

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO,
INSTITUTO DE INVESTIGACION ES BIOMEDICAS**

**“ANÁLISIS MUTACIONAL DE LOS GENES
EGFR Y PDGFR EN CANCER DE PULMON Y
CÉRVICO-UTERINO”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

PRESENTA:

M. en C. Lucia Guadalupe Taja Chayeb

Tutor: Dr. Alfonso Dueñas González

México, D. F 2006.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El trabajo experimental de esta tesis se realizó en los Laboratorios de la Subdirección de Investigación Básica, en el Laboratorio de Epigenética del Instituto Nacional de Cancerología, SS. Bajo la dirección del Dr. Alfonso Dueñas González.

**AGRADEZCO A LOS MIEMBROS DEL JURADO
POR LA REVISION DE ESTE TRABAJO Y POR
SUS ACERTADOS COMENTARIOS:**

Dr. Alfonso Dueñas González

Dra. Patricia Ostrosky Shejet

Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo

Dra. Marcela Lizano Soberon

Dr. Luis Benítez Bribiesca

Dr. Juan Riesgo Escovar

Dr. Fabio Salamanca Gómez

DEDICO ESTE TRABAJO MUY ESPECIALMENTE

CON TODO MI AMOR

A MIS PADRES

Esther y José Luis, a quienes debo mi existir y todo lo que soy. Sin su amor, confianza y comprensión no sería la mujer que ahora soy.

A MIS HERMANOS

Por su apoyo y amor incondicional

A ALFONSO

Por todo el apoyo y dirección que me ha brindado, así como por la confianza que ha depositado en mí.

A TODOS MIS AMIGOS

Por su cariño, por apoyarme y guiarme en mi desarrollo profesional y personal.

A LUIS ALONSO

Por la ayuda que me brindo para obtener el grado.

INDICE

I. RESUMEN ABSTRACT

II. ANTECEDENTES

- A. Terapéutica en cáncer
- B. EGFR y PDGFR como blancos terapéuticos
 - EGFR
 - PDGFR
- C. Inhibidores de EGFR y PDGFR
 - a) Gefitinib
 - b) Erlotinib
 - c) Imatinib
- D. Alteraciones de EGFR y PDGFR en Cáncer de Pulmón y sus Inhibidores
- E. Tratamiento con Gefitinib en una paciente con BAC
- F. Cáncer Cérvico-Uterino
- G. Alteraciones de EGFR y PDGFR en CaCU y sus Inhibidores

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

IV. OBJETIVO GENERAL

V. OBJETIVOS PARTICULARES

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

- Pacientes
- Controles
- Cultivo Celular
- Inmunohistoquímica
- Extracción de Ácidos Nucleicos
- Reacción en Cadena de la Polimerasa
- Secuenciación
- Ensayos de proliferación celular
- Western Blot

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

- Análisis mutacional de EGFR en líneas celulares de CaCU
- Análisis mutacional de EGFR en tumores de CaCU y controles
- Expresión de PDGFR y PDGF en líneas celulares de CaCU
- Expresión de PDGFR y PDGF en tumores de CaCU y controles
- Análisis mutacional de PDGFR α en líneas celulares de CaCU
- Análisis mutacional de PDGFR en tumores de CaCU y controles
- Ensayos de Proliferación Celular
- Fosforilación de PDGFR α

VIII. CONCLUSIONES

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

X. ANEXOS

Palabras Clave: Cáncer Cérvico-Uterino, PDGFR, EGFR, Gefitinib, imatinib, Mutaciones

RESUMEN

A pesar de todo el esfuerzo que se ha hecho para mejorar la terapéutica del cáncer cérvico-uterino y de que se ha logrado aumentar la supervivencia global de los pacientes, aun un gran número de ellos muere, por lo que es necesario analizar nuevas alternativas terapéuticas para estos pacientes. Esto puede lograrse mediante un mayor conocimiento de las alteraciones genéticas y su importancia en la carcinogénesis de este tumor. Una de las nuevas estrategias terapéuticas en cáncer, es el uso de moléculas dirigidas a blancos moleculares específicos. Dos proteínas que han sido blancos del desarrollo de este tipo de terapias debido a su conocida participación en el desarrollo o mantenimiento del cáncer, son los receptores al factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y al factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR) cuya eficiencia ha sido demostrada en diferentes tumores sólidos, principalmente en cáncer de pulmón y gastrointestinal. Sin embargo no se ha analizado el potencial de estos fármacos en el CaCU. Dado que la eficacia de ellos se asocia a la presencia en el tumor de mutaciones activadoras en dichos genes, en este trabajo se analizó la presencia de estas en estos dos oncogenes en tumores primarios de CaCU así como en líneas celulares derivadas de este tumor. Se encontró que los tumores primarios no presentaron mutaciones con relevancia biológica en el funcionamiento de los receptores a factores de crecimiento analizados, sin embargo las líneas celulares presentaron una serie de mutaciones intrónicas que no han sido reportadas y cuyo significado biológico se desconoce al momento. Por otro lado se encontró que tanto los tumores primarios como las líneas celulares expresan varios miembros de la familia del PDGF lo que sugiere una estimulación autócrina de sus receptores y por lo tanto una participación en la proliferación de estas células tumorales. Esto último fue demostrado para una de las líneas celulares, en la que también se demostró que el imatinib inhibe la proliferación celular y la fosforilación del PDGFR α ya sea en presencia o ausencia del ligando PDGFBB. Los datos anteriores sugieren que los inhibidores de PDGFR podrían tener un papel terapéutico en cáncer cervico-uterino.

ABSTRACT

Despite the efforts made to improve cervical cancer therapeutics, which has produced an increase in global survival, a great number of patients still die, making necessary the development of new therapies. This could be achieved through the better knowledge and understanding of the genetic alterations that participate in cervical carcinogenesis. The use of small inhibitory molecules targeting specific protein kinases is one of the recent approaches in cancer therapy. Epidermal growth factor receptor (EGFR) as well as platelet derived growth factor receptor (PDGFR) have important roles in development and maintenance of cancer, for this reason these two proteins have been selected as therapeutical targets. The efficacy of these therapies has been demonstrated for different solid tumors, mainly for lung and gastrointestinal malignancies; however, their potential application in cervical cancer has not been analyzed. Because the efficacy of these newer agents is associated to the presence of activating mutations of their coding genes in tumors, in the present work we analyzed these at the EGFR and PDGFR genes in primary cervical tumors and in cervical cancer cell lines. We found no activating mutations in the primary tumors that could affect the function of the growth factor receptors analyzed; however the cell lines had a number of unknown intronic mutations. We also demonstrated that the primary tumors as well as the cell lines express PDGF members indicating autocrine stimulation and suggesting its participation in tumor growth. The later, was confirmed in one cervical cell line. In the same cell line we also demonstrated that imatinib was able to inhibit proliferation and PRGFR α phosphorylation, either in the presence or absence of the ligand PDGFBB. These data suggest that PDGFR inhibitors may have a role in the therapy of cervical cancer.

ANTECEDENTES

A. TERAPEUTICA EN CANCER

En los últimos 30 años el conocimiento sobre el origen y complejidad genética del cáncer ha crecido considerablemente, por lo que las estrategias terapéuticas para abordar este importante problema de salud han cambiado hacia tratamientos más específicos, con blancos moleculares bien definidos (**Zoon KC, 2004; Hermiston TW, 2005**). Los tratamientos clásicos en cáncer incluyen la cirugía, radioterapia y quimioterapia citotóxica. Estos últimos se pueden considerar inespecíficas, ya que tienen como blanco principal las células que tiene una elevada tasa de proliferación de manera que no discriminan entre las células tumorales y las normales lo que genera efectos adversos (**Lahousen, M, 1999; Brooks SE, 1999**). Es por esto que es necesario el desarrollo de terapias alternativas, que solas o en combinación con los tratamientos convencionales aumenten la respuesta clínica así como la supervivencia en pacientes con cáncer.

Se han desarrollado diversas alternativas de terapia, como lo es la terapia génica (**Jones RK, 2000; Hunt KK, 2002**) y la terapia epigenética (**Chávez B, 2005; Chávez B, 2006; Arce C, 2006**). Otra nueva tendencia es el desarrollo de las terapias dirigidas, en las que se incluyen moléculas pequeñas que inhiben la actividad de tirosina cinasas (TKI), anticuerpos neutralizantes que bloquean la señalización de receptores transmembranales, e inhibidores de la actividad de moléculas en el micro-ambiente tumoral que permiten el crecimiento tumoral (**Wakelin AE, 2005**). Así mismo la estrategia de inhibir a nivel de RNA mensajero la expresión de oncogenes, mediante el uso de antisentidos o más recientemente de RNA de interferencia (siRNA) (**Abdelrahim M, 2002**).

Algunas de las moléculas blanco así como de los fármacos de terapia dirigida que se tienen actualmente son: Gefitinib (**Brehmer D, 2005**), Erlotinib (**Chinnaiyan P, 2005**)

y Lapatinib (**Chu I, 2005**) que son TKIs para EGFR; Lapatinib (TKI), Herceptin (**Cobleigh MA, 1999**) y Canertinib (**Britten D, 2004**) (anticuerpos) para bloquear la proteína ErbB2; Imatinib (TKI) que bloquea tanto BCR-ABL como c-KIT y PDGFR (**Krystal GW, 2000**); y Bevacizumab (anticuerpo para VEGF) (**Ramaswamy B, 2006**). Actualmente se encuentran en estudios clínicos de fase I inhibidores que bloquean diferentes transductores de señales, por ejemplo el AZD3409 que bloquea farnesil- y geranilgeranil-transferasas (que actúan en la vía de Ras), AZD6244 el cual inhibe específicamente a MEK (y no es un TKI) y finalmente el AZD0530 que inhibe al gen SRC (**Bromann PA, 2004**). Hasta ahora estas nuevas terapias han resultado en un modesto beneficio en la supervivencia de los pacientes, sin embargo ahora se está analizando el uso de combinaciones de fármacos con la esperanza de incrementar su eficacia. Incluso ya se han detectado algunos mecanismos de resistencia a estos nuevos fármacos.

Los resultados que se han obtenido con estas nuevas terapias, sugieren que ninguna funciona como monoterapia y que lo indicado es aplicar combinaciones entre ellas y con las terapias convencionales. Así mismo es necesario incrementar el conocimiento que se tiene sobre la biología de los diferentes tumores para desarrollar terapias más eficientes, o bien aplicar las terapias que se tienen en otros tumores diferentes a los que ya se tratan con ellos.

B. EGFR Y PDGFR COMO BLANCOS TERAPÉUTICOS.

En múltiples trabajos se ha demostrado el papel que tienen los receptores a factores de crecimiento epidérmico (EGFR) y el derivado de plaquetas (PDGFR) en el desarrollo del cáncer. Por esta razón estos dos genes han sido blancos de estudio en el desarrollo de terapias dirigidas. A continuación se discutirá cada uno de ellos.

EGFR

La familia del EGFR consiste de 4 receptores y 11 ligandos. Los cuatro genes que codifican los receptores son: EGFR/HER1, c-erbB-2/HER2, c-erbB-3/HER3 y c-erbB-4/HER4. Estos receptores poseen dominios con actividad de cinasas de tirosinas (TK). Los ligandos identificados para estos receptores son: EGF, TGF- α (factor de crecimiento transformante alfa), HB-EGF (EGF de unión a heparina), beta-celulina, amfíregulina, epi-regulina, epígeno y las neuro-regulinas 1 a 4 (**Bazley LA, 2005**). El EGFR fue el primer receptor con dominios TK descrito (**Carpenter G, 1978**), así mismo fue el primer receptor reconocido como un oncogén activado asociado al desarrollo de cáncer (**Downward J, 1984**). La estructura de la proteína consiste de una región citoplásmica en el que se encuentra el dominio TK, un dominio transmembranal que tiene un solo pase por la membrana y un dominio extracelular de unión a ligando. En ausencia del ligando los receptores se encuentran en forma monomérica e inactivos, distribuidos por la membrana.

En la **Figura 1** se muestra la estructura general de la proteína así como los dominios funcionales principales.

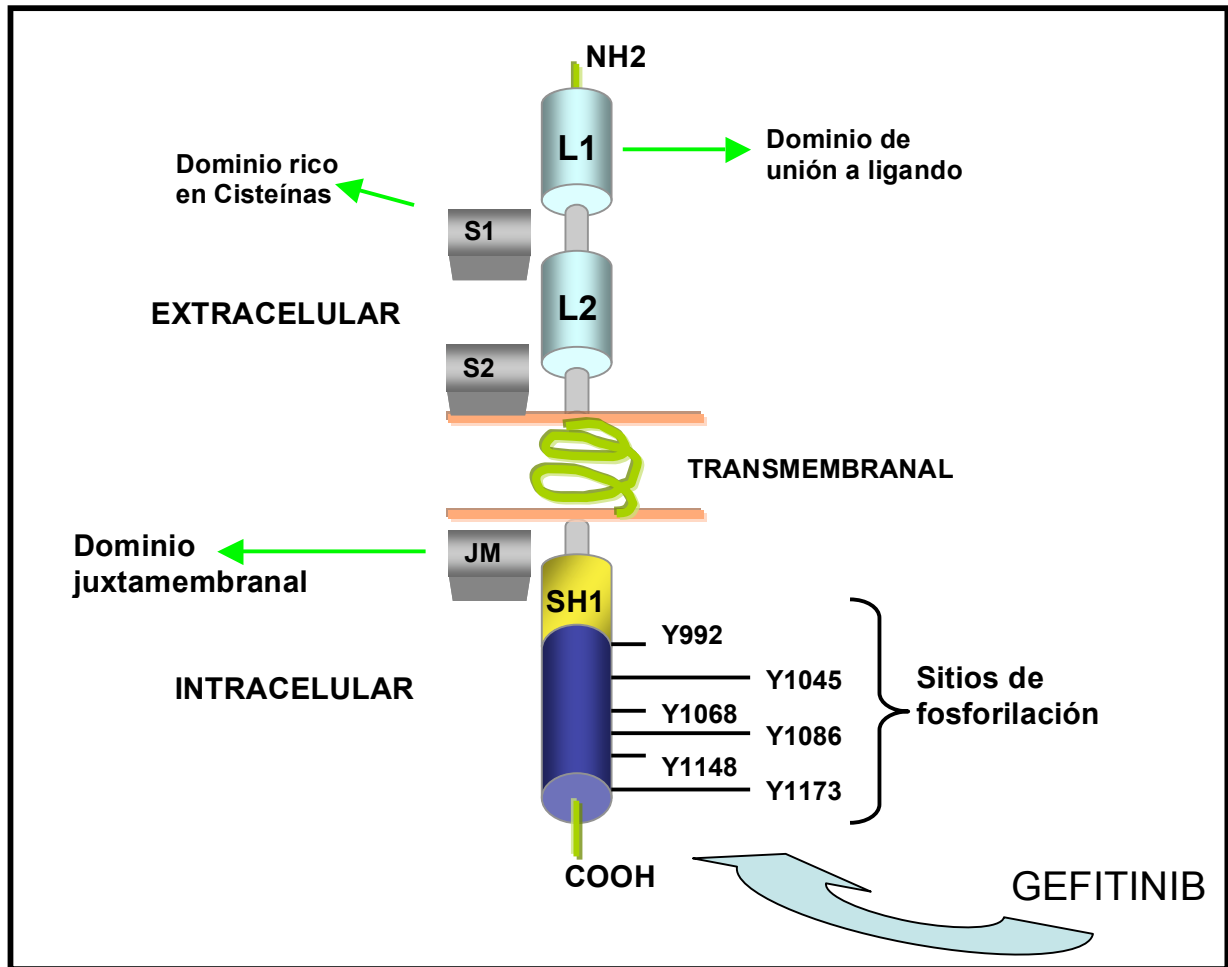


Figura 1. Estructura general de la proteína EGFR. En la región extramembranal se localiza el dominio de unión al ligando y los dominios ricos en cisteínas. En la región intracelular se encuentra el dominio de tirosina cinasa (TK) y se señalan los principales sitios donde este dominio es forforilado, los cuales son blancos del fármaco Gefitinib (inhibidor del EGFR) (Figura modificada de **Bazley LA, 2005**).

Cuando el ligando esta presente, 2 monómeros se unen formando un homodímero, esta forma es más estable y tiene una mayor afinidad por el ligando que los monómeros (**Garret TP, 2002**). Después de la dimerización y unión del ligando, la actividad catalítica del dominio TK se incrementa y se transfosforilan en 3 a 6 residuos de tirosina en cada uno de los monómeros. Posteriormente, se inicia el reclutamiento de una serie de proteínas que actúan como segundos mensajeros y que son capaces de reconocer a los receptores fosforilados (por ejemplo MAPK, PI3K y Fosfolipasa C),

interactúan con ellos y se inicia una cascada de fosforilaciones y activaciones de diversas proteínas (por ejemplo cinasas, segundos mensajeros y factores de transcripción) que finalmente se translocan al núcleo y regulan la transcripción de genes involucrados en múltiples procesos celulares que pueden participar en la progresión tumoral: proliferación, angiogénesis, inhibición de apoptosis, invasión y metástasis (**Figura 2**) (**Hubbard SR, 2000; Baselga J, 2002**).

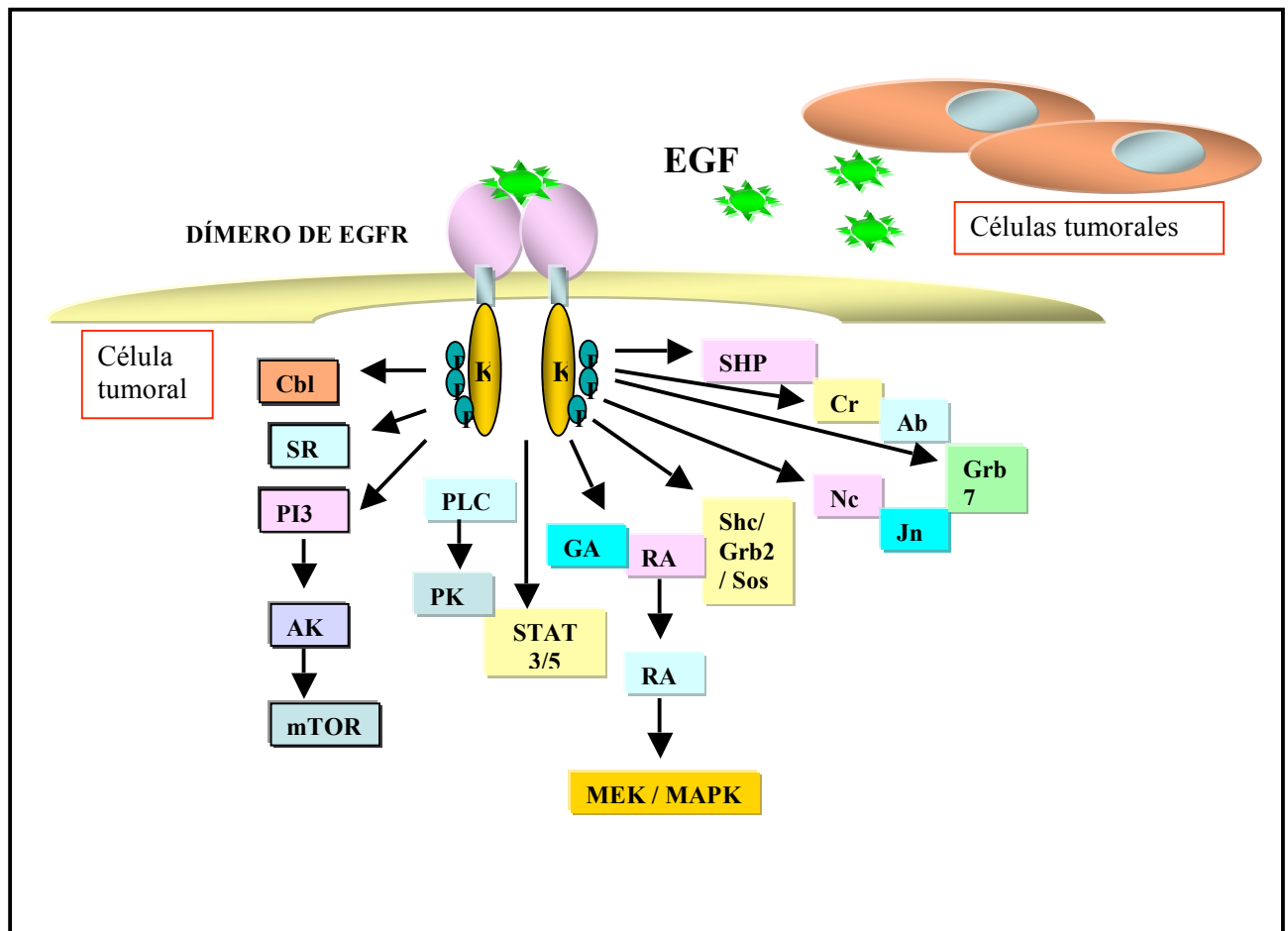


Figura 2. Activación del EGFR. En presencia del ligando el EGFR se homodimeriza iniciando su autofosforilación y la transfosforilación de otras proteínas las cuales pueden actuar en diferentes vías de señalización y activando diferentes procesos celulares, importante proliferación y angiogénesis (figura modificada de **Normanno N, 2006**).

Ha quedado demostrado que la actividad alterada de EGFR y sus ligandos participan en la génesis y progresión de diversos tumores sólidos humanos: Cáncer de pulmón, mama, ovario, próstata, colon, estómago, cabeza y cuello, vejiga y glioblastoma (Normanno N, 2006). Las alteraciones genéticas más frecuentes asociadas a la activación de este oncogén son: amplificación génica, sobre-expresión (Salomón DS, 1995), deleciones (Kuan CT, 2001) o mutaciones puntuales (Paez G, 2004); algunas de estas alteraciones se asocian con una incrementada actividad independiente del ligando. En cáncer de mama también se ha reportado la presencia de formas alteradas de la proteína, generadas por procesamiento alternativo del RNA mensajero (Siegel PM, 1996), así como por modificaciones post-traduccionales (Pupa SM, 1993).

