. (1992).
- Holm, R., Skomedal, H., Helland, A., *et. al.* Immunohistochemical Analysis of p53 Protein Overexpression in Normal, Premalignant, and Malignant Tissues of the Cervix Uteri. J. Pathol. 169: 21-26. (1993).
- Hu, G., Liu, W., Mendelsohn, J., *et. al.* Expression of Epidermal Growth Factor Receptor and Human Papillomavirus E6/E7 Proteins in Cervical Carcinoma Cells. J. Nat. Cancer Inst. 89(17):1271-1276. (1997).
- Huang, H.J., Nagane, M., Klingbeil, C., K., *et. al.* The Enhanced Tumorigenic Activity of a Mutant Epidermal Growth Factor Receptor Common in Human Cancers is Mediated by Threshold Levels of Constitutive Tyrosine Phosphorylation and Unattenuated Signaling. J. Biol. Chem. 272:2927-2935. (1997).

- Humphrey, P.A., Wong, A.J., Vogelstein, B., *et. al.* Amplification and Expression of the Epidermal Growth Factor Receptor Gene in Human Glioma Xenografts. Cancer Res. 48:2231-2238. (1988).
- Humphrey, P.A., Wong, A.J., Vogelstein, B., *et. al.* Anti-synthetic Peptide Antibody Reacting at the Fusion Junction of Deletion-mutant Epidermal Growth Factor Receptor in Human Glioblastoma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87:4207-4211. (1990).
- Humphrey, P.A., Gangarosa, L.M., Wong, A.J., *et. al.* Deletion Mutant Epidermal Growth Factor Receptor in Human Gliomas: Effect of Type II Mutation on Receptor Function. Biochem. Biophys. Res. Comm. 178:1413-1420. (1991).
- Hunts, J., Ueda, M., Ozawa, S., *et. al.* Hyperproduction and Gene Amplification of the Epidermal Growth Factor Receptor in Squamous Cell Carcinomas. Jpn. J. Cancer Res. (Gann). 76:663-666. (1985).
- Itakura, Y., Sasano, H., Shiga, Ch., *et. al.* Epidermal Growth Factor Receptor Overexpression in Esophageal Carcinoma. Cancer. 74:795-804. (1994).
- Kageyama, R., Merlino, G.T. and Pastan I. Epidermal Growth Factor (EGF) Receptor Gene Transcription. J. Biol. Chem. 263(13): 6329-6336. (1988).
- Khalifa, M., Abdoh, A., Mannel, R., *et. al.* Prognostic Utility of Epidermal Growth Factor Receptor Overexpression in Endometrial Adenocarcinoma. Cancer. 73:370-376. (1994).
- Kihana, T., Tsuda, H., Teshima, S. *et. al.* Prognostic Significance of the Overexpression of c-erbB-2 Protein in Adenocarcinoma of the Uterine Cervix. Cancer. 73: 148-153. (1994).
- Kim, J.W., Kim, Y.T., Kim, K.D., *et. al.* Expression of Epidermal Growth Factor Receptor in Carcinoma of the Cervix. Gynecol. Oncol. 60:283-287. (1996).
- Kimming, R., Pfeiffer, D., Landsmann, H., and Hepp, H. Quantitative Determination of the Epidermal Growth Factor Receptor in Cervical Cancer and Normal Cervical Epithelium by 2-Color Flow Cytometry: Evidence for Down-Regulation in Cervical Cancer. Int. J. Cancer. 74:365-373. (1997).
- Kris, R.M., Lax, I., Gullick, W.J., *et. al.* Antibodies Against a Synthetic Peptide as a Probe for the Kinase Activity of the Avian EGF Receptor and v-erbB Protein. Cell. 40:619-625. (1985).