El EGFR es un importante blanco potencial en el tratamiento del cáncer debido a que: 1) este gen se encuentra frecuentemente sobre-expresado en múltiples cánceres humanos; 2) se ha encontrado una correlación entre las alteraciones de EGFR con la progresión tumoral, disminución en la supervivencia de los pacientes y con una pobre respuesta a la quimioterapia, e incluso con el desarrollo de resistencia a agentes citotóxicos; y 3) un aumento en la cantidad de receptor se asocia con un incremento en la producción de ligando por las propias células tumorales, generando una estimulación autócrina del crecimiento tumoral (Wosikowski K, 1997; Mendelsohn J, 2003). Se han identificado diferentes puntos en la vía de actividad de este gen que pueden ser bloqueados, y para los cuales se han desarrollado diversas estrategias de inhibición: el dominio extracelular de unión al ligando, el dominio intracelular TK, los ligandos de este receptor y la síntesis del EGFR (Baselga J, 2002).

En la Tabla 1 se resumen algunas de las estrategias para bloquear al EGFR que se han desarrollado, muchas de las cuales son aplicadas en la clínica actualmente.

Tabla 1. Estrategias antitumorales que usan al EGFR como blanco. En la tabla se muestran algunos de los protocolos clínicos en los que se analiza el uso de inhibidores del EGFR.

COMPUESTO	NOMBRE	ETAPA DE DESARROLLO	TUMOR	REFERENCIA
Anticuerpos monoclonales:	IMC-C225 (Cetuximab)	FASE III	NSCLC	Lilenbaum RC, 2006
	ABX-EGF	FASE II FASE I	Colon Riñón	Tyagi P, 2005 Rowinsky E, 2004
	Pertuzumab	FASE II	NSCLC	Jonson BE, 2006
	KGaA (Matuzumab)	FASE II	Estómago, CaCU, páncreas y ovario	Kim T, 2004
	EMD 55,900	Pre-clínico	CaCU	Solbach C, 2005
	mAb-806	Pre-clínico	Glioblastoma	Mishima K, 2001
Anticuerpos Biespecíficos:	MDX-447	FASE II	Ovario, Próstata y Piel	Curnow RT, 1997
	MDX-H210	FASE II	Próstata	James ND, 2001
	CD3-EGF	Pre-clínico	CaCU	Renard I, 2002
EGFR-TKIs: Quinazolininas	ZD1839 (Iressa / Gefitinib)	FASE III	NSCLC	Capuzzo F, 2006
	OSI-774 (erlotinib/ Tarceva)	FASE III	NSCLC	Lakhai WS, 2005
	CI-1033	FASE II	Ovario	Campos S, 2005
	EKB-569	FASE I	Tumores sólidos	Erlichman C, 2006
Pirido-pirimidinas	PD-158780	Pre-clínicos	Mama, Ovario,	Fry DW, 1997
	PD-69896		Ca. epidermoide	Rewcastle G, 1998
Pirrol-pirimidinas	PKI-166	FASE I	Tumores sólidos	Hoekstra R, 2005
Vacunas recombinantes	EGF-P64k	FASE I	Tumores sólidos	González G, 1998
Oligonucleótidos Antisentido	AS-21	Pre-clínicos	Cabeza y cuello	Niwa H, 2003

NSCLC = Cáncer de pulmón de células no-pequeñas.

PDGFR

Pertenece a una subfamilia de receptores TK constituida por PDGFR α , PDGFR β , CSFR (receptor al factor estimulador de colonias) y *c-kit*. Todos estos receptores comparten la característica de tener 6 residuos de cisteína espaciados en el dominio extracelular el cual consiste de 5 dominios de inmunoglobulina, y de tener dividido el dominio intracelular de TK por una secuencia espaciadora (**Welsh LC, 1989**).

El PDGF es una familia de proteínas catiónicas que se encuentran como homo o heterodímeros y que consiste de 4 miembros: PDGF-A, -B, -C y -D (PDGF-AA, -AB, -BB, -CC y -DD) (**Heldin CH, 2002; Reigstad LJ, 2005**). Son codificados por genes independientes y tienen un papel muy importante en la embriogénesis. Los mecanismos celulares en los que participan son: proliferación celular, reorganización de los filamentos de actina, quimiotaxis, movilización de calcio intracelular, comunicación celular mediante uniones tipo GAP y apoptosis (**Heldin CH, 1999**). Se ha encontrado que cada uno de los miembros de la familia del PDGF pueden participar en distintos tipos de tumores humanos (**Reigstad LJ, 2005**). En la **Figura 3** se muestra la estructura general de la proteína del Receptor al factor de crecimiento derivado de plaquetas.

Debido a que el PDGFR reconoce moléculas diméricas, la dimerización de éste ocurre simultáneamente con la unión del ligando. El receptor- α reconoce a los ligandos A, B y C con una alta afinidad, sin embargo el receptor- β solo puede reconocer a los ligandos -B y -D. Es decir que el homodímero PDGFR- $\alpha\alpha$ reconoce los ligandos -AA, -CC, AB y -BB; heterodímero PDGFR- $\alpha\beta$ reconoce los ligandos -AB y -BB; y el homodímero PDGFR- $\beta\beta$ reconoce los ligandos -BB y -DD (**Heldin CH, 1999; Heldin CH, 2002**). Todas las combinaciones del PDGFR participan en señales celulares similares pero no idénticas. Por ejemplo todas inducen proliferación celular, pero mientras que el receptor β estimula la quimiotaxis, los receptores α la inhiben.

Por esta razón, dependiendo del estímulo que requiera cada tipo celular, se expresará uno u otro tipo de receptor (Vassbotn FS, 1994).

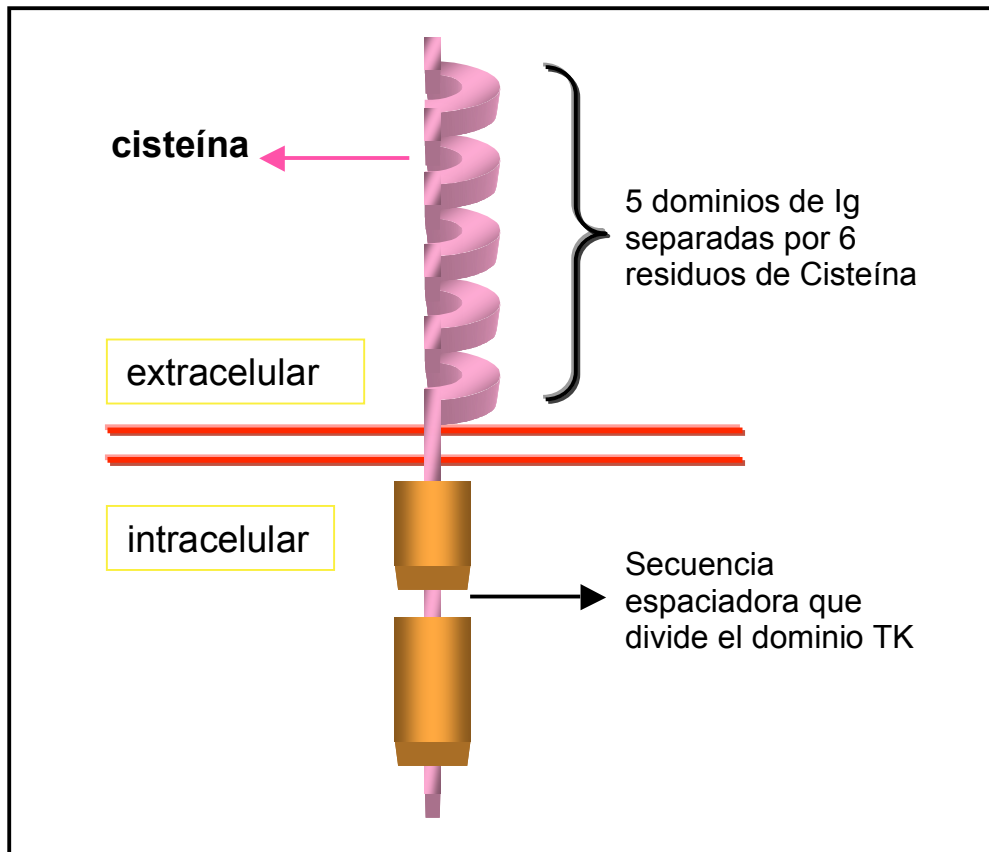


Figura 3. Estructura general del PDGFR. Esta proteína se caracteriza por tener en la región extracelular 5 dominios de inmunoglobulina separadas por una cisteína, y por tener una secuencia que divide el dominio TK intracelular.

En la **Figura 4** se esquematizan las combinaciones de receptores y ligandos que pueden ocurrir.

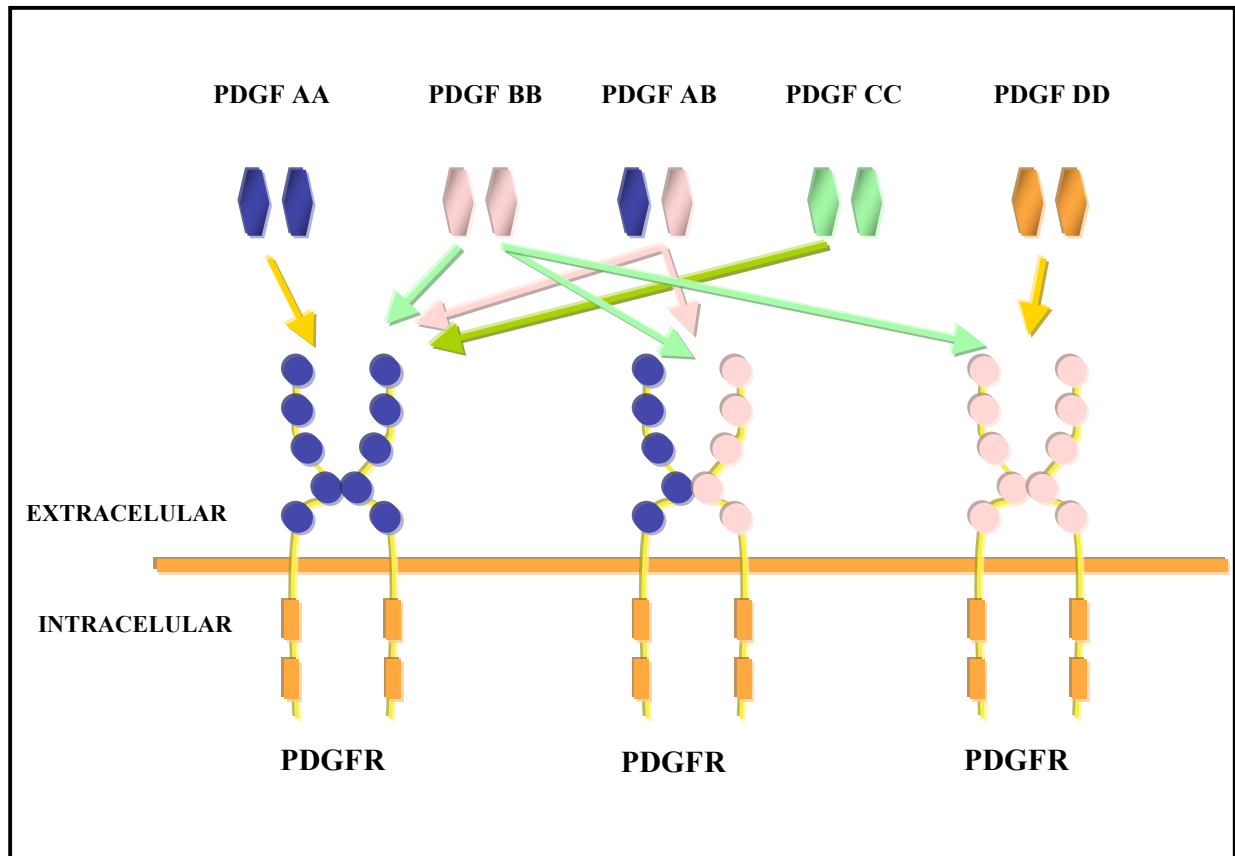


Figura 4. Combinaciones entre los diferentes miembros de la familia del PDGF. El PDGFR puede homodimerizarse o heterodimerizarse, sin embargo cada combinación no puede reconocer a todos los ligandos de la familia. El dímero $\alpha\alpha$ puede reconocer los ligandos AA, BB, AB y CC; el heterodímero $\alpha\beta$ reconoce a BB y AB, y el homodímero $\beta\beta$ solo puede reconocer a los ligandos BB y DD. Cada combinación de ligando-receptor puede actuar en diferentes procesos celulares (figura modificada de **Heldin CH, 2002**).

Como ocurre con el EGFR, después de la unión del ligando y dimerización del receptor, se incrementa la actividad del dominio de cinasa, induciendo la autofosforilación del receptor e incrementando aun más la actividad catalítica de la cinasa, reclutando y fosforilando una serie de proteínas que actúan en las diferentes vías de señalización en que participan estos receptores (por ejemplo PI3-K, PLC- γ , Src, GAP, Stat5, y Grb2). La unión del ligando al receptor induce la internalización del complejo en endosomas, donde se disocia y las moléculas del receptor son recicladas a la

membrana, o bien el complejo ligando-receptor es degradado mediante la fusión del endosoma con lisosomas o por el proteasoma (**Heldin CH, 1999**).

En diversos tumores humanos se ha encontrado la expresión tanto de los ligandos como de los receptores de PDGF, lo cual supone una estimulación autócrina de las células tumorales (**Matei D, 2006**). Algunos de los tumores en los que se ha observado esta co-expresión son meningiomas, melanomas, tumores neuroendocrinos, cáncer de ovario, páncreas, estómago, pulmón, riñón, osteosarcoma y próstata. Las alteraciones que se han encontrado en este gen son usualmente alteraciones estructurales que llevan a una sobre-expresión del gen (amplificaciones, translocaciones) o mutaciones que inducen una activación constitutiva del receptor (**Heinrich MC, 2003; Hirota S, 2003; Fletcher JA, 2004; Corless CL, 2005**). Por ejemplo, en cáncer gástrico se han descritos dos mutaciones puntuales que causan activación constitutiva del PDGFR α : valina a ácido aspártico en el codón 561, y ácido aspártico a valina en el codón 842 (**Hirota S, 2003**).

Por otro lado, recientemente se ha demostrado la participación de PDGFR β en la regulación de la presión del fluido intersticial (PFI) al regular la tensión entre las células y la matriz extracelular ([Heuchel R, 1999](#)). Posteriormente se demostró que la PFI se encuentra elevada en la mayoría de los tumores, lo cual se debe principalmente a la vasculatura tumoral anormal que se genera por el incremento en angiogénesis dentro de los tumores, y este proceso ha sido asociado con resistencia a quimioterapia, el cual es un problema muy común en el tratamiento del cáncer (**Pietras K, 2001**). La formación de nuevos vasos sanguíneos genera una disminución del gradiente hidrostático de los capilares hacia el espacio intersticial, lo cual produce una interrupción del intercambio de solutos en la membrana de los capilares creando una barrera fisiológica para el ingreso de fármacos de la circulación sanguínea hacia el tumor (**Milosevic M, 2001; Pietras K, 2001**). En el caso particular de pacientes con CaCU, se ha demostrado un incremento de la PFI (**Roh HD, 1991**). De hecho, en un estudio prospectivo con 102 pacientes de CaCU, se demostró que la medición de la PFI en los tumores tiene un valor pronóstico independiente muy importante. Los

pacientes con PFI elevada, tuvieron un mayor riesgo de recurrencia después de radioterapia que aquellos que la tuvieron baja, y de morir con enfermedad progresiva (Milosevic M, 2001b).

El PDGFR tiene un papel importante en el desarrollo de diversos tumores, por lo que también ha sido un blanco para el desarrollo de fármacos para el tratamiento del cáncer. Las diversas estrategias desarrolladas hasta ahora buscan inactivar el dominio de TK del PDGFR (Buchdunger E, 200; Mol CD, 2004; Roberts WG, 2005), bloquear con anticuerpos el sitio de unión al ligando (Loizos N, 2005), o bien bloquear la síntesis del PDGFR mediante el uso de oligonucleótidos antisentido o RNA de interferencia (Sacks HC, 2002; Noiseux N, 2000; Matei D, 2006). Algunos de los inhibidores de PDGFR cuya eficacia ha sido o esta siendo analizada en la clínica se muestran en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Estrategias antitumorales que usan al PDGFR como blanco.

COMPUESTO	NOMBRE	ETAPA DE DESARROLLO	TUMOR	REFERENCIA
Aminopirimidina (análogo de ATP)	Imatinib (STI-571)	Fase II	Melanoma	Wyman K, 2006
	Imatinib	Fase II	Hepatocarcinoma	Eckel F, 2005
	Imatinib	Fase II	Mama metastásico	Modi S, 2005
	Imatinib	Fase II	Próstata	Rao K, 2005
	Imatinib	Fase II	Estomago	Verweij J, 2003
Inhibidores de TK	SU11248 (Sunitinib)	Fase II	Riñón	Faivre S, 2006 Motzer RJ, 2006
	SU11248	Fase I	Riñón, Estomago	Fiedler W, 2005
	SU11248	Fase I	Leucemia Mieloide	Fiedler W, 2004
	SU101	Fase II	Próstata	Ko YJ, 2001
Anticuerpos	CDP860	Fase I	Ovario y Colon	Jayson GC, 2005
	3G3	Pre-clínico	Glioblastoma	Loizos N, 2005
Antisentidos	si-RNA	<i>In vitro</i>	Ovario	Matei D, 2006

C. INHIBIDORES DE EGFR Y PDGFR.

Algunos de los fármacos de reciente desarrollo a este respecto y que más aplicación han tenido en la clínica incluyen los siguientes:

GEFITINIB.

El gefitinib (Iressa o ZD1839) es un miembro de una nueva clase de fármacos con propiedades antitumorales, que inhiben Tirosina Cinasas (TKs). Es una anilinoquinazolina cuyo nombre químico es 4-quinazolinamina, N-(3-cloro-4-fluorofenil)-7-metoxi-6-[3-(4-morfolinil)propoxy] (**Cohen MH, 2004**). La molécula ZD1839 fue seleccionada de un grupo de 4-anilinoquinazolininas que presentaron diferentes actividades inhibitoras del EGFR (**Barker AJ, 2001**). Se ha demostrado que inhibe la fosforilación intracelular de numerosas TKs asociadas a los receptores transmembranales. Ward demostró que el gefitinib inhibe competitivamente al ATP, ya que compite por el sitio de unión de éste con una mayor afinidad que el propio ATP, inhibiendo su auto fosforilación y por tanto bloqueando la cascada de señales que genera (**Ward WH, 1994**). Muchos autores refieren al gefitinib como una molécula selectiva o específica para el EGFR. Sin embargo, en un estudio de proteómica, se identificaron y caracterizaron al menos 20 potenciales blancos para el gefitinib (**Brehmer D, 2005**).

Este fármaco ha mostrado tener actividad antiproliferativa en cultivos tumorales así como en xenotransplantes de tumores humanos, ya sea como único agente o en combinación con quimioterapia citotóxica o radioterapia (**Harari PM, 2004**). El gefitinib está indicado como monoterapia en el tratamiento del cáncer pulmonar de células no pequeñas localmente avanzado o metastático, cuando los tratamientos basados en platino y docetaxel han fracasado (**Mushin M, 2003**).

A pesar del beneficio clínico que se ha observado en los pacientes tratados con gefitinib para diferentes tumores sólidos que sobre-expresan al EGFR, se han detectado pacientes que presentan mutaciones *de novo* que les confieren resistencia a

esta fármaco, derivándose en ningún beneficio clínico. Se han desarrollado estrategias para eludir esta resistencia adquirida, principalmente la aplicación combinada de gefitinib con otros inhibidores para receptores, en particular IGFR (receptor al factor de crecimiento insulínico), o bien combinando con otras moléculas que bloquean al EGFR (anticuerpos monoclonales, cetuximab) o con tratamientos anti-hormonales (anastrozole) (**Huang S, 2004; Jones HE, 2005**).

ERLOTINIB

El erlotinib (OSI-774 ó Tarceva) es una quinazolina de bajo peso molecular de nombre químico N-(3-etinilfenil)-6,7-Bis (2-metoxi-etoxi)-4-quinazolinamina, y cuyo uso fue aprobado por la FDA en el 2004 (**Johnson JR, 2005**). Inhibe específicamente la fosforilación del dominio de cinasa del EGFR, lo que resulta en arresto del ciclo celular e inducción de apoptosis. Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que esta molécula tiene actividad en células tumorales derivadas de cáncer colorrectal, de cabeza y cuello, páncreas y cáncer de pulmón de células no pequeñas. En estudios preclínicos se encontró que la combinación de erlotinib con cisplatino, doxorubicina, gemcitabina o paclitaxel en dosis bajas, así como con radioterapia, tiene efecto antitumoral aditivo (**Harari PM, 2004; Chinnaiyan P, 2005**). Así también, se ha establecido que los efectos farmacodinámicos de este compuestos son dependientes de la concentración plasmática, y que hay una correlación lineal entre la inhibición de la actividad del EGFR y la inhibición del crecimiento tumoral (**Malik SN, 2003**).

Cuando se inicio el tratamiento con inhibidores de TK (gefitinib o Erlotinib) en pacientes con NSCLC, empezaron a distinguirse grupos de pacientes que presentaban respuestas muy buenas al tratamiento y otros que no respondían del todo. Al hacer un análisis más profundo al respecto, se reportaron una serie de mutaciones somáticas que se presentaban en los pacientes que si respondían. Todas las mutaciones se encontraron dentro de la secuencia que codifica para el dominio TK de la proteína e inducen una activación constitutiva del EGFR (**Johnson BE, 2005**). Estas mutaciones se encontraron mas frecuentemente en pacientes no-fumadores que fumadores (59% vs

41% respectivamente), en mujeres que en hombres (30% vs 6%, respectivamente), en tumores que no tenían mutaciones en el gen *K-ras* y más frecuentemente en los tumores bronquioloalveolares (BAC) que en otros tipos histológicos. De manera que estas mutaciones definen un nuevo tipo molecular de cáncer de pulmón que puede responder al tratamiento con gefitinib: BAC en mujeres no-fumadoras e independiente de la presencia de mutaciones en *K-ras* (**Marchetti A, 2005; Kosaka T, 2004**). Las mutaciones que se encontraron fueron varias deleciones en el exón 19, así como mutaciones en las que se cambian aminoácidos codificantes en los exónes 18 y 21. Con el hallazgo de estas mutaciones muchos autores han sugerido la necesidad de identificar estas mutaciones en los pacientes con tumores sólidos, para identificar a aquellos que pueden ser candidatos a la terapia con estos inhibidores (**Chan SK, 2006; Mitsudomi T, 2006**).

IMATINIB

El Imatinib (gleevec o STI-571) es un derivado de la 2-fenilaminopirimidina que tiene selectividad por los dominio tirosina cinasa de los receptores de ABL, PDGFR y c-kit (**Buchdunger E, 2000**). Es un análogo del ATP por lo que competitivamente se une e inhibe el dominio TK de los receptores mencionados (**Schindler T, 2000**). Originalmente el imatinib se uso como un inhibidor del producto quimérico bcr/abl en leucemia mielocítica crónica (LMC), después se demostró que puede inhibir otras TKs tales como PDGFR y c-kit (**Manley PW, 2002**). Se ha demostrado que el Gleevec induce respuestas clínicas y hematológicas, así como remisión molecular (de la translocación bcr/abl) en pacientes con LMC (**Cohen 2002; Johnson JR, 2003**); así mismo se ha demostrado que esta droga inhibe la proliferación de líneas celulares de tumores gastrointestinales (GIST) y remisión clínica en pacientes con GIST (**Dagher R, 2002; Tarn C, 2006**). Debido a que se han encontrado alteraciones en el gen de PDGFR en diferentes tumores, se ha analizado y en algunos casos demostrado el potencial terapéutico del Imatinib en otros tipos de cáncer, por ejemplo cáncer de

endometrio (**Slomovitz BM, 2004**), ovario (**Matei D, 2004**) y pulmón (**Zhang P, 2003**).

Como sucede con otras terapias, en el tratamiento con imatinib se ha detectado también el desarrollo de resistencia. Se ha demostrado que en LMC, en la que el imatinib tiene como blanco molecular la translocación *bcr-abl*, los pacientes resistentes o recurrentes posterior al tratamiento con imatinib, presentan mutaciones de novo en el dominio TK de abl, amplificación génica o sobre-expresión que le confieren a las células tumorales la resistencia al imatinib (**Hochhaus A, 2002**).

D. ALTERACIONES DE EGFR Y PDGFR EN CANCER DE PULMÓN Y SUS INHIBIDORES

El cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) es un agregado heterogéneo de al menos tres histologías distintas de cáncer de pulmón, incluyendo el carcinoma epidermoide o escamoso, el adenocarcinoma y el carcinoma de células grandes. Los resultados del tratamiento estándar son precarios en todos los cánceres, excepto en los más localizados. La cirugía es la principal opción terapéutica potencialmente curativa para esta enfermedad, mientras que la radioterapia puede producir curación en una pequeña minoría de pacientes y paliación en la mayoría de ellos. En enfermedad de etapa avanzada, la quimioterapia ofrece mejoras modestas en la supervivencia media, aunque la supervivencia general es precaria (**Souquet PJ, 1993**). Se ha evaluado la combinación de tratamientos locales (cirugía), regionales (radioterapia) y sistémicos (quimioterapia e inmunoterapia) y el desarrollo de terapias sistémicas más eficaces (**Pastorino U, 1993**). Actualmente se generaliza el uso de terapias dirigidas (**Harari PM, 2004; Mushin M, 2003**).

Para esta neoplasia, se ha reportado sobre-expresión así como diferentes mutaciones (deleciones o mutaciones puntuales) en el gen del EGFR, las cuales tienen importantes implicaciones en la agresividad de la enfermedad así como en la sensibilidad o resistencia a diversos tratamientos, en particular a las nuevas terapias dirigidas (**Riely GJ, 2006**). Una de las mutaciones mas conocidas es la EGFRvIII, en la que se deletan los aminoácidos 6 a 273 que corresponden al dominio extracelular del receptor, lo que resulta en una activación constitutiva del dominio de TK y confiere un comportamiento más agresivo a los tumores (**Frederick L, 2000**). En el caso particular de NSCLC parece ser mas común otro tipo de alteraciones como la sobre expresión del EGFR que se ha reportado en un 43-89% de los casos (**Rusch V, 1997**), mutaciones puntuales principalmente en los exones 18, 19 y 21 (que corresponden al dominio TK de la proteína) muchas de las cuales se han asociado con sensibilidad o resistencia a la terapia, en particular a la terapia dirigida (**Marchetti A, 2005; Johnson BE, 2005; Jänne PA, 2006**).

Como ya ha sido mencionado, se han detectado una serie de mutaciones somáticas que pueden conferir sensibilidad al Gefitinib. Todas las mutaciones se encontraron dentro de la secuencia que codifica para el dominio TK de la proteína e inducen una activación constitutiva del EGFR (**Johnson BE, 2005**). Estas mutaciones se han encontrado más frecuentemente en pacientes mujeres no-fumadoras con tumores bronquioloalveolares que no tienen mutaciones en el gen *K-ras* (**Marchetti A, 2005**). Las mutaciones que se encontraron fueron varias deleciones en el exón 19 así como mutaciones en las que se cambia el aminoácido codificante en los exones 18 y 21. En la **Tabla 3** se muestran algunas de estas mutaciones.

Algunos pacientes con las mutaciones sensibilizadoras dejaron de responder al gefitinib y al hacer un análisis molecular de estos tumores resistentes, se encontró la aparición de otras mutaciones somáticas en el exón 20, comúnmente la sustitución de la metionina 790 con una treonina así como inserciones. Estas mutaciones no estaban presentes en los tumores primarios, por lo que pueden deberse a la aparición de novo

de clonas mutantes resistentes, o bien a clonas que ya existían en un bajo número y se expandieron posterior al tratamiento (**Pao W, 2005; Tokumo M, 2006**).

Tabla 3. Mutaciones en el gen EGFR asociadas a respuestas clínicas al Gefitinib.

Exón	Mutación	Fenotipo
19	2235_2249 del GGAATTAAGAGAAGC	sensible
	2236_2250 del GAATTAAGAGAAGCA	sensible
	2237_2254 del AATTAAGAGAAGCAACAT	sensible
	2239_2247 del TTAAGAGAA	sensible
	2240_2251 del AAGAGAAGCAAC	sensible
21	2572 C>A	sensible
	2573 T>G	sensible
18	2155 G>T	sensible
20	T790M	resistente

En la tabla se indica la posición en el cDNA del EGFR en la que se encuentra la alteración.

Actualmente hay múltiples protocolos clínicos en los que se analiza la eficacia y seguridad de inhibidores de EGFR como el Gefitinib, Erlotinib, Cetuximab y Pertuzumab (**Herbst RS, 2002; Niho H, 2006; Lilenbaum RC, 2006; Riely GJ, 2006**); sin embargo los resultados no han sido del todo alentadores por lo que algunos autores han sugerido el uso de combinaciones y se han realizado protocolos clínicos analizando la combinación de Gefitinib con Gemcitabina (**Giaccone G, 2004**), Paclitaxel (**Herbst RS, 2004**) u otros agentes quimioterapéuticos (**Baselga J, 2004**). Los resultados obtenidos en estos protocolos han permitido identificar algunos criterios de selección de los pacientes que se pueden beneficiar más de este tipo de terapias dirigidas (**Johnson DH, 2006**).

En el caso del gen PDGFR, se han reportado mutaciones en este gen en NSCLC (**Fletcher JA, 2004**), sin embargo no se ha investigado a fondo el potencial de las terapias dirigidas a este gen, para el tratamiento de este tumor. Existen algunos reportes en los que se evalúa la efectividad de imatinib en pacientes con Cáncer de Pulmón de células pequeñas (SCLC) (**Cristal G, 2000; Johnson BE, 2003**). Con respecto al NSCLC, Zhang reportó que la línea celular A549 derivada de NSCLC expresa PDGFR α , que el imatinib a concentraciones terapéuticas inhibe la proliferación de ésta, y que el imatinib en combinación con cisplatino (el cual es el principal agente quimioterapéutico empleado en este tumor) tiene un efecto sinérgico en la muerte celular. Adicionalmente reportó la expresión del PDGFR α en 33 tumores primarios de NSCLC, sugiriendo la factibilidad de emplear imatinib en el tratamiento de éste tumor (**Zhang P, 2003**).

E. TRATAMIENTO CON GEFITINIB EN UNA PACIENTE CON BAC

En el Instituto Nacional de Cancerología se atendió a una paciente con carcinoma bronquioloalveolar (BAC) no-fumadora que había sido tratada con quimioterapia-radioterapia y que presentó una pobre respuesta a este tratamiento. Por esta razón empezó a recibir Gefitinib, al cual tuvo una buena respuesta clínica (desaparición de los síntomas respiratorios). Considerando las características clínicas del paciente y su respuesta al Gefitinib, se hizo una búsqueda de las mutaciones que se han asociado a una buena respuesta a este fármaco. Se analizó por secuenciación directa los exones 18, 19, 20, 21, 22, 23 y 24 de gen EGFR. Sorprendentemente no se encontraron mutaciones en ninguno de los exones analizados (**Taja CL, 2005**). En la **Figura 5** se muestra un fragmento de las secuencias de los exones 18, 19 y 21, correspondientes a los sitios donde se han reportado mutaciones que sensibilizan al tratamiento con gefitinib.

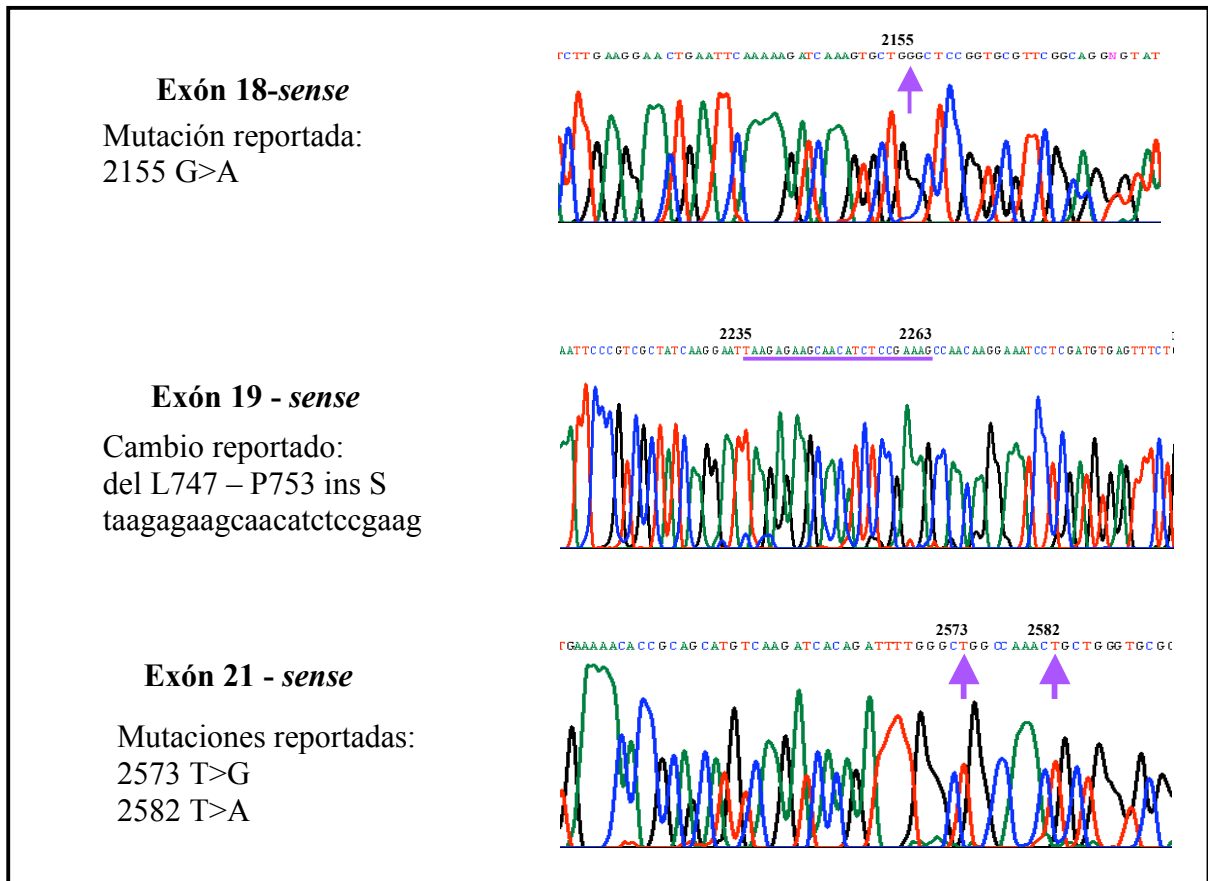


Figura 5. Resultados de la secuenciación de la muestra de BAC. Se muestra un fragmento de secuencias de los exones 18, 19 y 21 que corresponden a la región donde se han reportado las mutaciones más frecuentes. Las flechas y la línea debajo de las secuencias indican los nucleótidos que se han encontrado afectados y que en esta muestra no estuvieron mutados.

Hasta este trabajo no se habían reportado casos de pacientes con BAC que en ausencia de mutaciones sensibilizadoras respondieran al tratamiento con Gefitinib, de hecho se considera que la detección de estas alteraciones es necesaria para predecir la respuesta al tratamiento. Considerando nuestros resultados parece posible que la terapia con gefitinib funcione para estos pacientes aun en ausencia de mutaciones, y que es necesario analizar la existencia de otras alteraciones que ayuden a predecir mejor la respuesta a los tratamientos dirigidos a moléculas específicas (Taja CL, 2005). De hecho, basados en los resultados de este trabajo se decidió realizar el análisis de mutaciones de los genes EGFR y PDGFR en CaCU, con el objetivo de analizar el uso potencial de Gefitinib e Imatinib en este tumor.

F. CANCER CERVICO-UTERINO

El cáncer de cuello uterino (CaCU) sigue siendo una de las principales causas de muerte por cáncer entre las mujeres de países en desarrollo, a pesar de ser un tumor del que se conoce muy bien su historia natural y de los múltiples programas de detección temprana que se han implementado. La incidencia de este tumor es especialmente alta en Latinoamérica, India, África y Europa del Este (**DeVita VT, 1997**). De acuerdo al Globocán del 2000, se estimó que el número de pacientes diagnosticados con CaCU fue de 470,606 de los cuales murieron 233,372 (**Parkin DM, 2000**)

El CaCU tiene sus orígenes en la unión escamosa columnar ya sea en el canal endocervical o en el ectocérvix. La lesión precursora es llamada displasia o neoplasia intraepitelial cervical de grado I a III, y puede posteriormente convertirse en cáncer invasor una vez que rompe la membrana basal del epitelio. Algunos estudios longitudinales han revelado que entre pacientes con cáncer cervical *in situ* que no han sido tratadas, entre el 30% y el 70% desarrollarán carcinoma invasor en un período de 10 a 12 años. Sin embargo, en alrededor del 10% de las pacientes, las lesiones pueden progresar de *in situ* a invasoras en períodos inferiores a un año. A medida que se hace invasor, el tumor irrumpe a través de la membrana basal e invade el estroma cervical. Además de la invasión local, el carcinoma cervical puede diseminarse por vía de los linfáticos regionales o del torrente sanguíneo (**DeVita VT, 1997**).

Los principales factores de riesgo para el desarrollo de esta neoplasia son: Infección con HPV, uso de anticonceptivos orales, múltiples parejas sexuales, paridad múltiple, deficiencias vitamínicas y tabaquismo (**Parazzini F, 1992**). El desarrollo del CaCU tiene características únicas, ya que las alteraciones en el ciclo celular se inician por la infección e integración del genoma de HPV y la expresión de sus oncoproteínas, y termina con la transformación maligna por otros factores genéticos y epigenéticos (**Lazo PA, 1999; Walboomers JM, 1999**). Ocadiz y colaboradores reportaron que en el 90% de tumores de pacientes mexicanas con CaCU se encontró amplificación o

rearrreglo del oncogén *c-myc* (**Ocadiz R, 1987**). Así mismo se han reportado la presencia de alteraciones cromosómicas frecuentes en éste tumor, como lo son la ganancia de los cromosomas 1q, 3q y 5p, particularmente presentes en etapas avanzadas de este tumor (**Heselmeyer K, 1997**); y la trisomía de los cromosomas 3 y X así como alteraciones del cromosoma 7 en la progresión de lesiones preinvasoras a cáncer invasor (**Marzano R, 2004**). Se ha reportado que la sobre-expresión del gen EGFR (**Kersemaekers A, 1999**) y la pérdida de expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase I y II así como de las proteínas transportadoras de antígeno, son un evento común en CaCU (**Keating PJ, 1995**).

En el tratamiento convencional de este tumor se emplea una terapia a base de cisplatino administrada conjuntamente con radioterapia, lo cual parece dar ventajas en la supervivencia. Tanto la cirugía como la radioterapia son igualmente efectivas para la enfermedad en etapa temprana y de volumen pequeño. El tratamiento puede variar dentro de cada etapa según lo definido actualmente por FIGO (Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia), y dependerá del volumen del tumor y del modelo de diseminación (**Lahousen M, 1999; Dueñas GA, 2003**).

D. ALTERACIONES DE EGFR Y PDGFR EN CaCU Y SUS INHIBIDORES.

El EGFR es uno de los oncogenes que se encuentra frecuentemente sobre-expresado o mutado en diversos tumores (lo cual generalmente indica un comportamiento agresivo de éstos) (**Ozanne B, 1986**), razón por la cual se ha analizado ampliamente el estado de este gen en el CaCU (**Pfeiffer D, 1989; Kim JW, 1996; Hu G, 1997**). Algunos autores han reportado una correlación entre la sobre expresión de éste gen con un mal pronóstico de la enfermedad (**Kersemaekers A, 1999; Kim YT, 2002; Kim GE, 2004**). Se han encontrado asociaciones entre el EGFR y otros genes incluyendo oncogenes virales de HPV que participan en la carcinogénesis del CaCU y oncogenes celulares (**Kim SW, 2006**); por ejemplo Mathur en el 2005 reportó que el VEGF (factor de crecimiento vascular endotelial) induce positivamente la proliferación de células de cáncer cervical, mediante la sobre-regulación del EGFR y que inhibe el efecto anti-proliferativo del IGF-BP3 (proteína de unión al factor de crecimiento insulínico) por la oncoproteína E6 de HPV-16 (**Mathur RS, 2005**).

Considerando la importancia que tiene el EGFR en el desarrollo del CaCU, algunos grupos han evaluado la posibilidad de usar inhibidores específicos de EGFR, aunque hasta ahora sólo en ensayos *in vitro* y en animales. Baguley evaluó el uso de un TKI (anilinoquinazolina) para EGFR en cultivos primarios de diversos tumores incluyendo 4 muestras de CaCU, y encontraron que al menos tres de los cuatro tumores fueron sensibles al inhibidor (se inhibió la proliferación celular), sugiriendo la posibilidad de usar estos inhibidores para este tumor (**Baguley BC, 1998**). Por otro lado, se sabe que el EGFR puede inhibir algunos efectos del TNF- α (factor de necrosis tumoral-alfa) y viceversa, por lo que Hambek analizó el posible efecto antitumoral que tendría el TNF- α junto con un inhibidor de EGFR (anticuerpo monoclonal) en xenotransplantes de diferentes tumores incluidos tumores del cuello uterino, y encontró que en efecto el TNF- α incrementa el efecto antitumoral de los anticuerpos monoclonales anti-EGFR, incluso en tumores que expresan bajas concentraciones de EGFR (**Hambek M, 2001**).

En un intento de mejorar la respuesta antitumoral que se obtiene con anticuerpos que bloquean al EGFR, Renard analizó la efectividad de un anticuerpo biespecífico anti-CD3/anti-EGFR en cultivos tridimensionales (organotípicos) con queratinocitos normales y transfectados con el genoma de HPV-16. Al co-cultivar queratinocitos HPV-positivos con linfocitos autólogos y el anticuerpo biespecífico, se redujo el crecimiento celular tanto en los cultivos en monocapa como en los tridimensionales; estos resultados apoyan la evaluación de este anticuerpo en protocolos preclínicos y clínicos (**Renard I, 2002**). Con los resultados obtenidos en los estudios *in vitro* y preclínicos con inhibidores para EGFR, se sustenta el uso de estos bloqueadores en protocolos clínicos. De hecho, ya ha iniciado un protocolo en el que se analiza el uso de un anticuerpo (Matuzumab) en pacientes con CaCU (**Kim T, 2004**).