- Kohler, M., Janz, I., Wintzer, H., *et. al.* The Expression of Epidermal Growth Factor Receptors, EGF-like Factors and c-myc in Ovarian and Cervical Carcinomas and their Potential Clinical Significance. Anticancer Res. 9:1537-1548. (1989).
- Laemmli, U.K. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685. (1970).
- Lagrange, J.L. Francoual, M., Formento, J.L., *et. al.* Demonstration and Characterization of EGF Receptors in Cancer the Uterine Cervix. Bull Cancer (Paris). 80(3): 219-224. (1993).
- Laurence, D.J.R., and Gusterson, B.A. The Epidermal Growth Factor. Tumor Biol. 11:229-261. (1990).
- Lazcano, E., Hernández, M., López, L., *et. al.* Factores de Riesgo Reproductivo e Historia de Vida Sexual Asociados a Cáncer Cervical en una Muestra de Mujeres de la Cd. de México. Rev. Invest. Clin. (Méx.) 47:377. (1995).
- Lelle, J.R., Talavera, F., Gretz, H., *et. al.* Epidermal Growth Factor Receptor Expression in Three Different Human Endometrial Cancer Cell Lines. Cancer. 72:519-525. (1993).
- Lemoine, N.R., Jain, S., Silvestre, F., *et. al.* Amplification and Overexpression of the Epidermal Growth Factor Receptor and c-erbB-2 Proto-oncogenes in Human Stomach Cancer. Br. J. Cancer. 64:79-83. (1991).
- Libermann, T.A., Nusbaum, H.R., Razon, N., *et. al.* Amplification Enhanced Expression and Possible Rearrangement of EGF Receptor Gene in Primary Human Brain Tumors of Glial Origin. Nature. 313:144-147. (1985).
- Lipponen, P., and Eskelinen, M. Expression of Epidermal Growth Factor Receptor in Bladder Cancer as Relates to Established Prognostic Factors, Oncoprotein (c-erbB-2, p53) Expression and Long-Term Prognosis. Br. J. Cancer. 69:1120-1125. (1994).
- Malden, L.T., Novak, U., Kaye, A., *et. al.* Selective Amplification of the Cytoplasmic Domain of the Epidermal Growth Factor Receptor Gene in Glioblastoma Multiforme. Cancer Res. 48:2711-2714. (1988).
- Maniatis, T. (1989). Molecular cloning, a laboratory manual. Cold. Spring Harbor Laboratory, New York.
- Manos, M.M., Ting, Y., Wright, D.K., *et. al.* The Use of Polymerase Chain Reaction Amplification for the Detection of Genital Human Papillomaviruses. Cancer Cells. 7:209-214. (1989).

- Mansur, C.P., and Androphy, E.J. Cellular Transformation by Papillomavirus Oncoproteins. Bioch. Bioph. Acta. 1155:323-345. (1993).
- Martin, P., Vass, W.C., Schiller, J.T., *et. al.* The Bovine Papillomavirus E5 Transforming Protein can Stimulate the Transforming Activity of EGF and CSF-1 Receptors. Cell. 59:21-32. (1989).
- Maruo, T., Yamasaki, M., Ladines-Lave, C.A., *et. al.* Immunohistochemical Demonstration of Elevated Expression of Epidermal Growth Factor Receptor in the Neoplastic Changes of Cervical Squamous Epithelium. Cancer. 69(5):1182-1187. (1992).
- Massagué, J. Transforming Growth Factor- α . Biochem. Mol. Cell. 265(35):21393-21396. (1990).
- Massagué, J., and Pandiella, A. Membrane-Anchored Growth Factors. Annu. Rev. Biochem. 62:515-541. (1993).
- Mittal, K., Pearson, J., and Demopoulos, R. Patterns of mRNA for Epidermal Growth Factor Receptor and Keratin-B-2 in Normal Cervical Epithelium and in Cervical Intraepithelial Neoplasia. Gynecol. Oncol. 38:224-229. (1990).
- Miyazawa, K. Role of Epidermal Growth Factor in Obstetrics and Gynecology. Obstet. Gynecol. 79:1032-1040. (1992).
- Mohar, A., Frías, M., Suchil, L., *et. al.* Epidemiología del Cáncer Cérvicouterino en México. Annals Oncology. (Edición Española). 7(sup 4):s222-s227. (1998).
- Moscattello, D., Holgado, M., Godwin, A., *et. al.* Frequent Expression of a Mutant Epidermal Growth Factor Receptor in Multiple Human Tumors. Cancer Res. 55:5536-5539. (1995).
- Münger, K., Scheffner, M., Huibregtse, J., *et. al.* Interactions of HPV E6 and E7 Oncoproteins with Tumour Suppressor Gene Products. Cancer Surveys. 12:197-217. (1992).
- Münger, K. The Molecular Biology of Cervical Cancer. J. Cell. Biochem. Supplement. 23:55-60. (1995).
- Muñoz, N., and Bosch, X. Cervical Cancer and Human Papillomavirus: Epidemiological Evidence and Perspectives for Prevention. Salud Pública de México. 39(4):274-282. (1997).
- Nicholson, S. Quantitative assays of epidermal growth factor receptor in human breast cancer: cut-off points of clinical relevance. Int. J. Cancer. 42:36-41. (1988).