Con respecto al PDGFR, a la fecha sólo existe un trabajo en el que se analizó la expresión del PDGFR β en 11 pacientes con displasia cervical leve, moderada y severa y en 4 pacientes con cáncer invasor del cuello uterino. Se encontró expresión de la proteína en todas las muestras, siendo ésta mayor en las muestras normales y con displasia leve que en las muestras invasoras (**Mayer TJ, 2000**). Existen más reportes sobre su expresión y participación en otros tumores ginecológicos tales como ovario, endometrio, sarcomas uterinos y mama. En el caso de cáncer de ovario se ha reportado incluso que la expresión del PDGFR α correlaciona con un pronóstico adverso y con tumores con un comportamiento clínico más agresivo (**Lassus H, 2004**). Así mismo se ha demostrado la co-expresión del receptor y su ligando y que al bloquear al PDGFR se bloquea la proliferación de células de cáncer de ovario (**Apte SM, 2004; Matei D, 2006**). Slomovitz encontró que el 90% de los tumores primarios de endometrio y el 100% de los tumores recurrentes de endometrio expresan PDGFR, y que en la mayoría de estos casos PDGFR estaba fosforilado, lo que sugiere que el Imatinib podría ser útil en estos pacientes (**Slomovitz BM, 2004**). Igualmente en sarcomas uterinos se ha demostrado la expresión de PDGFR β (**Caudell JJ, 2005**). En cáncer invasor de mama se ha reportado la expresión de PDGFR α así como una correlación asociada de la expresión con un comportamiento biológico más agresivo (**Carvalho I, 2005**), incluso

ya hay un estudio clínico de fase II en el que se evalúa el valor terapéutico de Imatinib en pacientes de cáncer de mama (**Modi S, 2005**).

Como ya se ha mencionado, no hay reportes sobre la participación de PDGFR en la carcinogénesis del CaCU, sin embargo se ha reportado que esta proteína puede participar en la carcinogénesis inducida por HPV, ya que se ha reportado que la transformación inducida por la proteína E5 del papilomavirus bovino (PVB) ocurre por la unión de la proteína E5 al PDGFR β induciendo la dimerización constitutiva del receptor independiente de ligando con la consecuente activación de éste y generación de señales mitogénicas (**Drummond BD, 1995**). Se ha demostrado que la interacción de E5 con PDGFR β es muy específica y compleja, y que de hecho este receptor puede ser un blanco específico para la oncoproteína viral involucrando así la vía del PDGF en la carcinogénesis mediada por el PVB (**Petti L, 1992; Nappi VM, 2002**). Estos datos fueron confirmados en un estudio en el que en células epiteliales mamarias de ratón, las cuales no expresan PDGFR β , la proteína E5 no fue capaz de inducir transformación celular. Sin embargo, al reintroducir el gen del *PDGFR β* , las células se hicieron susceptibles a la transformación maligna mediada por E5 (**Nilson LA, 1993**). Adicionalmente, como ya se mencionó en una sección previa, el PDGFR participa en el incremento de la PFI, lo cual en CaCU correlaciona con un mayor riesgo de recurrencia después de radioterapia y de morir con enfermedad progresiva (**Milosevic M, 2001b**). Esta evidencia sugiere que el bloqueo de este receptor mediante el uso de los bloqueadores específicos como el imatinib, como una estrategia terapéutica en CaCU, pudiera tener beneficios clínicos en los pacientes.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A pesar de que el CaCU puede ser considerado como un modelo de detección temprana, éste sigue siendo una de las principales causas de muerte, por lo que es necesario implementar mejores esquemas terapéuticos que permitan aumentar la supervivencia y disminuir la mortalidad en estas pacientes. Se conoce bien la participación de HPV en el desarrollo de éste cáncer, sin embargo existen otras alteraciones genéticas y epigenéticas que probablemente están también participando en la carcinogénesis de este tumor; por ejemplo alteraciones genéticas y/o funcionales de receptores a factores de crecimiento que se encuentran en la membrana. Con el desarrollo de las terapias dirigidas, se ha hecho necesario conocer el estado mutacional de los genes blanco así como su expresión, para predecir el potencial terapéutico de estas terapias (Gefitinib e Imatinib).

OBJETIVO PRINCIPAL

Analizar el estado mutacional de los genes EGFR y PDGFR en cáncer cérvico-uterino, y valorar el potencial terapéutico de Gefitinib e Imatinib en estos tumores.

OBJETIVOS PARTICULARES

Analizar la presencia de mutaciones en los exones 18, 19 y 21 del gen EGFR en tumores primarios de CaCU, en tejidos sanos y en 7 líneas celulares derivadas de CaCU, mediante secuenciación directa.

Analizar la presencia de mutaciones en los exones 12 y 18 del gen PDGFR α en tumores primarios de CaCU así como en tejidos sanos y en las líneas celulares, mediante secuenciación directa.

Analizar la expresión de las proteínas PDGFR α , PDGFR β , PDGFA y PDGFB en tumores primarios de CaCU así como en 7 líneas celulares de CaCU mediante inmunohistoquímica.

Analizar el efecto del PDGF y del Imatinib en la proliferación de una línea celular derivada de CaCU.

MATERIALES Y METODOS

Pacientes

Para el análisis de expresión de PDGF y PDGFR se analizaron 36 pacientes de CaCU en etapas IB2 a IIIB según la clasificación de la FIGO (Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia), las cuales recibieron radioterapia estándar junto con cisplatino semanal. El diagnóstico se hizo bajo examen de rutina al analizar un corte teñido con hematoxilina-eosina en microscopio de luz, de acuerdo a los criterios de WHO (World Health Organization). Las biopsias del tumor fueron tomadas antes de que las pacientes recibieran tratamiento en el instituto. Para el análisis mutacional de EGFR y PDGFR se usaron 17 tejidos congelados de pacientes de CaCU epidermoide que se tenían de otro estudio independiente.

Controles no-neoplásicos.

Para el análisis mutacional se incluyeron además de las muestras tumorales, 3 tejidos de cuello uterino obtenidas de histerectomías por patologías benignas y los linfocitos de 8 donadores sanos.

Cultivo de células y líneas celulares.

Todas las líneas celulares fueron crecidas en medio Modificado de Dulbecco (DMEM) y suero fetal de ternera al 10%, ambos de Gibco BRL Life Technologies (Grand Island, New York) a 37°C en una incubadora con CO₂ al 5%. Las líneas celulares HeLa, Caski, SiHa y C33A fueron obtenidas de la ATCC y las líneas CaLo, INBL, ViPa y ViBo fueron proporcionadas por el Dr. Alberto Monroy (CMN siglo XXI, IMSS). Para los ensayos de inmunocitoquímica, las células fueron crecidas en botellas de dos cámaras vessel Falcon[®] (Becton Dickinson, NJ.) y fijadas en formol por 24 horas a temperatura ambiente y re-hidratadas en una serie soluciones de etanol graduado. Posteriormente se realizó la inmunocitoquímica como se describe en la sección correspondiente.

Inmunohistoquímica

De los tejidos incluidos en parafina se obtuvieron cortes de 4-5µm de grosor, los cuales fueron desparafinados en xilol y re-hidratados en alcoholes graduados hasta llegar a agua bidestilada. Después de este paso tanto los cortes de parafina como las células fueron tratadas igual. Después de la hidratación, las laminillas fueron sumergidas en una solución de exposición de antígeno (buffer de citratos 10 mM, pH 6) y luego precalentadas a 95°C en un baño con agua y calentadas a 95°C por 40 min. Después se dejaron enfriar a temperatura ambiente por 20 minutos (min) y se lavaron en buffer PBS. Se bloqueó la peroxidasa endógena incubando con el Buffer de Bloqueo de DAKO (peróxido de hidrógeno al 0.3% con azida de sodio 15 mM) por 5 min a temperatura ambiente. Inmediatamente las laminillas fueron incubadas con los anticuerpos primarios correspondientes por 30 min usando una dilución 1:75; los anticuerpos que se usaron fueron: PDGF A (anticuerpo monoclonal sc-9974), PDGF B (anticuerpo policlonal sc-7878), PDGFR α (anticuerpo policlonal sc-338) y PDGFR β (anticuerpo monoclonal sc-6252), todos de Santa Cruz Biotechnology. La unión del anticuerpo primario fue revelada con el reactivo de visualización (Dako EnVision + System, peroxidase (DAB, K-4007 and K4011). Finalmente, las laminillas fueron contrateñidas con hematoxilina y eosina. Como controles positivos para ambos ligandos se usó placenta, y piel sana para los receptores. Como control negativo se omitió la incubación con el anticuerpo primario. El análisis de las laminillas fue realizado por dos patólogos, y se consideró como positiva una muestra cuando más del 5% de las células tumorales o del estroma dieron tinción para el anticuerpo.

Extracción de ácidos nucleicos

Se obtuvo DNA de 17 muestras de tumores de CaCU congelados así como de las 7 líneas celulares de CaCU, mediante la técnica de digestión con proteinasa K, extracción con fenol:cloroformo y precipitación con cloruro de sodio e isopropanol. Los tejidos congelados así como las líneas celulares, fueron incubadas en 600 µl buffer de lisis (Tris-HCl 0.01M pH 7.8; EDTA 0.02M y SDS 0.5%) con 300 ng de proteinasa K toda la noche a 37°C, posteriormente se añadió un volumen de fenol:cloroformo

agitando las muestras suavemente y separando el DNA mediante centrifugación a 3,500 rpm por 5min. Se recuperó la fase acuosa y se transfirió a un tubo limpio donde se lavó con otro volumen de cloroformo repitiendo la centrifugación. Finalmente la fase acuosa recuperada del paso anterior fue precipitada con un volumen de isopropanol y cloruro de sodio a una concentración final de 0.2M y el DNA se recuperó mediante centrifugación a 13,000 rpm por 15 min a 4°C. Se dieron entonces dos lavados con etanol al 70% y se dejó secar el botón de DNA. Finalmente el DNA fue resuspendido en 200-300 µl de agua estéril y cuantificado con espectrofotómetro.

Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).

Para el análisis mutacional se realizaron amplificaciones por PCR utilizando los oligonucleótidos que se muestran en la tabla 4. El PCR se realizó en reacciones de 20-µl que contenían 100 ng DNA, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 40 mmol/L KCl, 2 mmol/L MgCl₂, 200 µmol/L de cada dNTP, 1 µmol/L de cada primer y 0.25 U Taq polimerasa (Applied Biosystems). La reacción se llevó a cabo en un termociclador 2400 (Applied Biosystems) con las siguientes condiciones de ciclado: desnaturalización inicial a 94°C por 5 min seguida de 40 ciclos de amplificación y una extensión final de 5 min a 72°C. Los ciclos incluyeron desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineamiento a 60°C (para PDGFR) o 58°C (para EGFR) por 30 seg y extensión a 72°C por 30 seg. La amplificación se verificó con electroforesis en geles de agarosa al 3%. Para el gen EGFR se realizó un PCR anidado, utilizando un segundo par de oligonucleótidos localizado unos nucleótidos más adentro que el primer par. La primera amplificación fue verificada por electroforesis y se tomó 1µl de esta primera reacción como templado para la segunda. Los exones que se amplificaron fueron 12 y 18 para PDGFR α y 18, 19 y 21 para EGFR.

Tabla 4. Secuencias de los oligonucleótidos usados para PCR y secuencia.

GEN	EXÓN	NOMBRE	SECUENCIA	Tamaño esperado
PDGFRα	12	E12- <i>forward</i>	5'-aagctctggtgcactgggactt-3'	251 pb
	12	E12- <i>reverse</i>	5'-attgtaaagttgtgtgcaaggga -3'	
	18	E18- <i>forward</i>	5'-tacagatggcttgatcctgagt-3'	212 pb
	18	E18- <i>reverse</i>	5'-agtgtgggaggatgagcctg-3'	
EGFR	18	E18-1- <i>forward</i>	5'-caaatgagctggcaagtgccgtgtc-3'	400 pb
	18	E18-1- <i>reverse</i>	5'-gagtttccaaacactcagtgaaac-3'	
	18	E18-2- <i>forward</i>	5'-caagtgccgtgtcctggcacccaagc-3'	381 pb
	18	E18-2- <i>reverse</i>	5'-ccaaacactcagtgaacaaagag-3'	
	19	E19-1- <i>forward</i>	5'-gcaatcagccttaggtgaggctc-3'	372 pb
	19	E19-1- <i>reverse</i>	5'-catagaaagtgaacatttaggatgtg-3'	
	19	E19-2- <i>forward</i>	5'-ccttaggtgaggctccacagc-3'	349 pb
	19	E19-2- <i>reverse</i>	5'-catttaggatgtggagatgagc-3'	
	21	E21-1- <i>forward</i>	5'-ctaacgttcgccagccataagtcc-3'	415 pb
	21	E21-1- <i>reverse</i>	5'-gctgagctcaccagaatgtctgg-3'	
	21	E21-2- <i>forward</i>	5'-cagccataagtctcgactgg-3'	374 pb
	21	E21-2- <i>reverse</i>	5'-catcctcccctgcatgtgtaaac-3'	

Secuenciación

Los amplificadores obtenidos por PCR fueron analizados en geles de agarosa para verificar su integridad y posteriormente fueron purificados mediante precipitación con isopropanol. Los DNAs purificados fueron usados para preparar las reacciones de secuencia por ambos lados (sentido y antisentido) y de al menos dos amplificaciones independientes. Para la reacción de secuencia se utilizó el ABI BigDye kit v3.1 (ABI, Foster City, CA) según las instrucciones del proveedor, utilizando las siguientes condiciones de ciclado: desnaturalización inicial a 96°C por 5 min seguida de 25 ciclos de amplificación y una extensión final de 5 min a 60°C. Los ciclos incluyeron desnaturalización a 96°C por 10 segundos, alineamiento a 55°C por 10 seg y extensión a 60°C por 4 min. Posteriormente las reacciones fueron purificadas mediante precipitación con isopropanol, deshidratadas y resuspendidas en 20 µl de formamida (HiDi formamide- ABI), desnaturalizadas a 96°C por 5 min y enfriadas a 4°C. Posteriormente fueron analizadas en un secuenciador ABI3100. Los electroferogramas que se obtuvieron fueron analizados para la detección de mutaciones, comparando con una secuencia de referencia (AY588246 para EGFR y D50017 para PDGFR α).

Ensayos de Proliferación Celular

Se sembraron células CaLo en placas de 12 pozos a una densidad de 1×10^3 células/pozo. Cada grupo experimental fue repetido por triplicado. Los grupos fueron: control (sin tratamiento), tratados con PDGF-BB a 10 ng/mL, tratados con Imatinib a una concentración de 10 µM (preparado fresco en agua bidestilada) y el grupo tratado con ambos (ligando e imatinib). Los tratamientos duraron 3 días, posteriormente el medio fue reemplazado con medio fresco por dos días más. Cada pozo fue analizado con el método de Cristal Violeta: las células fueron incubadas por 30 min en cristal violeta al 0.1% a temperatura ambiente, posteriormente se eliminó el exceso de tinción con agua bidestilada y se dejaron secar las placas; se extrajo el colorante con ácido acético al 10% y en ese momento se leyeron las placas en un lector de placas (Wallac 1420; Perkin Elmer, Boston, MA, USA) a 570 nm. Con este método se ha demostrado una correlación lineal entre la absorbancia y el número de células en un rango de 1,000

a 50,000 células/pozo. Los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados de presentan como media y desviación estándar. El análisis estadístico de los ensayos de proliferación se realizó con la prueba ANOVA.

Western Blot

Se cultivaron células CaLo en medio D-MEM completo en botellas de 75 cm². Cuando alcanzaron una confluencia del 50-75% fueron lavadas dos veces con PBS y cultivadas en medio libre de suero por dos días. Se estimularon con PDGF BB a 10 ng/mL por 10 min y tratadas con Imatinib a 10 µM por 2 horas; o bien tratadas con Imatinib por 2 horas y luego con PDGF BB por 15 min. Las células control no recibieron tratamiento alguno. Posteriormente fueron lavadas con PBS frío e incubadas con 0.2mL de buffer de lisis (Cell Signaling Technologies, Beverly, MA) a 4°C por 30 min. Los lisados celulares fueron centrifugados por 10 min a 10,000 x g. En el sobrenadante resultante se hizo la cuantificación de proteínas mediante el método del ácido bisinconinico. Posteriormente, las proteínas fueron hervidas en buffer de muestra con SDS y separadas en electroforesis en geles de poliacrilamida. Las proteínas fueron transferidas a una membrana Hybond-P (Amersham, Biosciences UK), bloqueadas por 1 hora con leche libre de grasa al 5% en TBS (Buffer salino de Tris, 1X). La membrana fue luego incubada con un anticuerpo primario específico para p-PDGFR α , (Tyr 754 sc- 12911-R, Santa Cruz Biotechnology, CA); la homogeneidad de la carga (20 µg) fue confirmada mediante la detección de actina en la misma membrana usando un anticuerpo específico a ella (Santa Cruz Biotechnology). Al terminar la incubación con el anticuerpo primario, se lavo la membrana y posteriormente se incubó por 1 hora con un anticuerpo secundario. La reacción fue detectada mediante quimioluminiscencia (ECL; Biosciences UK).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis mutacional de EGFR en líneas celulares de CaCU.

Las terapias dirigidas al EGFR que se han probado al momento han tenido blancos tumorales específicos, sin embargo considerando la participación de este oncogén en la carcinogénesis de CaCU es posible que estas terapias dirigidas tengan algún efecto terapéutico en este tumor. Por otro lado, se ha reportado en la literatura que es necesaria la presencia de ciertas mutaciones para que los tumores respondan al gefitinib, así como también la existencia de mutaciones que inhiben el efecto de esta terapia. Con el objetivo de determinar si el CaCU puede ser blanco de tratamiento con gefitinib, se hizo un análisis de secuencia de la región del gen de EGFR que codifica para el dominio TK de la proteína (exones 18, 19 y 21), en 8 líneas celulares derivadas de tumores primarios de CaCU. Las líneas C33A, Caski, SiHa, InBl y CaLo fueron silvestres en los tres exones, mientras las líneas HeLa, ViPa y ViBo presentaron el cambio IVSE18-104C>A (rs17337100) el cual ya ha sido reportado. Adicionalmente la línea celular ViBo presentó múltiples cambios: en el exón 18 se encontraron 16 mutaciones intrónicas, 4 mutaciones silenciosas y una delección de 13 nucleótidos en el intrón muy cerca del inicio del exón 18, y en el exón 19 se encontraron 13 mutaciones intrónicas. De estos cambios solo uno de ellos ha sido previamente reportado, los demás eran desconocidos hasta ahora. Todos los cambios encontrados en esta línea celular fueron homocigos. En la **Tabla 5** se muestran todas las mutaciones encontradas en las líneas celulares. En la **Figura 6** se muestra una parte de la secuencia del exón 18 de ViBo en el que se señalan algunas de las mutaciones mencionadas.

La línea celular ViBo presentó numerosos cambios intrónicos incluyendo una delección. Esta línea celular fue obtenida de un carcinoma epidermoide IIIB. Hasta el momento no sabemos si todos los cambios que se presentaron en la línea celular ViBo puedan tener alguna consecuencia funcional en el gen EGFR y en la actividad del gefitinib, ya que todos ellos fueron encontrados en las secuencias intrónicas que

flanquean los exones 18 y 19. Sin embargo algunos de ellos se encuentran cerca del inicio o del final de exón lo que podría afectar el procesamiento del RNA mensajero. Para determinar si se afecta la proteína, es necesario analizar la funcionalidad del gen en ensayos de estimulación con EGF y de la consecuente activación del receptor en esta línea celular.

Tabla 5. Análisis de la secuencia de los exones 18, 19 y 21 del gen EGFR en líneas celulares derivadas de CaCU.

Línea Celular	Exón 18			Exón 19		Exón 21
	cambio	posición	reporte	cambio	posición	
C33A	TS			TS		TS
Caski	TS			TS		TS
InBl	TS			TS		TS
CaLo	TS			TS		TS
SiHa	TS			TS		TS
HeLa	C>A	IVSE18-104	rs17337100	TS		TS
ViPa	C>A	IVSE18-104	rs17337100	TS		TS
ViBo	C>A	IVSE18-104	rs17337100	C>T	IVS19-98	TS
	T>C	IVSE18-70		C>T	IVS19-88	
	T>C	IVSE18-55		C>A	IVS19-79	
	A>G	IVSE18-49		A>C	IVS19-68	
	G>C	IVSE18-41		G>A	IVS19-62	
	G>A	IVSE18-40		A>T	IVS19-55	
	T>G	IVSE18-33		A>G	IVS19-45	
	C>T	IVSE18-9		G>A	IVS19-24	
	C>T	IVSE18+28		T>C	IVS19-17	
	G>A	IVSE18+32		G>A	IVSE19+23	
	G>A	IVSE18+35		G>A	IVSE19+34	
	T>C	IVSE18+43		A>G	IVSE19+40	
	G>A	IVSE18+50		C>G	IVSE19+83	
	T>C	IVSE18+74				
	G>A	IVSE18+75				
	C>A	IVSE18+76				
	del 156880-156892 CCCTGGCACAGGC					
A>G	Codón 693					
A>G	Codón 713					
C>A	Codón 724					
A>G	Codón 725					

En la tabla se muestran los resultados de todas las líneas celulares analizadas. TS = Tipo Silvestre, IVS = “*intronic variation sequence*”. Sólo una de las mutaciones ha sido reportada previamente (IVS18-104, rs17337100).