- Nishikawa, R., Xiang-Dong, J., Harmon, R.C., *et. al.* A Mutant Epidermal Growth Factor Receptor Common in Human Glioma Confers Enhanced Tumorigenicity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91:7727-7731. (1994).
- Ocadiz, R., Saucedo, R., Cruz, M., *et. al.* High Correlation Between Molecular Alterations of the c-myc Oncogene and Carcinoma of the Uterine Cervix. Cancer Res. 47: 4173-4177. (1987).
- Oberg, K.C. Growth Factor Differentiation: Factors and Citokines. A. Habenicht Ed. Springer-Verlag. Alemania. p.p.476. (1990).
- Oka, K., Nakano, T., and Arai, T. c-erbB-2 Oncoprotein Expression is Associated with Poor Prognosis in Squamous Cell Carcinoma of the Cervix Cancer. 73:668-671. (1994).
- Parker, M.F., Arroyo, G.F., Geradts, J., *et. al.* Molecular Characterization of Adenocarcinoma of the Cervix. Gynecol. Oncol. 64: 242-251. (1997).
- Pfeiffer, D., Stellwag, B., Pfeiffer, A., *et. al.* Clinical Implications of the Epidermal Growth Factor Receptor in the Squamous Cell Carcinoma of the Uterine Cervix. Gynecol. Oncol. 33:146-150. (1989).
- Pfeiffer, P., Clausen, P.P., Andersen, K., *et. al.* Lack of Prognostic Significance of Epidermal Growth Factor Receptor and the Oncoprotein p185HER-2 in patients with Systemically Untreated non Small-Cell Lung Cancer: An Immunohistochemical Study on Cryosections. Br. J. Cancer. 74:86-91. (1996).
- Pfeiffer, D., Spranger, J., Al-Deiri, M., *et. al.* mRNA Expression of Ligands of the Epidermal-Growth-Factor-Receptor in the Uterus. Int. J. Cancer. 72:581-586. (1997).
- Pfeiffer, D., Kimmig, R., Herrman, J., *et. al.* Epidermal-Growth-Factor Receptor Correlates Negatively with Cell Density in Cervical Squamous Epithelium and is Down-Regulated in Cancers of the Human Uterus. Int. J. Cancer. (Pred. Oncol.) 79:49-55. (1998).
- Radinsky, R., Risin, S., Fan, D., *et. al.* Level and Function of Epidermal Growth Factor Receptor Predict the Metastatic Potential of Human Colon Carcinoma Cells. Clin. Cancer Res. 1:19-31. (1995).
- Riou, G., Barrois, M., Le M.G., *et. al.* C-myc Proto-Oncogene Expression and Prognosis in Early Carcinoma of the Uterine Cervix. Lancet. i(8536): 761-763. (1987).
- Riou, G., Barrois, M., Sheng, Z.M., *et. al.* Somatic Deletions and Mutations of the c-Ha-ras Gene in Human Cervical Cancers. Oncogene. 3: 329-333. (1988).

- Rorke, E.A. Antisense Human Papillomavirus (HPV) E6/E7 Expression, Reduced Stability of Epidermal Growth Factor, and Diminished Growth of HPV Positive Tumor Cells. J. Nat. Can. Inst. 89(17):1243-1246. (1997).
- Ruck, A., and Paulie, S. The Epidermal Growth Factor Receptor is Involved in Autocrine Growth of Human Bladder Carcinoma Cell Lines. Anticancer Res. 17(3C):1925-1931. (1997).
- Sato, S., Ito, K., Ozawa, N., *et. al.* Expression of c-myc, EGFR and c-erbB-2 in Human Endometrial Carcinoma and Cervical Adenocarcinoma. Tohoku. J. Exp. Med. 165(2):137-145. (1991).
- Scambia, G., Panici, P.B., Ferrandina, G., *et. al.* Effect of Recombinant Human Interferon- alpha/2b on EGF, Estrogen and Progesterone Receptor Expression in Primary Cervical Cancer. Int. J. Cancer. 58(6):769-773. (1994).
- Scambia, G., Ferrandina, G., Distefano, M., *et. al.* Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) is not Related to the Prognosis of Cervical Cancer. Cancer Letters. 123: 135-139. (1998).
- Schlegel, J., Merdes, A., Stumm, G., *et. al.* Amplification of the Epidermal Growth Factor Receptor Gene Correlates with Different Growth Behaviour in Human Glioblastoma. Int. J. Cancer. 36:72-77. (1994).
- Secretaría de Salud. Compendio del Registro Histopatológico de Neoplasias en México. 1990-1994. 43-47. (1997).
- Smith, K., Fennelly, J.A., Neal, D.E., *et. al.* Characterization and Quantitation of the Epidermal Growth Factor Receptor in Invasive and Superficial Bladder Tumors. Cancer Res. 49:5810-5815. (1989).
- Spitzer, E., Koepke, K., Kund, D., *et. al.* EGF Binding is Quantitatively Related to Growth in Node-Positive Breast Cancer. Breast Cancer Res. and Treat. 12:45-49. (1988).
- Stehman, F.B. Carcinoma of the Cervix: Issues of the 1990s. Seminars in Oncology. 21(1):2-11. (1994).
- Stoscheck, C.M., Lloyd, E.K. Role of Epidermal Growth Factor in Carcinogenesis. Cancer Res. 46:1030-1037. (1986).
- Straight, S.W., Hinkle, P.M., Jewers, R.J., *et. al.* The E5 Oncoprotein of Human Papillomavirus Type 16 Transforms Fibroblasts and Effects the Down-Regulation of the Epidermal Growth Factor Receptor in Keratinocytes. J. Virol. 67:4521-4532. (1993).