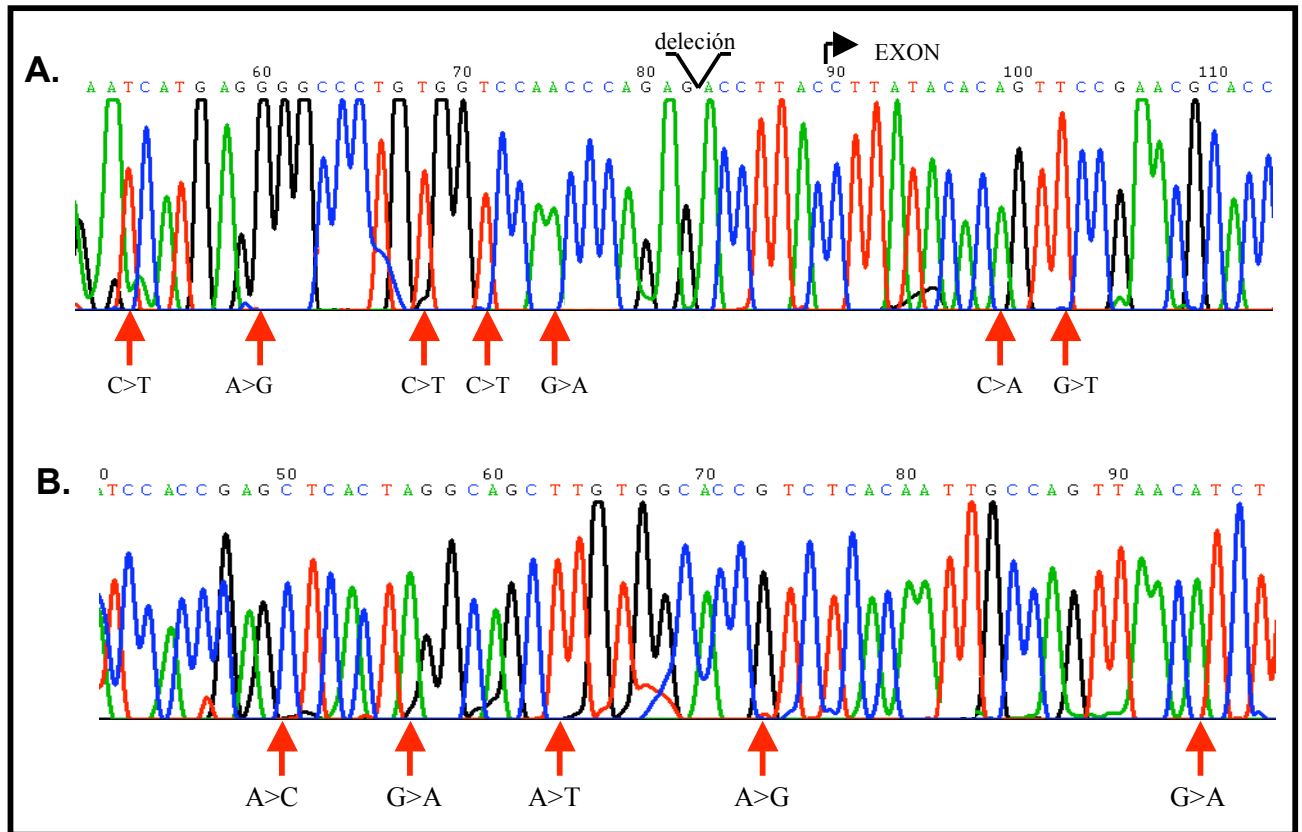


Figura 6. Secuenciación del gen EGFR en las líneas celular ViBo. Se muestra un fragmento de secuencias de los exones A) 18 y B) 19. Las flechas debajo de las secuencias indican las mutaciones y en la parte superior de la secuencia A se señala el sitio donde se encontró la deleción de 13 nucleótidos.

Análisis mutacional de EGFR en tumores de CaCU y controles.

Para esto se analizaron 17 muestras de tumores primarios de CaCU y como controles no-neoplásicos 3 biopsias de cuello uterino y los linfocitos de 8 donadores sanos. No se encontraron mutaciones en ninguna muestra. Solo se encontró un polimorfismo intrónico en 3 muestras (17.6%) de pacientes: IVS18 +19 en el que se observa el cambio G>A, el cual ya ha sido reportado (rs17337107). En la **Tabla 6** se muestra un resumen de los resultados de la secuenciación de una muestra representativa de la población analizada. En la **Figura 7** se muestra una secuencia que presenta el polimorfismo intrónico encontrado.

En el presente trabajo encontramos que no existen alteraciones génicas al menos en los exones 18, 19 y 21 del EGFR que pudieran interferir positiva o negativamente con la respuesta al gefitinib. De hecho en un trabajo previo encontramos que una paciente con cáncer bronquioloalveolar que tampoco presentó mutaciones en este gen, tuvo una respuesta clínica muy favorable al tratamiento con Gefitinib (**Taja CL, 2005**), por lo que nosotros creemos que es posible utilizar a este fármaco en la terapéutica del CaCU. Así mismo consideramos necesario el desarrollo de un protocolo clínico que evalúe esta posibilidad.

El número de muestras analizadas en este trabajo fue pequeño, por lo que para poder concluir que no existen mutaciones puntuales en el gen EGFR en tumores de CaCU, es necesario analizar un mayor número de tumores y poder determinar la factibilidad del uso de terapias dirigidas como lo es el gefitinib, para el cual se ha encontrado que, para que el tumor responda o sea resistente, es necesaria la presencia de mutaciones específicas. Así mismo es necesario considerar el uso de las otras estrategias inhibitorias dirigidas a este gen para la terapéutica del CaCU.

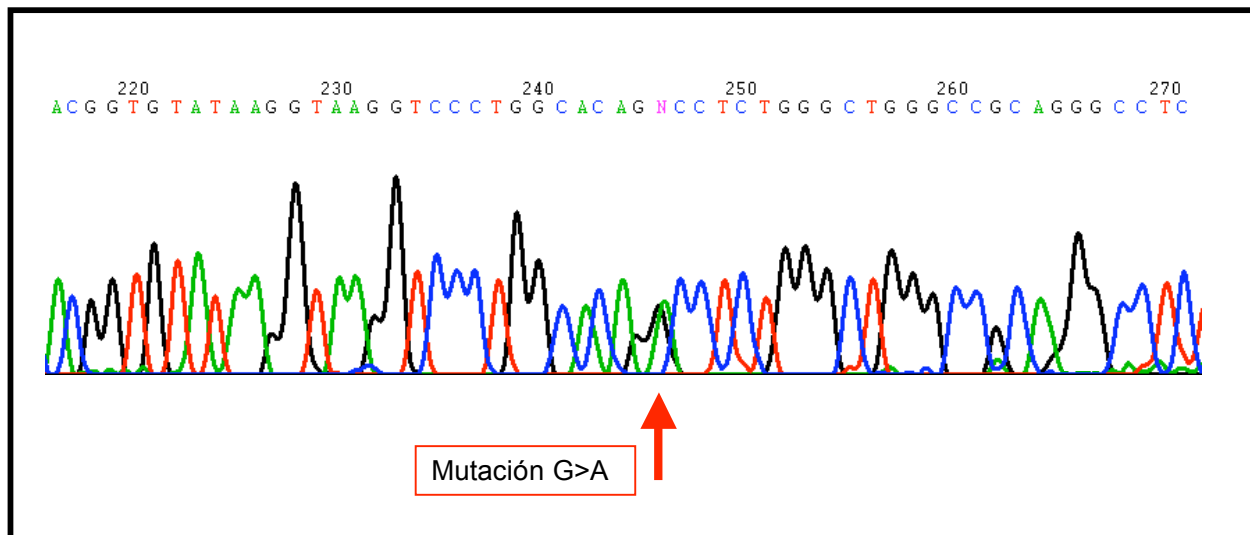


Figura 7. Secuenciación del tumor CU-794. Se muestra un fragmento de secuencia del exón 18 en la que la flecha señala la mutación intrónica IVS18+19.

Tabla 6. Análisis de la secuencia de los exones 18, 19 y 21 del gen EGFR en tumores primarios CaCU y controles.

MUESTRA	EXON 18	EXON 19	EXON 21
CU-194	TS	TS	TS
CU-493	TS	TS	TS
CU-693	G > A IVS18 +19	TS	TS
CU-794	G > A IVS18 +19	TS	TS
CU-1094	G > A IVS18 +19	TS	TS
CN-893	TS	TS	TS
CN-993	TS	TS	TS
CN-994	TS	TS	TS
LTC	TS	TS	TS
ACB	TS	TS	TS

En la tabla se muestran los resultados de solo algunos ejemplos de las muestras y controles. CU = CaCU, CN = Cérvix Normal, LTC y ACB donadores de linfocitos. TS = Tipo Silvestre, IVS = “*intronic variation sequence*”.

Expresión de PDGFR y PDGF en líneas celulares derivadas de CaCU.

Se conoce más sobre la participación del EGFR en CaCU, sin embargo la participación de otros receptores como el PDGFR ha sido demostrada en otros tumores, y se ha sugerido su participación en CaCU (**Drummond BDA, 1995**). Sin embargo, solo existe un trabajo en el que se estudia la expresión de este receptor en lesiones tempranas de CaCU (**Mayer TJ, 2000**). Se sabe que existe una estimulación autócrina de este receptor por lo que es importante que éste se active y por lo tanto también tienen que estar presentes los ligandos. El desarrollo de moléculas que inhiben este receptor y su aplicación en cáncer, abre la posibilidad de utilización en diversas neoplasias.

A diferencia del EGFR en el que se demostró que no es importante la cantidad de proteína que se expresa para el funcionamiento del gefitinib, pero si la presencia de mutaciones, para el PDGFR es importante la co-expresión de receptores y ligandos. Por esto se analizó la expresión de los diferentes miembros de la familia de PDGF en 8 líneas derivadas de tumores primarios de CaCU. En la **Tabla 7** se muestra que todas las líneas analizadas expresaron PDGFR α pero ninguna expresó PDGFR β . El ligando PDGFB fue detectado en cinco de las ocho líneas (62.5%), mientras que el 50% (4) de ellas expresaron PDGFA. Interesantemente, todas las líneas co-expresaron el PDGFR α con al menos uno de los ligandos. Sólo la línea celular CaLo expresó simultáneamente ambos ligandos con el receptor α . De hecho ésta línea fue la que se seleccionó para los siguientes experimentos. En la **Figura 8** se muestra una imagen de la inmunocitoquímica de PDGFR α en CaLo.

Al igual que en los tumores primarios, la co-expresión de al menos un receptor con uno de los ligandos fue un evento muy común en las líneas celulares. En este caso, en

100% de las líneas analizadas, apoyando un mecanismo de estimulación autócrino y parácrino en CaCU. Sorprendentemente no se encontró expresión en ninguna de las líneas del PDGFR β pero si del ligando B, caso contrario al observado en las muestras de tumores en los que se encontró expresión del receptor β pero no del ligando B. Al tratarse de líneas celulares, éstas no reflejan exactamente lo que ocurre en los tumores primarios, ya que se pudieron seleccionar características durante el establecimiento de la línea que no se encuentran en el tumor primario. Sin embargo, se encuentra que la co-expresión de miembros de la familia del PDGF es una característica presente en ambos tipos de muestras, sugiriendo que este es un evento común en el CaCU.

Para poder establecer si la expresión diferencial observada para el receptor β y el ligando B es una característica propia del CaCU es necesario analizar un mayor número de muestras, de preferencia de diferentes estadios de la evolución de este tumor.

Tabla 7. Expresión de la familia del PDGF en líneas celulares de CaCU

Cell line	PDGFR α	PDGFA	PDGFR β	PDGFB
C33A	+	-	-	+
INBI	+	-	-	+
ViPa	+	-	-	+
ViBo	+	-	-	+
HeLa	+	+	-	-
SiHa	+	+	-	-
CaLo	+	+	-	+
CasKi	+	+	-	-

La expresión fue analizada por inmunocitoquímica. Se consideró positivo cuando más del 5% de la población celular presento tinción.

Expresión de PDGFR y PDGF en tumores primarios de CaCU.

Con el objetivo de determinar si miembros de la familia del PDGF se expresan en CaCU, evaluamos en 36 tumores primarios de CaCU la expresión tanto de ligandos como de los receptores para el factor de crecimiento derivado de plaquetas mediante inmunohistoquímica. Encontramos que el PDGFR α se expresó en la porción tumoral de las muestras en 15 casos (41.6%). 5 de ellos (13.8%) también mostraron señal positiva en el estroma (3 de ellos en ambos componentes y los otros dos solo en el estroma). Con respecto al PDGFR β , se encontró señal positiva en la porción tumoral y estroma en 19 (52.7%) y 16 casos (44.4%) respectivamente. De estos casos, 12 presentaron expresión en ambos componentes, mientras que 7 y 4 casos presentaron señal sólo en las células tumorales o el estroma respectivamente.

Con respecto a la expresión de los ligandos, ésta sólo se pudo estudiar en 25 casos, debido a que el material fue insuficiente. Se encontró que el PDGFA se expresa en el 60% de los casos en el tumor (15 muestras), y en 17 tumores (68%) se expresa en el estroma; de éstos, 14 (65%) muestras presentan señal en ambos componentes. Ninguna de las muestras expresó PDGFB. En la **Figura 9** se muestran los resultados globales de la expresión de estos miembros de la familia del PDGF, y en la **Figura 8** se muestran fotografías representativas de la inmunohistoquímica de tumores primarios que expresaron PDGFR α , PDGFA y PDGFR β . Además se muestra la línea celular CaLo que fue positiva para PDGFR α .

En diferentes tumores donde se ha demostrado la participación de la familia del PDGF, se ha demostrado la expresión simultánea de receptores y ligandos, lo cual sugiere un mecanismo de estimulación autócrino (**Matei D, 2006**). Esta expresión simultánea de diferentes miembros de la familia del PDGF no ha sido estudiada en CaCU. En este trabajo evaluamos en 36 tumores primarios de CaCU la expresión de receptores y ligandos tanto en las células tumorales como en el estroma. La expresión de estas

proteínas en el estroma es importante, ya que son reguladores de la proliferación y migración de células del mesénquima durante el desarrollo, por lo que pueden tener un papel importante en el reclutamiento de fibroblastos y en la progresión tumoral (Forsberg K, 1993; Dong J, 2004). Nuestros resultados indican que prácticamente la mitad de los tumores (42%) co-expresan PDGFR α y/o PDGFR β con PDGFA, tanto en las células tumorales como en el estroma (como se puede ver en la figura 6). De hecho el 78% de las muestras expresó el PDGFR α o bien el PDGFR β . No se observó expresión del PDGFB en ninguna de las muestras, sin embargo no podemos saber si esta es una característica particular del CaCU. Esta elevada frecuencia de co-expresión de receptores y ligando A, sugiere un mecanismo de estimulación autócrino y parácrino.

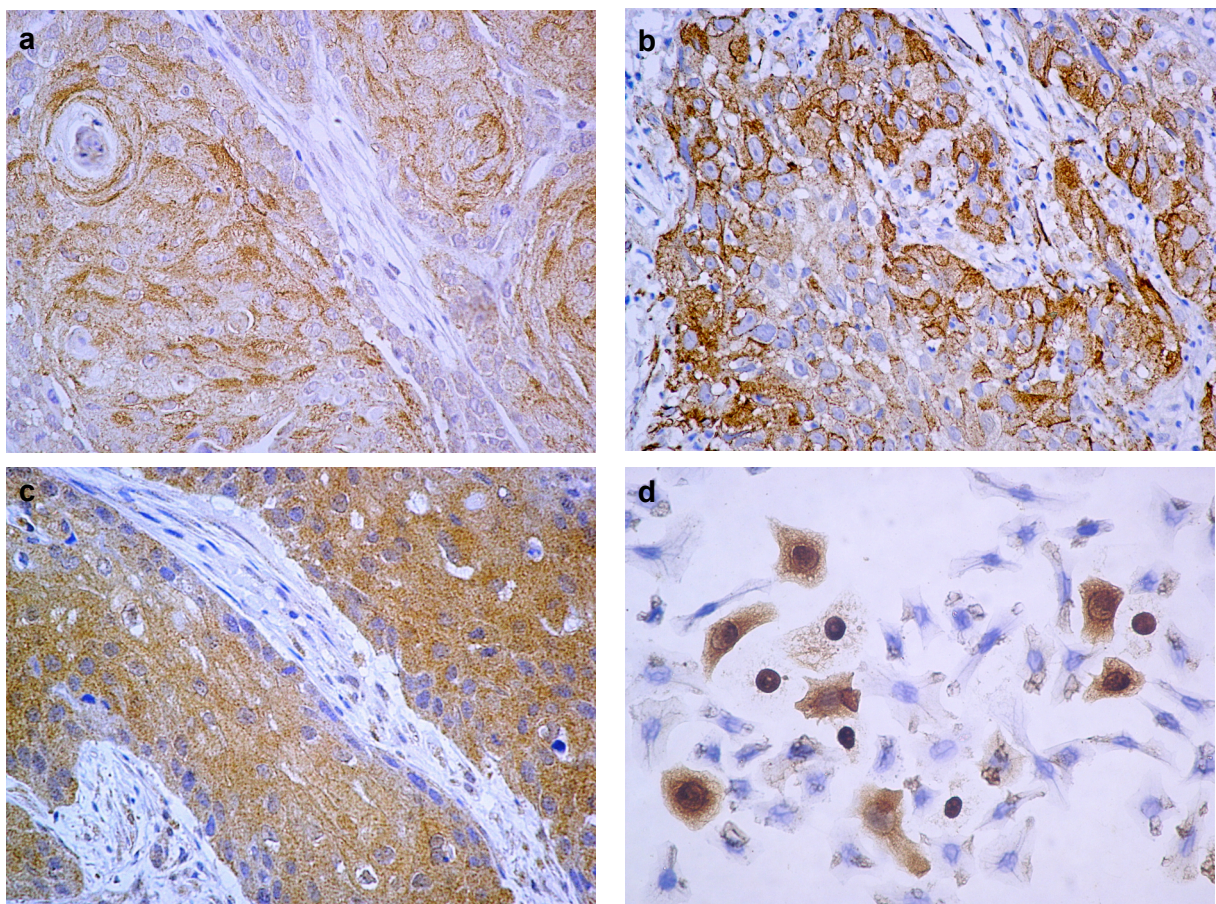


Figura 8. Inmunohistoquímica para el PDGFR. En la foto se muestran ejemplos representativos de 3 tumores que expresaron: a) PDGFR α , b) PDGFA and c)

PDGFR β . (100X). En d) se muestra tinción positiva para PDGFR α en la línea celular CaLo (400X).

En cáncer de mama se ha reportado una correlación entre factores de mal pronóstico con la expresión de PDGFR (**Heinrich MC, 2003**), sin embargo en este trabajo no se encontró correlación entre ninguna combinación de expresión de los receptores y ligando, con características clínicas de los pacientes o con supervivencia (resultados no-mostrados). Esto no excluye un potencial valor pronóstico de estas proteínas en CaCU.

Case	PDGFR α	PDGFA	
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			
18			
19			
20			
21			
22			
23			
24			
25			
26			
27			
28			
29			
30			
31			
32			
33			
34			
35			
36			

FIGURA 9. Expresión de PDGFR α , PDGFR β y PDGFA en tumores primarios de CaCU. El recuadro gris indica positivo, el blanco negativo y el rallado no realizado. Se observa que la mayoría de las muestras co-expresan receptores y ligandos.

Análisis mutacional de PDGFR α en las líneas celulares de CaCU.

Recientemente se está evaluando el empleo de imatinib en tumores ginecológicos, sin embargo no se ha incluido la evaluación en pacientes con CaCU. Considerando la posible participación del PDGFR en la carcinogénesis de este tumor y dado que se ha reportado en otros tumores la existencia de mutaciones activadoras que pueden alterar la respuesta al imatinib (Carvalho I, 2005; Corless CL, 2005), nosotros evaluamos el estado mutacional de este gen en líneas celulares derivadas de CaCU y en tumores primarios de CaCU.

Para llevar a cabo lo anterior, se estudió la secuencia de los exones 12 y 18 del gen PDGFR (que codifican para el dominio TK de la proteína), en 8 líneas celulares derivadas de tumores primarios de CaCU. Las líneas ViPa, Hela, Calo e InBl fueron silvestres para el exón 12 y presentaron la mutación silenciosa del codón 824 en el exón 18. Por otro lado, las líneas C33, CasKi y SiHa fueron silvestres en el exón 18 y presentaron una mutación no-conservativa en el codón 571 en el exón 12 G>A en el que se cambia una Glutamina por una Lisina. La línea celular ViBo presentó 3 mutaciones silenciosas en el exón 12 y 2 mutaciones intrónicas. Las mutaciones silenciosas fueron G >A en el codón 567 [rs1873778], G >A en el codón 577 y A >G en el codón 584. En el exón 18 se encontraron dos mutaciones intrónicas. La gran mayoría de los cambios que presenta esta línea celular no han sido descritos.

En la **Tabla 8** se muestra un resumen de los resultados de secuenciación de las líneas celulares. En la **Figura 10** se muestran fragmentos de secuencia del exón 12 en los que

se muestran las mutaciones silenciosas y no-conservativas que se encontraron en las líneas celulares ViBo y C33.

Tabla 8. Análisis de la secuencia de los exones 12 y 18 del gen PDGFR α en las líneas celulares derivadas de CaCU.

LINEA CELULAR	EXON 12				EXON 18			
	Localizac	cambio	posición	a.a.	Localizac	cambio	posición	a.a.
ViBo	Exón	G>A	Codón 567	Pro>Pro	Intrón	C >G	IVS18+21	---
	Exon	G>A	Codón 577	Pro>Pro	Intrón	A >G	IVS18+25	---
	Exon	A>G	Codón 584	Ser>Ser	----			
	Intron	A> G	IVS12 +17	----	----			
	Intron	T> C	IVS12 +35	----	----			
ViPa	TS				Exón	C >T	Codón 824	Val>Val
HeLa	TS				Exón	C >T	Codón 824	Val>Val
CaLo	TS				Exón	C >T	Codón 824	Val>Val
INBL	TS				Exón	C >T	Codón 824	Val>Val
C33	Exón	G >A	Codón 571	Glu >Lys	TS			
Caski	Exón	G >A	Codón 571	Glu>Lys	TS			
SiHa	Exón	G >A	Codón 571	Glu>Lys	TS			

Las líneas celulares Vipa, Hela, Calo e InBl fueron silvestres en el exón 12 y presentaron una mutación silenciosa en el exón 18 en el codón 824, la cual ya ha sido reportada previamente [rs10015469]. Las líneas C33, Caski y SiHa fueron silvestres para el exón 18 y presentaron una mutación no-conservativa en el exón 12 en el codón 571 que no ha sido reportada. En el exón 12, la línea celular ViBo presentó 3 mutaciones silenciosas y dos intrónicas, de las cuales sólo la mutación G>A en el codón 567 ha sido reportada [rs1873778]; adicionalmente en el exón 18 se encontraron 2 mutaciones intrónicas desconocidas.

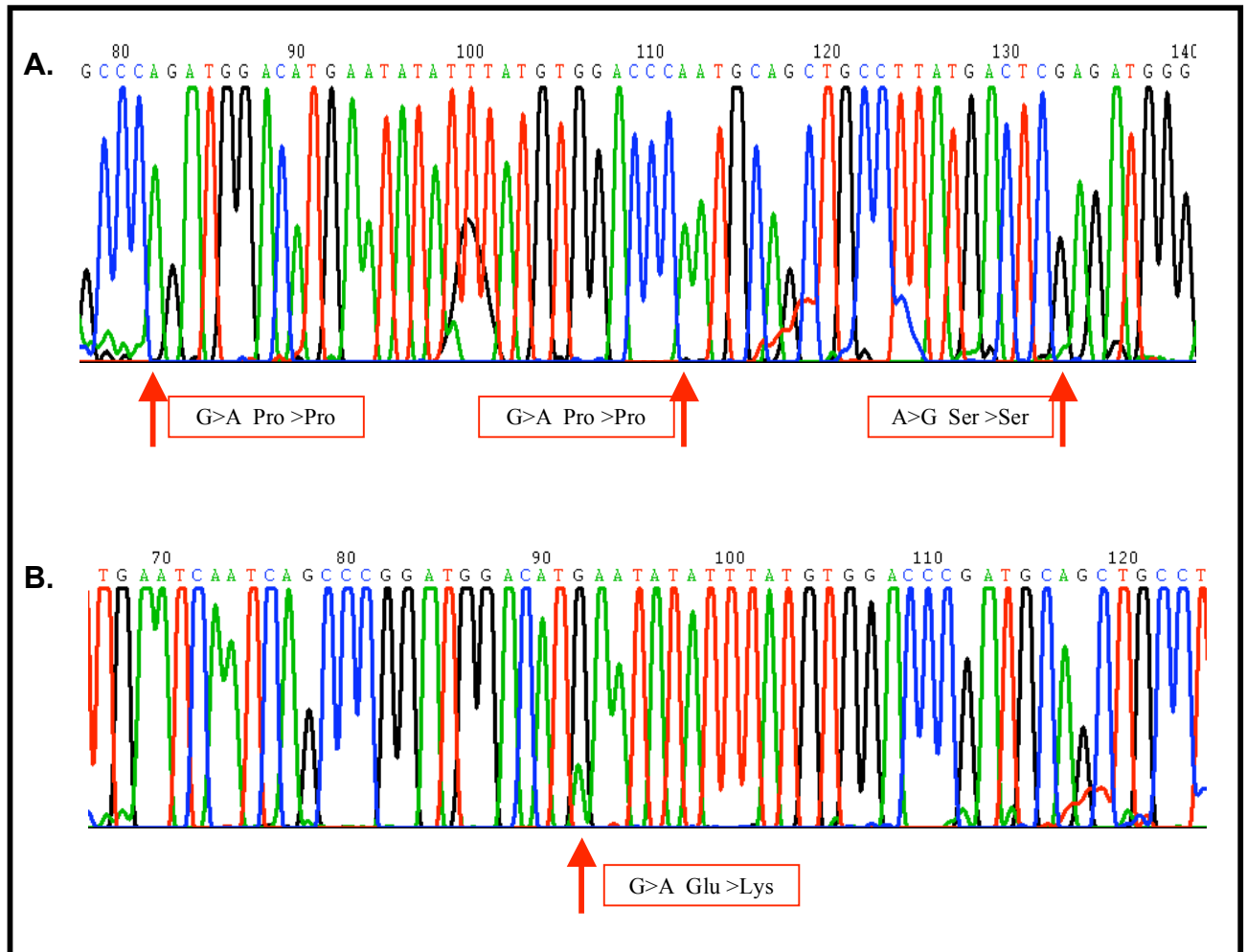


Figura 10. Secuenciación del gen PDGFR en las líneas celulares de CaCU. Se muestra un fragmento de secuencias del exón 12 de las líneas: **A)** línea celular ViBo en la que se muestran las mutaciones silenciosas, y **B)** línea celular C33 en la que se señala la mutación no-conservativa.

Los resultados de secuencia en las líneas celulares indican la presencia de diferentes mutaciones intrónicas y exónicas, la mayoría de las cuales no ha sido reportada previamente. En tres líneas celulares encontramos una mutación en el codón 571 (G>A) que genera el cambio de aminoácido Glu > Lys, el cual no ha sido reportado previamente; sin embargo se ha reportado una delección/sustitución SPDGHE566-571R (**Lasota J, 2004**) la cual involucra el codón 571 (que corresponde al dominio juxtamembranal de la proteína). No se conoce si este cambio tiene efecto en la

sensibilidad del Imatinib, pero si se sabe que incrementa la activación del PDGFR α en presencia del PDGFA (Corless CL, 2005). Esto sugiere que la mutación que nosotros encontramos, al afectar el codón 571, pudiera afectar el funcionamiento de PDGFR α . En un intento de estudiar el posible efecto de esta mutación sobre la proteína, utilizamos un programa de simulación (<http://www.bork.embl-heidelberg.de/PolyPhen/>) para predecir si la mutación que encontramos podría tener algún significado biológico. Los resultados indicaron que el cambio G>A en el codón 571 es “benigno”. El análisis con este programa es solo una aproximación teórica, por lo que es necesario trabajar con un sistema experimental para averiguar el significado biológico de esta mutación (Tchernitchko D, 2004).

Por otro lado, la mayoría de los cambios intrónicos que encontramos, esta localizados cerca de los exones, por que se debe estudiar si tienen algún efecto biológico.

Análisis mutacional de PDGFR α en muestras de CaCU y controles.

Evaluamos el estado mutacional del gen PDGFR α en muestras de tumores primarios de CaCU, mediante el análisis por secuenciación directa de los exones 12 y 18 del gen PDGFR α en 17 tumores. Todas las muestras de pacientes fueron silvestres en el exón 12, mientras que en el exón 18, 10 de las 17 muestras (58.8%) presentaron la mutación silenciosa C >T (GTC>GTT; Val>Val) en el codón 824. Esta mutación ha sido reportada previamente [rs10015469]. Los resultados para estas muestras se pueden ver en la **Tabla 9**.

Con respecto a las 11 muestras no-tumorales, se encontró en el exón 12 una mutación intrónica (IVS12+22 C>A) anteriormente reportada [rs2307051] en dos muestras de tejido cervical, las demás fueron silvestres. Por otro lado en el exón 18, 6 de las 11

muestras (54.5%) presentaron la misma mutación silenciosa en el codón 824 que se observó en las líneas celulares de CaCU. Los resultados de secuencia de las muestras control se pueden ver en la **Tabla 10**. En la **Figura 11** se muestra un fragmento de la secuencia del exón 18 en la que se señala el polimorfismo del codón 824.

Tabla 9. Análisis de la secuencia de los exones 12 y 18 del gen PDGFR α en muestras de CaCU.

Muestra	EXON 12	EXON 18			
		localización	cambio	posición	aminoácido
CU-194	TS	TS			
CU-493	TS	Exón	C > T GTC > GTT ht	Codón 824	Val > Val
CU-693	TS	TS			
CU-794	TS	Exón	C > T GTC > GTT hm	Codón 824	Val > Val
CU-1094	TS	Exón	C > T GTC > GTT ht	Codón 824	Val > Val
CU-1194	TS	Exón	C > T GTC > GTT ht	Codón 824	Val > Val
CU-1494	TS	TS			
CU-1593	TS	Exón	C > T GTC > GTT ht	Codón 824	Val > Val
CU-2294	TS	Exón	C > T GTC > GTT ht	Codón 824	Val > Val
CU-3194	TS	Exón	C > T GTC > GTT hm	Codón 824	Val > Val
CU-3293	TS	Exón	C > T GTC > GTT ht	Codón 824	Val > Val
CU-3994	TS	Exón	C > T GTC > GTT hm	Codón 824	Val > Val
CU-4594	TS	TS			
CU-4793	TS	TS			
CU-4994	TS	TS			
CU-5393	TS	TS			
CU-5593	TS	Exón	C > T GTC > GTT ht	Codón 824	Val > Val

CU = Paciente de CaCU. Los polimorfismos se presentaron ht = heterocigos o bien hm = homocigos. [RefSeq accession D50017]. Todos los pacientes fueron silvestres para el exón 12; en el exón 18, 10 de 17 (58.8%) presentaron la mutación silenciosa C > T en el codón 824, que ya ha sido reportada [rs10015469].

Tabla 10. Análisis de la secuencia de los exones 12 y 18 del gen PDGFR α en muestras no-tumorales.

MUESTRA	EXON 12			EXON 18			
	Localización	cambio	posición	Localización	cambio	posición	aminoácido
CN-893	Intrón	C > A	IVS12 +22	Exón	C >T GTC>GTT hm	Codón 824	Val > Val
CN-993	Intrón	C > A	IVS12 +22	Exón	C >T GTC>GTT hm	Codón 824	Val > Val
CN-994	TS			Exón	C >T GTC>GTT ht	Codón 824	Val > Val
LTC	TS			TS			
ACB	TS			TS			
CTB	TS			Exón	C >T GTC>GTT ht	Codón 824	Val > Val
DME	TS			W			
EPC	TS			TS			
M	TS			Exón	C >T GTC>GTT ht	Codón 824	Val > Val
NVL	TS			Exón	C >T GTC>GTT ht	Codón 824	Val > Val
VRC	TS			TS			

CN = Cérvix normal. LTC, etc., muestras de linfocitos normales. Los polimorfismos se presentaron ht = heterocigos o bien hm = homocigos. [RefSeq accesión D50017].

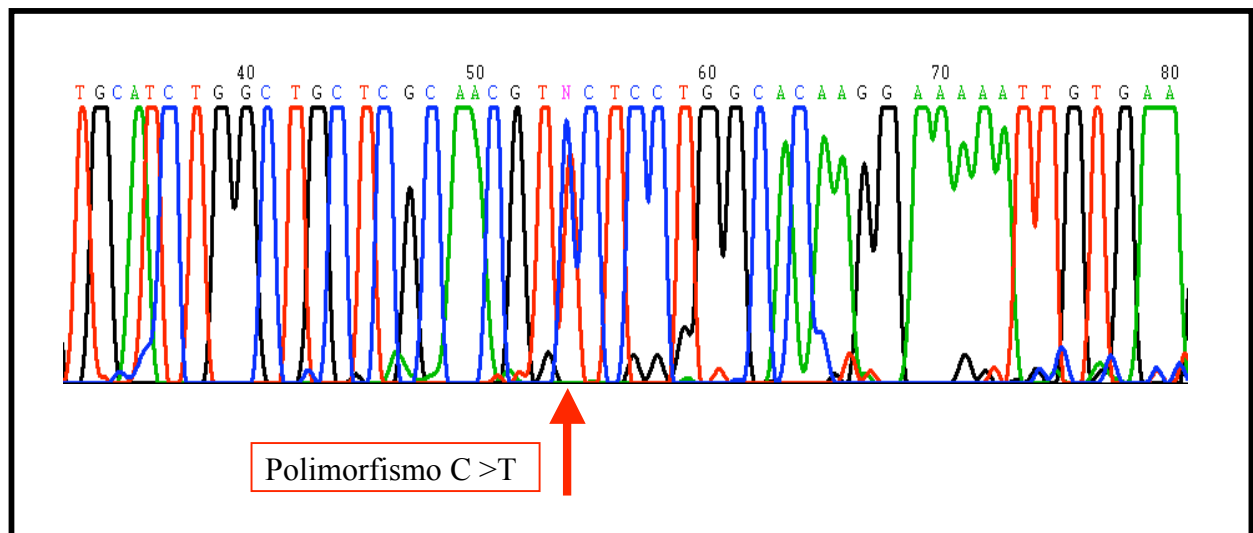


Figura 11. Secuenciación del gen PDGFR en tumores primarios de CaCU. Se muestra un fragmento representativo de una secuencia del exón 18 del paciente CU-1593. La flecha señala el polimorfismo del codón 824.

Ninguna de las muestras presentó mutaciones, excepto por un cambio intrónico cerca del exón 12, el cual ya ha sido reportado y del que no se sabe tenga algún efecto en la proteína. Con respecto al exón 18 se encontró una elevada frecuencia de presentación de una mutación silenciosa (en la que no se cambia el aminoácido), de hecho considerando que se presentó en más del 50% de la población analizada, ésta debe ser considerada como un polimorfismo, y debido a que no se cambia el aminoácido codificado en ese codón, no debe tener repercusiones funcionales en la proteína.

Inhibición de la Proliferación Celular por Imatinib.

No es suficiente la expresión de PDGFR o sus ligandos para concluir que la vía de estos receptores es funcional y que pueden regular el crecimiento de los tumores que lo expresan, por lo que con el objetivo de evaluar si la familia del PDGF tiene alguna participación en la regulación de la proliferación en tumores de CaCU, se cultivó la línea celular CaLo (la cual expresa ambos receptores y el ligando A) por dos días en ausencia de suero (para inducir arresto celular) y después incubadas con Imatinib, PDGFBB o con ambos por cinco días.

Se encontró que el ligando BB estimuló la proliferación en un 37% comparado con el control no-tratado ($p < 0.001$). Por el contrario, el tratamiento con Imatinib causó una inhibición estadísticamente significativa de la proliferación ($p < 0.001$). Cuando las células fueron tratadas con ambos, el imatinib inhibió parcialmente el efecto estimulador de la proliferación del ligando ($p < 0.001$). En la **Figura 12** se muestran estos datos.

Nuestros resultados demuestran claramente, que la proliferación de línea celular CaLo es estimulada por el PDGFBB, y que el Imatinib tiene un efecto inhibitorio de la proliferación en células privadas de suero (en ausencia de estímulos de proliferación). Además se demuestra que el imatinib es capaz de inhibir la viabilidad de las células CaLo arrestadas, así como de inhibir el efecto estimulador de la proliferación del ligando PDGFBB. Estos resultados sugieren fuertemente que esta vía es funcional en esta línea celular.

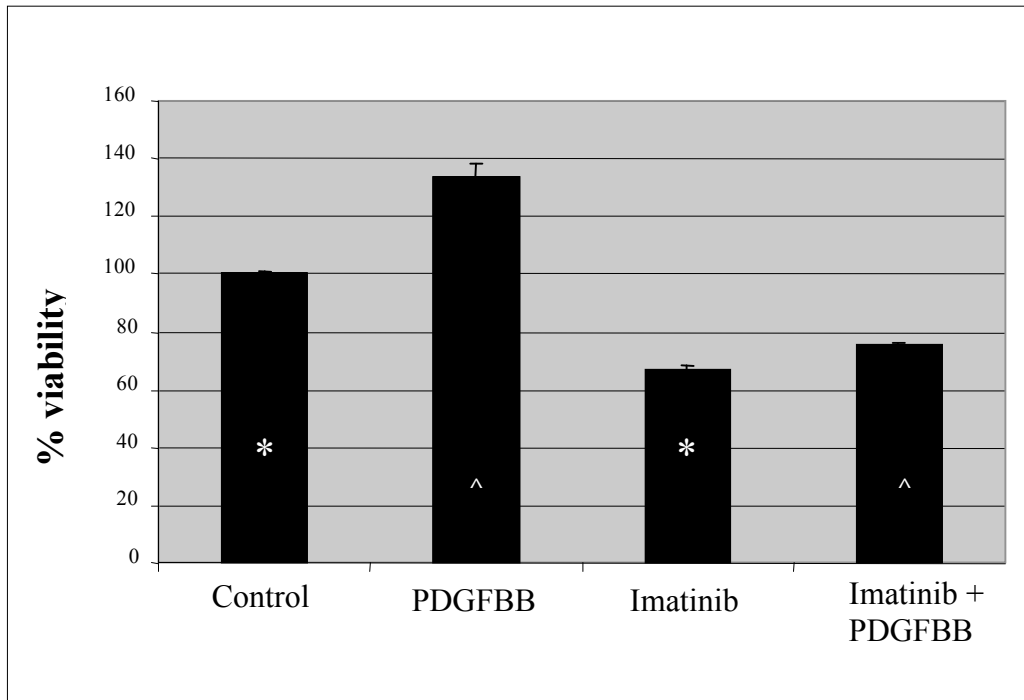


FIGURA 12. Efecto del imatinib en la proliferación celular de la línea celular CaLo. Las células Calo fueron crecidas por dos días en ausencia de suero y después tratadas con Imatinib, PDGFBB o ambos por 5 días. El PDGFBB estimuló la proliferación celular comparando con el control no-tratado. Por el contrario el imatinib inhibió la proliferación celular. En las células tratadas con ambas moléculas se observa una inhibición parcial del efecto estimulador de la proliferación del ligando BB (las comparaciones están marcadas con * o ^, todas las diferencias fueron estadísticamente significativas $p < 0.001$).

Inhibición de la activación del PDGFR α por el Imatinib.

Los ensayos de proliferación demuestran claramente, que en este modelo, las células son estimuladas a proliferar por el PDGFBB, y que este efecto puede ser bloqueado por el inhibidor de TK imatinib. Para demostrar que este efecto está mediado por la activación del receptor (PDGFR), células CaLo crecidas en ausencia de suero, fueron estimuladas transitoriamente con PDGFBB por 15 minutos en presencia o ausencia de imatinib. Posteriormente las proteínas de estas células fueron purificadas y se estudió por western blot la presencia de PDGFR α fosforilado mediante el uso de un anticuerpo específico. En la **Figura 13** se puede ver que en las células no tratadas hay un nivel basal de receptor fosforilado y que este aumenta después de la estimulación de las células con el ligando PDGFBB. El tratamiento con el imatinib causa una reducción de los niveles de fosforilación similares a los encontrados como basales.

Los resultados del western blot con un anticuerpo que reconoce específicamente al PDGFR α fosforilado, indican que después de la estimulación con PDGFBB, hay un incremento del receptor fosforilado, el cual regresa a los niveles de fosforilación observados en las células control, después del tratamiento con Imatinib. Es necesario mencionar que en las células control (sin tratamiento), aún después de inhibir su proliferación con imatinib, no cambiaron los niveles basales de fosforilación del receptor, lo cual puede sugerir que bajo las condiciones experimentales utilizadas, el método no fue lo suficientemente sensible para detectar cambios menores en la fosforilación del receptor, los cuales muy probablemente existen ya que el imatinib fue capaz de inhibir la proliferación de éstas células aún en ausencia del PDGFBB exógeno.

Aunque no se evaluó la activación de proteínas blanco de fosforilación de la vía de PDGFR, los resultados demuestran que, al igual de lo que se ha observado en otros tumores como osteosarcoma (**McGary EC, 2002**) y cáncer de ovario (**Matei D, 2006**) el bloqueo de esta vía puede tener implicaciones terapéuticas. Sin embargo, es

necesario caracterizar vías que se sabe son activadas por PDGFR, ya sea Src-PI3K-ERK, JNK1-p21 u otras, para poder optimizar el uso potencial de inhibidores de PDGFR en CaCU.

Estos últimos resultados demuestran claramente que el uso de un inhibidor del PDGFR, puede inhibir la proliferación de las células CaLo aún cuando estas no tengan el estímulo del ligando PDGF, y que igualmente que es capaz de inhibir la fosforilación del PDGFR α (por tanto de su activación). Como se ha mencionado el bloqueo de la señalización de PDGFR puede tener importantes implicaciones en la terapia del cáncer ya que no solo inhibe la proliferación de la células tumorales, también puede afectar otras características tumorales como lo es la PFI, la cual puede afectar el ingreso de la quimioterapia al tumor. Por esto consideramos que es necesario incrementar el número de muestras y analizar *in vivo* si el bloqueo del PDGFR tiene algún efecto en el tumor, ya que *in vitro* el imatinib si tiene un efecto inhibidor de la proliferación.