- Sugawa, N., Ekstrand, A.J., James, C.D., *et al.* Identical Splicing of Aberrant Epidermal Growth Factor Receptor Transcripts from Amplified Rearranged Genes in Human Glioblastomas. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87:8602-8606. (1990).
- Tanimoto, H., Nagai, N., Fujimoto, H., *et al.* Molecular Biological Study on the Overexpression of c-myc Gene in Uterine Cervical Carcinomas. Acta Obstet. Gynecol. Jpn. 44: 566-570. (1992).
- Tenti, P., Romagnoli, S., Silini, E., *et al.* Analysis and Clinical Implications of K-ras Gene Mutations and Infection with Human Papillomavirus Types 16 and 18 in Primary Adenocarcinoma of the Uterine Cervix. Int. J. Cancer. 64: 9-13. (1995).
- Torregrosa, D., Bolufer, P., Lluch, A., *et al.* Prognostic Significance of c-erbB-2/neu Amplification and Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) in Primary Breast Cancer and their Relation to Estradiol Receptor (ER) Status. Clin. Chim. Acta. 262:(1-2):99-119. (1997).
- Towbin, H. Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications. J. Immunol. Meth. 72: 313. (1984).
- Ullrich, A. and Schlessinger, J. Signal Transduction by Receptors with Tyrosine Kinase Activity. Cell. 61:203-212. (1990).
- vanDam, P., Lowe, D.G., Watson, J.V., *et al.* Multiparameter Flow-Cytometric Quantitation of Epidermal Growth Factor Receptor and c-erbB-2 Oncoprotein in Normal and Neoplastic Tissues of the Female Genital Tract. Gynecol. Oncol. 42:256-264. (1991).
- vanderGeer, P., Hunter, T., and Lindberg, R.A. Receptor Protein-Tyrosine Kinases and their Signal Transduction Pathways. Annu. Rev. Cell Biol. 10:251-337. (1994).
- Voldborg, B.R., Damstrup, L., Spang-Thomsen, M., *et al.* Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) and EGFR Mutations, Function and Possible Role in Clinical Trials. Review. Annals Oncol. 8:1197-1206. (1997).
- von Knebel, D. M., Gissman, L., and zurHausen, H. Growth-regulating Functions of Human Papillomavirus Early Gene Products in Cervical Cancer Cells Acting Dominant over Enhanced Epidermal Growth Factor Receptor Expression. Cancer Res. 50:3730-3736. (1990).
- Waterfield, M.D. Growth Factors Receptors. British Medical Bulletin. 45 (2). p.p. 317-604. (1989).

- Weinberg, R.A. Oncogenes, Antioncogenes and the Molecular Basis for Multistep Carcinogenesis. Cancer Res. 49: 3713-3721. (1989).
- Wikstrand, C.J., Hale, L.P., Batra, K.S., *et. al.* Monoclonal Antibodies Against EGFRvIII are Tumor Specific and React with Breast and Lung Carcinomas and Malignant Gliomas. Cancer Res. 55:3140-3148. (1995).
- Wikstrand, C.J., and Bigner, D.D. Prognostic Applications of the Epidermal Growth Factor Receptor and its Ligand, Transforming Growth Factor- α . J. Natl. Cancer Inst. 90(11):799-801. (1998).
- Wşillis, G., Jennings, B., Ball, R. *et. al.* Analysis of ras Point Mutations and Human Papillomavirus 16 and 18 in Cervical Carcinoma and their Metastases Gynecol. Oncol. 49: 359-364. (1993).
- Wong, A.J., Ruppert, J.M., Bigner, S.H., *et. al.* Structural Alterations of the Epidermal Growth Factor Receptor Gene in Human Gliomas. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:2965-2969. (1992).
- Xynos, F.P., Klos, D.J., Hamilton, P.D., *et. al.* Expression of Transforming Growth Factor Alpha mRNA in Benign and Malignant Tissues Derived from Gynecologic Patients with Various Proliferative Conditions. Anticancer Res. 12:1115-1120. (1992).
- Yamamoto, T., Kamata, N., Kawano, H., *et. al.* High Incidence of Amplification of the Epidermal Growth Factor Receptor Gene in Human Squamous Carcinoma Cell Lines. Cancer Res. 46:414-416. (1986).
- zur Hausen, H. Viruses in Human Cancers. Science. 254:1167-1172. (1991).
- zur Hausen, H. Papillomavirus Infections -A Major Cause of Human Cancers. Bioch. Biophys. Acta. 1288: F55-F78. (1996).