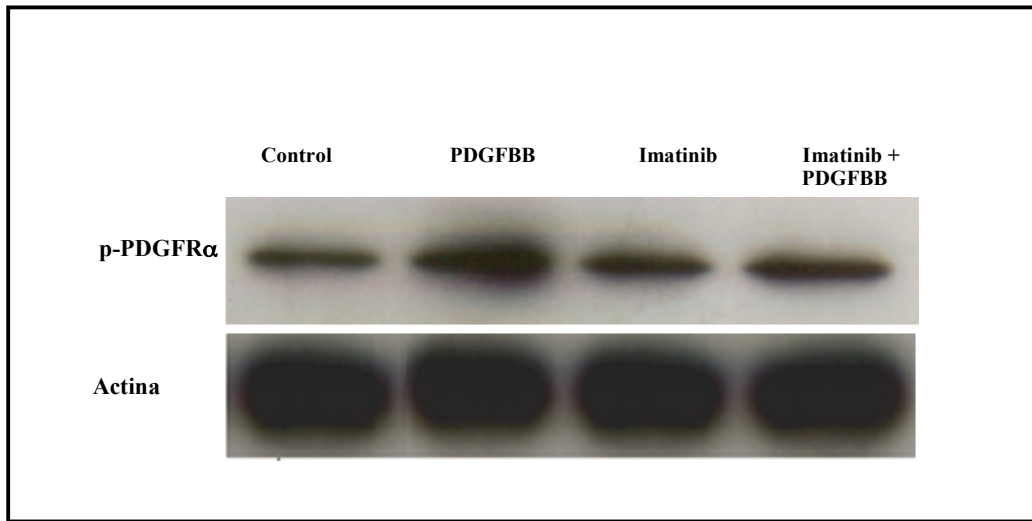


FIGURA 13. Inhibición de la activación del PDGFR α por el imatinib. Las células CaLo fueron estimuladas con PDGFBB a 10 ng/mL, por 10 min; tratadas con imatinib a 10 μ M por 2 horas; tratadas con imatinib por 2 horas y luego con PDGF BB por 15 min; o sin tratamiento como control. Se purificaron las proteínas y se analizaron por Western Blot con un anticuerpo que reconoce al PDGFR α fosforilado. Como control de carga se incubó con un anticuerpo que reconoce actina. Se observa un incremento en la fosforilación del receptor en las células tratadas con PDGFBB y una inhibición de la fosforilación por el imatinib (se observa un nivel comparable con el control).

CONCLUSIONES

Las mutaciones del gen EGFR son raras en cáncer cervicouterino ya que no se encontraron mutaciones en los exones 18, 19 y 21 en ninguna de las muestras de tumores primarios de CaCU, controles o líneas celulares derivadas de CaCU. Es necesario analizar un número mayor de muestras para determinar la existencia de mutaciones activadoras que apoyen el uso de Gefitinib o Erlotinib en pacientes con CaCU.

La co-expresión de diferentes miembros de la familia del PDGF (receptores y ligandos) es frecuente tanto en los tumores primarios de CaCU como en las líneas celulares sugiriendo una activación autócrina de la vía del PDGFR.

En los tumores primarios de CaCU las mutaciones en el gen del PDGFR α son raras, sin embargo en las líneas celulares se observaron diversos cambios exónicos e intrónicos, ninguno de ellos con importancia biológica conocida.

En una línea celular de CaCU, el sistema de PDGFR es funcional, ya que el PDGFBB recombinante fue capaz de estimular la proliferación celular y la fosforilación del receptor, y así también estos efectos fueron bloqueados por el Imatinib.

A pesar de la ausencia de mutaciones activadoras en PDGFR α , la co-expresión de los receptores y ligandos de PDGF tanto en el componente tumoral como estromal de los tumores, sugiere la existencia de un sistema de estimulación de la proliferación autócrino/parácrino que puede ser bloqueado por Imatinib. Sugiriendo un potencial uso de este fármaco en el tratamiento del CaCU.

REFERENCIAS

Abdelrahim M, Samudio I, Smith III R, Brughardt R, Safe S. **Small inhibitory RNA duplexes for Sp1 mRNA blocks basal and strogen-induced gene expression and cell cycle progression in MCF-7 breast cancer cells.** *J Biol Chem*, 2002; 277: 28815-28822.

Apte SM, Bucana CD, Killion JJ, Gershenson DM, Fidler IJ. **Expression of platelet-derived growth factor and activated receptor in clinical specimens of epithelial ovarian cancer and ovarian carcinoma cell lines.** *Gynecol Oncol*, 2004; 93: 78-86.

Arce Claudia, Segura-Pacheco Blanca, Perez-Cardenas Enrique, Taja-Chayeb Lucia, Candelaria Myrna, Dueñas-Gonzalez Alfonso. **Hydralazine target: From blood vessels to the epigenome.** *Journal of Translational Medicine*, 2006; 4:10-25.

Baguley BC, Marshall ES, Holdaway KM, Rewcastle GW, Denny WA. **Inhibition of growth of primary human tumour cell cultures by a 4-anilinoquinazoline inhibitor of the epidermal goTSh factor receptor family of tyrosine kinases.** *Eur J Cancer*, 1998; 34: 1086-1090.

Barker AJ, Gibson KH, Grundy W, Godfrey AA, Barlow JJ, Healy MP, Woodburn JR, Ashton SE, Curry BJ, Scarlett L, Henthorn L, Richards L. **Studies leading to the identification of ZD1839 (IRESSA): an orally active, selective epidermal growth factor tyrosine kinase inhibitor targeted to the treatment of cancer.** *Bioorg Med Chem Lett*, 2001; 11: 1911-1914.

Baselga J. **Why the epidermal growth factor receptor? The rational for cancer therapy.** *Oncologist*, 2002; 7: 2-8.

Baselga J. **Combining the anti-EGFR agent gefitinib with chemotherapy in non-small cell lung cancer: how do we go from INTACT to Impact?** *J Clin Oncol*, 2004; 22: 759-761.

Bazley LA, Gullick WJ. **The epidermal growth factor receptor family.** *Endocr Relat Cancer*, 2005; 12: S17-S27.

Brehmer D, Greff Z, Godl K, Blencke S, Kurtenbach A, Weber M, Muller S, Klebl B, Cotten M, Keri G, Wissing J, Daub H. **Cellular targets of gefitinib.** *Cancer Res*, 2005; 65: 379-382.

Brisson J, Morin C, Fortier M, Roy M, Bouchard C, Lecrec J, Christen A, Guimont C, Penault F, Meisels A. **Risk factors for cervical intraepithelial neoplasia: differences between low- and high-grade lesions.** *Am J Epidemiol*, 1994; 140: 700-710.

Britten CD. **Targeting ErbB receptor signalling: a pan-ErbB approach to cancer.** *Mol Cancer Ther* 2004; 1335-1342.

Bromann PA, Korkaya H, Courtneidge SA. **The interplay between Src family kinases and receptor tyrosine kinases.** *Oncogene*, 2004; 23:7957-7968.

Brooks SE, Wakeley KE. **Current trends in the management of carcinoma of the cervix, vulva, and vagina.** *Curr Opin Oncol*, 1999; 11: 383-387.

Buchdunger E, Cioffi CL, Law N, Stover D, Onho-Johnes S, Druker BJ, Lydon NB. **Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors.** *J Pharmacol Exp Ther*, 2000; 295: 139-145.

Campos S, Hamid O, Seiden MV, Oza A, Plante M, Potkul RK, Lenehan PF, Kaldjian EP, Varterasian ML, Jordan C, Charbonneau C, Hirte H. **Multicenter, randomized phase II trial of oral CI-1033 for previously treated advanced ovarian cancer.** *J Clin Oncol*, 2005; 23: 5597-5604.

Cappuzzo F, Finocchiaro G, Metro G, Bartolini S, Magrini E, Cancellieri A, Trisolini R, Castaldini L, Tallini G, Crino L. **Clinical experience with gefitinib: an update.** *Crit Rev Oncol Hematol* 2006;58:31-45.

Carpenter G, King LR, Cohen S. **Epidermal growth factors stimulates phosphorylation in membrane preparations in vitro.** *Nature*, 1978; 276:409-410.

Carvalho I, Milanezi F, martins A, Reis RM, Schmitt F. **Overexpression of pletelet-derived growth factor receptor α in breast cancer is associated with tumor progression.** *Breast Ca Res*, 2005; 75: R788-R795.

Caudell JJ, Deavers MT, Slomovitz BM, Lu KH, Broaddus RR, Gershenson DM, Ramondetta LM. **Imatinib mesylate (gleevec)--targeted kinases are expressed in uterine sarcomas.** *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2005; 13:167-170.

Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, Robert NJ, Scholl S, Fehrebnbacher L, Wolter JM, Paton V, Shak S, Liberman G, Slalom DJ. **Multinational study of the efficacy and safety of the humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease.** *J Clin Oncol*, 1999; 17: 2639-2648.

Cohen MH, Williams G, Johnson JR, Duan J, Gobburu J, Rahman A, Benson K, Leighton J, Kim SK, Wood R, Rothmann M, Chen G, U KM, Staten AM, Pazdur R. **Approval summary for imatinib mesylate capsules in the treatment of chronic myelogenous leukemia.** *Clin Cancer Res*, 2002; 8:935-942.

Cohen MH, Williams GA, Sridhara R, Chen G, McGuinn WD, Morse D, Abraham S, Rahman A, Liang C, Lostritto, Bird A, Pazdur R. **United States Food and Drug Administration drug approval summary: gefitinib (ZD1839; Iressa) tablets.** *Clin Cancer Res*, 2004; 10:1212-1218.

Corless CL, Schroeder A, Griffith D, Town A, McGreevey L, Harrell P, Shiraga S, Bainbridge T, Morich J, Heinrich MC. **PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors: frequency, spectrum and in vitro sensitivity to imatinib.** *J Clin Oncol*, 2005; 23: 5357-64.

Chan SK, Gullick WJ, and Hill ME. **Mutations of the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer – Search and destroy.** *Eur J Cancer*, 2006; 42: 17-23.

Chávez-Blanco A, Blanca A Segura-Pacheco, Enrique Perez-Cardenas, Lucia Taja-Chayeb, Lucely Cetina, Myrna Candelaria, David Cantu, Carlos Perez-Plasencia, Gustavo Cabrera, Catalina Trejo-Becerril, Enrique Angeles, Alfonso Duenas-Gonzalez. **Histone acetylation and histone deacetylase activity of magnesium valproate in tumor and peripheral blood of patients with cervical cancer. A phase I study.** *Molecular Cancer*, 2005; 4:22-30.

Chavez-Blanco A, Carlos Perez-Plasencia, Enrique Perez-Cardenas, Claudia Carrasco Legleu, Edgar Rangel-Lopez, Blanca A Segura-Pacheco, Lucia Taja-Chayeb, Catalina Trejo-Becerril, Aurora Gonzalez Fierro, Myrna Candelaria, Gustavo Cabrera, Alfonso Duenas-Gonzalez. **Antineoplastic effects of the DNA methylation inhibitor hydralazine and the histone deacetylase inhibitor valproic acid in cancer cell lines.** *Cancer Cell International*, 2006; 6: 2-10.

Chinnaiyan P, Huang S, Vallabhaneni G, Armstrong E, Varambally S, Tomlins SA, Chinnaiyan AM, Harari PM. **Mechanisms of enhanced radiation response following**

epidermal growth factor receptor signaling inhibition by erlotinib (Tarceva). *Cancer Res*, 2005; 65: 3328-3335.

Chu I, Blackwell K, Chen S, Slingerland J. **The dual ErbB1/ErbB2 inhibitor, lapatinib (GW572016), cooperates with tamoxifen to inhibit both cell proliferation and estrogen-dependent, gene expression in antiestrogen-resistant breast cancer.** *Cancer Res*, 2005; 65: 18-25.

Dagher R, Cohen M, Williams G, Rothmann M, Gobburu J, Robbie G, Rahman A, Chen G, Staten A, Griebel D, Pazdur R. **Approval summary: imatinib mesylate in the treatment of metastatic and/or unresectable malignant gastrointestinal stromal tumors.** *Clin Cancer Res*, 2002; 8:3034-3038.

DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA. **Cancer Principles & Practice of Oncology.** 5th Edition, Lippincott-Raven. 1997.

Dibb NJ, Dilworth SM, Mol CD. **Switching on kinases oncogenic activation of BRAF and the PDGFR family.** *Nat Rev Cancer*, 2004; 4: 718-727.

Dong J, Grunstein J, Tejada M, Peale F, Frantz G, Liang WC, Bai W, Yu L, Kowalski J, Liang X, Fuh G, Gerber HP, Ferrara N. **VEGF-null cells require PDGFR alpha signaling-mediated stromal fibroblast recruitment for tumorigenesis.** *EMBO J*, 2004; 23: 2800-2810.

Downward J, Yarden Y, Mayes E, Scrace G, Totty N, Stockwell P, Ulrich A, Schlessinger J, Waterfield MD. **Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences.** *Nature*, 1984; 307: 521-527.

Drummond BD, Vaillancourt RR, Kazluskas A, DiMaio D. **Ligand-independent activation of the platelet-derived growth factor b receptor: requirements for**

bovine papillomavirus E5-induced mitogenic signaling. *Mol Cell Biol*, 1995; 15: 2570-2581.

Dueñas GA, Cetina L, Mariscal I, De la Garza J. **Modern management of locally advanced cervical carcinoma.** *Cancer Treat Rev* 2003; 29:389-399.

Erlichman C, Hidalgo M, Boni JP, Martins P, Quinn SE, Zacharchuk C, Amorusi P, Adjei AA, Rowinsky EK. **Phase I study of EKB-569, an irreversible inhibitor of the epidermal growth factor receptor, in patients with advanced solid tumors.** *J Clin Oncol*, 2006; 24: 2252-2260.

Fletcher JA. **Role of KIT and platelet-derived growth factor receptors as oncoproteins.** *Semin Oncol*, 2004; 31(2 Suppl 6): 4-11.

Forsberg K, Valyi-Nagy I, Heldin CH, Herlyn M, Westermark B. **Platelet-derived growth factor (PDGF) in oncogenesis: development of a vascular connective tissue stroma in xenotransplanted human melanoma producing PDGF-BB.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:393-397.

Frederick L, Wang XY, Eley G, James CD. **Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas.** *Cancer Res* 2000; 60: 1383-1387.

Fry DW, Nelson JM, Slintak V, Keller PR, Rewcastle GW, Denny WA, Zhou H, Bridges AJ. **Biochemical and antiproliferative properties of 4-[ar(alk)ylamino]pyridopyrimidines, a new chemical class of potent and specific epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor.** *Biochem Pharmacol*, 1997; 54: 877-887.

Garret TP, McKern NM, Elleman TC, Adams TE, Lovrecz GO, Zhu HJ, Walker F, Frenkel MJ, Hoyne PA, Jorissen RN, Nice EC, Burgess AW, Ward CW. **Crystal**

structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha. *Cell*, 2002; 110: 763-773.

Giaccone G, Herbst RS, manegold C, Scagliotti G, Rosell R, Miller V, natale RB, Schiller JH, von Pawel J, Pluzanska A, Gatzemeier U, Grous J, Ochs JS, Averbuch SD, Wolf MK, Rennie P, Fandi A, Johnson DH. **Gefitinib in combination with Gemcitabine and cisplatin in advanced non-small cell lung cancer: A phase III trial-INTACT 1.** *J Clin Oncol*, 2004; 22: 777-784.

Gonzalez G, Crombet T, Catala M, Mirabal V, Hernandez JC, Gonzalez Y, Marinello P, Guillen G, Lage A. **A novel cancer vaccine composed of human-recombinant epidermal growth linked to a carrier protein: report of a pilot clinical trial.** *Ann Oncol* 1998; 9: 431-435.

Hambek M, Solbach C, Schnuerch HG, Roller M, Stegmueller M, Sterner-Kock A, Kiefer J, Knecht R. **Tumor necrosis factor alpha sensitizes low epidermal growth factor receptor (EGFR)-expressing carcinomas for anti-EGFR therapy.** *Cancer Res*, 2001; 61: 1045-1049.

Harari PM. **Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology.** *Endocr Relat Cancer*, 2004; 11:689-708.

Heinrich MC, Corless CL, Duensing A, McGreevey L, Chen CJ, Joseph N, Singer S, Griffitj DJ, Haley A, Town A, Demetri GD, Fletcher CD, Fletcher JA. **PDGFRA activating mutations in gastrointestinal tumors.** *Science*, 2003; 299: 708-710.

Heldin CH, Westermark B. **Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor.** *Physiol Rev*, 1999; 79: 1283-1316.

Heldin CH, Eriksson U, Östman A. **New members of the platelet-derived growth factor family of mitogens.** *Arch Biochem Biophys*, 2002; 398: 284-290.

Herbst RS, Kies MS. **ZD1839 (Iressa™) in non-small cell lung cancer.** *The Oncologist*, 2002; 7: 9-15.

Herbst RS, Giaccone G, Schiller JH, Natale RB, Miller V, Manegold C, Scagliotti G, Rosell R, Oliff I, Reeves JA, Wolf MK, Krebs AD, Averbuch SD, Ochs JS, Grous J, Fandi A, Johnson DH. **Carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer: A phase III trial-INTACT 2.** *J Clin Oncol*, 2004; 22: 785-794.

Hermiston TW, Kirn DH. **Genetically based therapeutics for cancer: similarities and contrasts with traditional drug discovery and development.** *Mol Ther*, 2005; 11: 496-507.

Heselmeyer K, Macville M, Schröck E, Blegen H, Hellström AC, Shah K, Auer G, Ried T. **Advanced-stage cervical carcinomas are defined by a recurrent pattern of chromosomal aberrations revealing high genetic instability and a consistent gain of chromosome arm 3q.** *Genes Chrom Cancer*, 1997; 19: 233-240.

Heuchel R, Berg A, Tallquist M, Ahlen K, Reed RK, Rubin K, Claesson-Welsh L, Heldin CH, Soriano P. **Platelet-derived growth factor beta receptor regulates interstitial fluid homeostasis through phosphatidylinositol-3' kinase signaling.** *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999; 96:11410-11415.

Hirota S, Ohashi A, Nishida T, Isozaki K, Kinoshita K, Shinomura Y, Kitamura Y. **Gain-of-function mutations of platelet-derived growth factor receptor alpha gene in gastrointestinal stromal tumors.** *Gastroenterology*, 2003; 125: 660-667.

Hochhaus A, Kreil S, Corbin AS, LaRosée P, Müller MC, Lahaye T, Hanfstein B, Schoch C, Cross NCP, Berger U, Gschaidmeier H, Druker BJ, Hehlmann R. **Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy.** *Leukemia* 2002; 16: 2190-2196.

Hoekstra R, Dumez H, Eskens FA, van der Gaast A, Planting AS, de Heus G, Sizer KC, Ravera C, Vaidyanathan S, Bucana C, Fidler IJ, van Oosterom AT, Verweij J. **Phase I and pharmacologic study of PKI166, an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with advanced solid malignancies.** *Clin Cancer Res*, 2005; 11(19 Pt 1): 6908-6915.

Hu G, Liu W, Mendelsohn J, Ellis LM, Radinsky R, Andreeff M, Deisseroth AB. **Expression of epidermal growth factor receptor and human papillomavirus E6/E7 proteins in cervical carcinoma cells.** *J Natl Cancer Inst*, 1997; 89: 1271-1276.

Huang S, Armstrong EA, Benavente S, Chinnaiyan P, Harari PM. **Dual-agent molecular targeting of the epidermal growth factor receptor (EGFR): combining anti-EGFR antibody with tyrosine kinase inhibitor.** *Cancer Res*, 2004; 64: 5355-5362.

Hubbard SR, Till JH. **Protein tyrosine kinase structure and function.** *Ann Rev Biochem*, 2000; 69: 373-398.

Hunt KK, Vorburger SA. **Hurdles and Hopes for Cancer treatment.** *Science*, 2002; 297: 415-416.

Jänne PA, Johnson BE. **Effect of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase domain mutations on the outcome of patients with non-small cell lung cancer treated with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors.** *Clin Cancer Res*. 2006; 12:4416s-20s.

Johnson BE, Fischer T, Fischer B, Dunlop D, Rischin D, Silberman S, Kowalski MO, Sayles D, Dimitrijevic S, Fletcher C, Hornick J, Salgia R, Le Chevalier T. **Phase II study of imatinib in patients with small cell lung cancer.** *Clin Cancer Res*, 2003; 9: 5880-5887.

Johnson JR, Bross P, Cohen M, Rothmann M, Chen G, Zajicek A, Gobburu J, Rahman A, Staten A, Pazdur R. **Approval summary: imatinib mesylate capsules for treatment of adult patients with newly diagnosed philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in chronic phase.** *Clin Cancer Res*, 2003; 9:1972-1979.

Johnson BE, Janne PA. **Epidermal growth factor receptor mutations in patients with non-small cell lung cancer.** *Cancer Res*, 2005; 65: 7525-9.

Johnson JR, Cohen M, Sridhara R, Chen YF, Williams GM, Duan J, Gobburu J, Booth B, Benson K, Leighton J, Hsieh LS, Chidambaram N, Zimmerman P, Pazdur R. **Approval summary for erlotinib for treatment of patients with locally advanced or metastatic non-small cell lung cancer after failure of at least one prior chemotherapy regimen.** *Clin Cancer Res*, 2005; 11: 6414-6421.

Johnsohn DH. **Targeted therapies in combination with combination with chemotherapy in non-small cell lung cancer.** *Clin Cancer Res*, 2006; 12: 4451s-4457.

Johnson BE, Janne PA. **Rational for a phase II trial of pertuzumab, a HER-2 dimerization inhibitor, in patients with non-small cell lung cancer.** *Clin Cancer Res* 2006; 12:4436s-4440s.

Jones RK, Pope IM, Kinsella AR, Watson AJM, Christmas SE. **Combined suicide and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene therapy induces complete tumor regression and generates antitumor immunity.** *Cancer Gene Ther*, 2000; 7: 1519-1528.

Jones HE, Gee JMW, Taylor KM, Barrow D, Williams HD, Rubini M, Nicholson RI. **Development of strategies for the use of anti-growth factor treatments.** *Endocr Relat Cancer*, 2005; 12: S173-S182.

Keating PJ, Cromme FV, Duggan-Keen M, Snijders PJ, Walboomers JM, Hunter RD, Dyer PA, Stern PL. **Frequency of down-regulation of individual HLA-A and -B alleles in cervical carcinoma in relation to TAP-1 expression.** *Br J Cancer*, 1995; 72:405-411.

Kersemaekers AMF, Fleuren GJ, Kenter GG, Van de Broek LC, Uljee SM, Hermans J, Van de Vijver MJ. **Oncogene alterations in carcinomas of the uterine cervix: overexpression of the epidermal growth factor receptor is associated with poor prognosis.** *Clin Cancer Res*, 1999; 5: 577-586.

Kim JW, Kim YT, Kim DK, Song CH, Lee JW. **Expression of the epidermal growth factor receptor in carcinoma of the cervix.** *Gynecol Oncol*, 1996; 60:283-287.

Kim YT, Park SW, Kim JW. **Correlation between expression of EGFR and the prognosis of patients with cervical carcinoma.** *Gyneco Oncol*, 2002; 87: 84-89.

Kim GE, Kim YB, Cho NH, Chung HC, Pyo HR, Lee JD, Park TK, Koom WS, Chun M, Suh CO. **Synchronous coexpression of epidermal growth factor receptor and cyclooxygenase-2 in carcinomas of the uterine cervix: a potential predictor of poor survival.** *Clin Cancer Res*, 2004; 10:1366-1374.

Kim T. **Technology evaluation: Matuzumab, Merck KGaA.** *Curr Opin Mol Ther* 2004; 6: 96-103.

Kim SW, Yang JS. **Human papillomavirus type 16 E5 protein as a therapeutic target.** *Yonsei Med J*, 2006; 47: 1-14.

Kosaka T, Yatabe Y, Heñido H, Kuwano H, Takahashi T and Mitsudomi T. **Mutations of the Epidermal Growth factor receptor gene in lung cancer: biological and clinical implications.** *Cancer Res*, 2004; 64: 8919-8923.

Krystal GW, Honsawek S, Litz J, Buchdunger E. **The selective tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits small cell lung cancer growth.** *Clin Cancer Res*, 2000; 6: 3319-3326.

Kuan CT, Wikstrand CJ, Bigner DD. **EGF mutant receptor vIII as a molecular target in cancer therapy.** *Endocr Relat Cancer*, 2001; 8: 83-96.

Lahousen M, Haas J, Pickel H, Hackl A, Kurz C, Ogris H, Stummvoll W, Winter R. **Chemotherapy versus radiotherapy versus observation for high-risk cervical carcinoma after radical hysterectomy: a randomized, prospective, multicenter trial.** *Gynecol Oncol*, 1999; 73: 196-201.

Lakhai WSS, Beijnen JH, Schellens JHM. **Current knowledge and future directions of the selective epidermal growth factor receptor inhibitors Erlotinib (Tarceva) and Gefitinib (Iressa).** *Oncologist* 2005; 10:579-589.

Lasota J, Dansonka-Mieszkowska A, Sobin LH, Miettinen M. **A great majority of GISTs with PDGFRA mutations represent gastric tumors of low or no malignant potential.** *Lab Invest*, 2004; 84:874-883.

Lassus H, Sihto H, Leminen A, Nordling S, Joensuu H, Nupponen NN, Butzow R. **Genetic alterations and protein expression of KIT and PDGFRA in serous ovarian carcinoma.** *Br J Cancer*, 2004; 91: 2048-2055.

Lazo PA. **The molecular genetics of cervical carcinoma.** *Br J Cancer*, 1999; 80: 2008-2018.

Lilenbaum RC. **The evolving role of cetuximab in Non-small cell lung cancer.** *Clin Cancer Res* 2006; 12: 4432s-4435s.

Loizos N, Xu Y, Huber J, Liu M, Lu D, Finnerty B, Rolsen R, Malikzay A, Persaud A, Corcoran E, Deevi DS, Balderes P, Bassi R, Jimenez X, Joynes C, Mangalanpalli V, Steiner P, Tonra JR, Wu Y, Pereira DS, Zhu Z, Ludwig DL, Hicklin DJ, Bohlen P, Witte L, Kussie P. **Targeting the platelet-derived growth factor receptor α with a neutralizing antibody inhibits the growth of tumor xenografts: Implications as a potential therapeutic target.** *Mol Cancer Ther*, 2005; 4: 369-379.

Malik SN, Siu LL, Rowinsky EK, deGraffenried L, Hammond LA, Rizzo J, Bacus S, Brattain MG, Kreisberg JJ, Hidalgo M. **Pharmacodynamic evaluation of the epidermal growth factor receptor inhibitor OSI-774 in human epidermis of cancer patients.** *Clin Cancer Res*, 2003; 9: 2478-2486.

Manley PW, Cowan-Jacob SW, Buchdunger E, Favor D, Fendrich G, Furet P, Meyer T and Zimmermann J. **Imatinib: a selective tyrosine kinase inhibitor.** *Eur J Cancer*, 2002; 38: S19-S27.

Marchetti A, Martella C, Felicioni L, Barassi F, Salvatore S, Chella A, Campese PP, Iarussi T, Mucilli F, Mezzetti A, Cuccurullo F, Sacco R, Buttitta F. **EGFR mutations in non-small-cell lung cancer: analysis of a large series of cases and development of a rapid and sensitive method for diagnostic screening with potential implications on pharmacologic treatment.** *J Clin Oncol*, 2005; 23: 857-65.

Marzano R, Corrado G, Merola R, Sbiroli C, Guadagni F, Vizza E, Del Nonno F, Carosi M, Galati MM, Sperduti I, Cianciulli AM. **Analysis of chromosomes 3, 7, X and the EGFR gene in urine cervical cancer progression.** *Eur J Cancer*, 2004; 40: 1624-1629.

Matei D, Chang DD, Jeng MH. **Imatinib mesylate (gleevec) inhibits ovarian cancer cell growth through a mechanism dependent on platelet-derived growth factor receptor α and akt inactivation.** *Clin Cancer Res*, 2004; 10: 681-690.

Matei D, Emerson RE, Lai YC, Baldrige LA, Rao J, Yiannoutsos C, Donner DB. **Autocrine activation of PDGFR α promotes the progression of ovarian cancer.** *Oncogene* 2006; 25: 2060-2069.

Mathur RS, Mathur SP. **Vascular endothelial growth factor (VEGF) up-regulates epidermal growth factor receptor (EGF-R) in cervical cancer in vitro: this action is mediated through HPV-E6 in HPV-positive cancers.** *Gynecol Oncol*, 2005; 97: 206-213.

Mayer TJ, Fraenhoffer EE, Meyers AC. **Expression of epidermal growth factor and platelet-derived growth factor receptors during cervical carcinogenesis.** *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2000; 36:667-676.

McGary EC, Weber K, Mills L, Doucet M, Lewis V, Lev DC, Fidler IJ, Bar-Eli M. **Inhibition of platelet-derived growth factor-mediated proliferation of osteosarcoma cells by the novel tyrosine kinase inhibitor STI571.** *Clin Cancer Res*, 2002; 8: 3584-3591.

Meldelsohn J, Baselga J. **Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer.** *J Clin Oncol*, 2003; 21: 2787-2799.

Milosevic M, Fyles A, Hill R. **Interstitial fluid pressure in cervical cancer: guide to targeted therapy.** *Am J Clin Oncol*, 2001; 24:516-521.

Milosevic M, Fyles A, Hedley D, Pintilie M, Levin W, Manchul L, and Hill R. **Interstitial fluid pressure predicts survival in patients with cervix cancer independent of clinical prognostic factors and tumor oxygen measurements.** *Cancer Res*, 2001b; 61:6400-6405

Mishima K, Johns TG, Luwor RB, Scott AM, Stockert E, Jungbluth AA, Ji XD, Suvarna P, Volland JR, Old LJ, Huang HJ, Cavenee WK. **Growth suppression of**

intracranial xenografted glioblastomas overexpressing mutant epidermal growth factor receptors by systemic administration of monoclonal antibody (mAb) 806, a novel monoclonal antibody directed to the receptor. *Cancer Res*, 2001; 61:5349-5354.

Mitsudomi T, Kosaka T, Yatabe Y. Biological and clinical implications of EGFR mutations in lung cancer. *Int J Clin Oncol*, 2006; 11:190-198.

Modi S, Seidman AD, Dickler M, Moasser M, D'Andrea G, Moynahan ME, Menell J, Panageas KS, Tan LK, Norton L, Hudis CA. **A phase II trial of imatinib mesylate monotherapy in patients with metastatic breast cancer.** *Breast Cancer Res Treat*, 2005; 90: 157-163.

Mol CD, Dougan DR, Schneider TR, Skene RJ, Kraus ML, Scheibe DN, Snell GP, Zou H, Sang BC, Wilson KP. **Structural basis for the autoinhibition and STI-571 inhibition of c-Kit tyrosine kinase.** *J Biol Chem*, 2004; 279: 31655-31663.

Mushin M, Graham J, Kirkpatrick P. **Gefitinib.** *Nat Rev Drug Discov*, 2003; 2: 515-516.

Nappi VM, Petti LM. **Multiple transmembrane amino acid requirements suggest a highly specific interaction between the bovine papillomavirus E5 oncoprotein and the platelet-derived growth factor beta receptor.** *J Virol*, 2002; 76: 7976-7986.

Niho H, Kubota K, Goto K, Yoh K, Ohmatsu H, Kakinuma R, Saijo N, Nishiwaki Y. **First-line single agent treatment with gefitinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer: a phase II study.** *J Clin Oncol*, 2006; 24:64-69.

Nilson LA, DiMaio D. **Platelet-derived growth factor receptor can mediate tumorigenic transformation by the bovine papillomavirus E5 protein.** *Mol Cell Biol*, 1993; 13:4137-4145.

Niwa H, Wentzel AL, Li M, Gooding WE, Lui VW, Grandis JR. **Antitumor effects of epidermal growth factor receptor antisense oligonucleotides in combination with docetaxel in squamous cell carcinoma of the head and neck.** *Clin Cancer Res*, 2003; 9: 5028-5035.

Noiseux N, Boucher CH, Cartier R, Sirosis MG. **Bolus endovascular PDGFR- β antisense treatment suppressed intimal hyperplasia in a rat carotid injury model.** *Circulation*, 2000; 102: 1330-1336.

Normanno N, De Luca A, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello MR, Carotenuto A, De Feo G, Caponigro F, Salomon DS. **Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) signaling in cancer.** *Gene*, 2006; 366: 2-16.

Ocadiz R, Saucedo R, Cruz M, Graef AM and Gariglio P. **High correlation between molecular alterations of the *c-myc* oncogene and carcinoma of the cervix.** *Cancer Res*, 1987; 47: 4173-4177.

Ozanne B, Richards CS, Hendler F, Burns D, Gusterson B. **Overexpression of the EGF receptor is a hallmark of squamous cell carcinomas.** *J Pathol*, 1986; 149: 9-14.

Paez JG, Jänne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, Herman P, Kaye FJ, Lindeman N, Boggon TJ, Naoki K, Sasaki H, Fujii Y, Eck MJ, Sellers WR, Johnson BE, Meyerson M. **EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy.** *Science*, 2004; 304:1497-1500.

Pao W, Miller VA, Politi KA, Riely GJ, Somwar R, Zakowski MF, Kris Mg and Varmus H. **Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain.** *PLOS Medicine*, 2005; 2: 225-235.

Parazzini F, LaVecchia C, Negri F, Fedele L, Franceschi S, Gallota L. **Risk factors for cervical intraepithelial neoplasia.** *Cancer* 1992; 69:2276-2282.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. **Estimating the world cancer burden: Globocan 2000.** *Int J Cancer*, 2001; 94: 153-156.

Pastorino U, Infante M, Maioli M, Chiesa G, Buyse M, Firket p, Rosmentz N, Clerici M, Soresi E, Valente M. **Adjuvant treatment of stage I lung cancer with high-dose vitamin A.** *J Clin Oncol*, 1993; 11: 1216-1222.

Petti L, DiMaio D. **Stable association between the bovine papillomavirus E5 transforming protein and activated platelet-derived growth factor receptor in transformed mouse cells.** *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992; 89:6736–6740.

Pfeiffer D, Stellwag B, Pfeiffer A, Borlinghaus P, Meier W, Scheidel P. **Clinical implications of the epidermal growth factor receptor in the squamous cell carcinoma of the uterine cervix.** *Gynecol Oncol*, 1989; 33:146-150.

Pietras K, Ostman A, Sjoquist M, Buchdunger E, Reed RK, Heldin CH, Rubin K. **Inhibition of platelet-derived growth factor receptors reduces interstitial hypertension and increases transcapillary transport in tumor.** *Cancer Res*, 2001; 61: 2929-2934

Pupa SM, Menard S, Morelli D, Pozzi B, De Palo G, Colnaghi MI. **The extracellular domain of the c-erbB-2 oncoprotein is released from tumor cells by proteolytic cleavage.** *Oncogene*, 1993; 8: 2917-2923.

Ramaswamy B, Elias AD, Kelbick NT, Dodley A, Morrow M, Hauger M, Allen J, Rhoades C, Kendra K, Chen HX, Eckghardt SG, Shapiro CL. **Phase II trial of bevacizumab in combination with weekly docetaxel in metastatic breast cancer patients.** *Clin Cancer Res*, 2006; 12: 3124-3129.

Reigstad LJ, Varhaug JE, Lillehaug JR. **Structural and functional specificities of PDGF-C and PDGF-D, the novel member of the platelet-derived growth factors family.** *FEBS J*, 2005; 272: 5723-5741.

Renard I, Mezzanzanica D, Canevari S, Ferrini S, Boniver J, Delvenne P, Jacobs N. **Anti-CD3/anti-epidermal growth factor receptor-bispecific antibody retargeting of lymphocytes against human neoplastic keratinocytes in an autologous organotypic culture model.** *Am J Pathol*, 2002; 160: 113-122.

Rewcastle GW, Murray DK, Elliott WL, Fry DW, Howard CT, Nelson JM, Roberts BJ, Vincent PW, Showalter HD, Winters RT, Denny WA. **Tyrosine kinase inhibitors. Structure-activity relationships for methylamino-substituted derivatives of 4-[(3-bromophenyl) amino]-6-(methylamino)-pyrido[3,4-d] pyrimidine (PD 158780), a potent and specific inhibitor of the tyrosine kinase activity of receptors for the EGF family of growth factors.** *J Med Chem*, 1998; 41: 742-751.

Riely GJ, Pao W, Pham D, Li AR, Rivzi N, Venkatraman ES, Zakowski MF, Kris MG, Ladanyi M, Miller VA. **Clinical course of patients pf non-small cell lung cancer and epidermal growth factor receptor exon 19 and exon 21 mutations treated with gefitinib or erlotinib.** *Clin Cancer Res* 2006; 12: 839-844.

Roberts WG, Whalen PM, Soderstrom E, Moraski G, Lyssikatos JP, Wang HF, Cooper B, Baker DA, Savage D, Dalvier D, Atherton JA, Ralston S, Szewc R, Kath JC, Lin J, Soderstrom C, Tkalcevic G, Cohen BD, Pollack V, Barth W, Hungerford W, Ung E. **Antiangiogenic and antitumor activity of a selective PDGFR tyrosine kinase inhibitor, CP-673,451.** *Cancer Res*, 2005; 65: 957-966.

Roh HD, Boucher Y, Kalnicki S, Buchsbaum R, Bloomer WD, Jain RK. **Interstitial hypertension in carcinoma of uterine cervix in patients: possible correlation with tumor oxygenation and radiation response.** *Cancer Res*, 1991; 51: 6695-6698.

Rowinsky EK, Schwartz GH, Gollob JA, Thompson JA, Vogelzang NJ, Figlin R, Bukowski R, Haas N, Lockbaum P, Li YP, Arends R, Foon KA, Schwab G, Dutcher J. **Safety, pharmacokinetics, and activity of ABX-EGF, a fully human anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in patients with metastatic renal cell cancer.** *J Clin Oncol*, 2004; 22: 3003-3015.

Rusch V, Klimstra D, Venkatraman E, Oliver J, Martini N, Gralla R, Kris M, Dmitrovsky E. **Overexpression of the epidermal growth factor receptor and its ligand transforming growth factor alpha is frequent in resectable non-small cell lung cancer but does not predict tumor progression.** *Clin Cancer Res* 1997; 3:515-522.

Sacks HC, Najajreh Y, Tchaikovski V, Gao G, Elazer V, Dahan R, Gati I, Kanaan M, Waltenberger J, Golomb G. **Novel PDGFR β antisense encapsulated in polymeric nanospheres for the treatment of restenosis.** *Gene Ther* 2002; 9: 1607-1616.

Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normando N. **Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies.** *Crit Rev Oncol Hematol*, 1995; 19:183-232.

Santopietro R, Shabalova I, Petrovichev N, Kozachenko V, Zakharova T, Pajanidi J, Podistov J, Chemeris G, Sozaeva L, Lipova E, Tsidaeva I, Ivanchenko O, Pshepurko A, Zakharenko S, Nerovjna R, Kljukina L, Erokhina O, Branovskaja M, Nikitina M, Grunberga V, Grunberg A, Juschenko A, Cintorino M, Tosi P, Syrjanen K, Syrjanen S. **Cell cycle regulators p105, p107, Rb2/p130, E2F4, p21CIP1/WAF1, cyclin A in predicting cervical intraepithelial neoplasia, high-risk human papillomavirus infections and their outcome in women screened in three new independent states of the former Soviet Union.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2006; 15:1250-1256.

Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN, Hoover RN, Glass AG, Cadell DM, Rush BB, Scott DR, Sherman ME, Kurman RJ and Wacholder S. **Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia.** *JNCI*, 1993; 85: 958-964.

Schindler T, Bornmann W, Pellicena P, Miller TS, Clarkson B, Kuriyan J. **Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase.** *Science* 2000; 289: 1938-1942.

Siegel PM, Muller WJ. **Mutations affecting conserved cystein residues within the extracellular domain of Neu promote receptor dimerization and activation.** *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996; 93:8878-8883.

Slomovitz BM, Broaddus RR, Schamandt R, Wu W, Oh JC, Ramondetta LM, Bruke TW, Gershenson DM, Lu KH. **Expression on imatinib mesylate-targeted kinases in endometrial carcinoma.** *Gynecol Oncol*, 2004; 95: 32-36.

Snijders PJ, Steenbergen RD, Heideman DA, Meijer CJ. **HPV-mediated cervical carcinogenesis: concepts and clinical implications.** *J Pathol* 2006; 208: 152-64.

Solbach C, Roller M, Nicoletti M, Budischewski K, Knecht R, Kaufmann M. **Cancer of the uterine cervix is susceptible to anti-EGF-R antibody EMD 55,900 therapy.** *Anticancer Res*, 2005; 25: 4261-7.

Taja CL, Candelaria M, Brom R, Trejo BC, Meza F, Duenas GA. **Response to gefitinib in bronchioalveolar carcinoma in the absence of EGFR mutation.** *Lung Cancer*, 2005; 50:259-263.

Tarn C, Skorobogatko YV, Taguchi T, Eisenberg B, von Mehren M, Godwin AK. **Therapeutic effect of imatinib in gastrointestinal stromal tumors: AKT signalling dependent and independent mechanisms.** *Cancer Res*, 2006; 66: 5477-5486.

Tchernitchko D, Goossens M, Wajcman H. **In silico prediction of the deleterious effect of a mutation: proceed with caution in clinical genetics.** *Clin Chem* 2004; 50:1974-1978

Tokumo M, Toyooka S, Ichihara S, Ohashi K, Tsukuda K, Ichimura K, Tabata M, Kiura K, Aoe M, Sano Y, Date H, Shimizu N. **Double mutation and gene copy number of EGFR in gefitinib refractory non-small cell lung cancer.** *Lung Cancer*, 2006; 53: 117-121.

Trejo Becerril C. Tesis. “**Determinar alteraciones en la expresión y en el gen del receptor para el factor de crecimiento epidérmico en lesiones neoplásicas del cervix uterino**”. U.N.A.M. Facultad de Medicina. 1999.

Tyagi P. **Recent results and ongoing trials with panitumumab (ABX-EGF), a fully human anti-epidermal growth factor receptor antibody, in metastatic colorectal cancer.** *Clin Colorectal Cancer*, 2005; 5:21-23.

Vassbotn FS, Havnen OK, Heldin CH, Holmsen H. **Negative feedback regulation of human platelets via autocrine activation of the platelet-derived growth factor α -receptor.** *J Biol Chem*, 1994; 269: 13874-13879.

Wakelin AE. **Inhibitors of Growth factor signalling.** *Endocr Relat Cancer*, 2005; 12: S183-S187.

Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N. **Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide.** *J Pathol* 1999; 189:12-19.

Ward, WH, Cook PN, Slater AM, Davies DH, Holdgate GA, Green LR. **Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. Investigation of catalytic mechanism,**

structure-based searching and discovery of a potent inhibitor. *Biochem Pharmacol*, 1994; 48: 659-666.

Welsh LC, Eriksson A, Westermark B, Heldin CH. **cDNA cloning and expression of the A-type platelet-derived growth factor (PDGF) receptor establishes structural similarity to the B-type PDGF receptor.** *Proc Natl Acad Sci, USA*, 1989; 86: 4917-4921.

Wosikowski K, Schuurhuis D, Kops GJ, Saceda M, Bates SE. **Altered gene expression in drug-resistance human breast cancer cells.** *Clin Cancer Res*, 1997; 3: 2405-2414.

Zaino RJ, Ward S, Delgado G, Bundy B, Gore H, Fetter G, Ganjei P, Frauehoffer E. **Histopathologic predictors of the behavior of surgically treated stage IB squamous cell carcinoma of the cervix.** *Cancer*, 1992; 69: 1750-1758.

Zhang P, Gao WY, Turner S, Ducatman BS. **Gleevec (STI-571) inhibits lung cancer cell growth (A549) and potentiates the cisplatin effect in vitro.** *Mol Cancer*, 2003; 2:1-9.

Zoon KC. **Future directions in cancer research: impact of the completion of the human genome.** *Toxicol Pathol*, 2004; 32: 1-2.

ANEXOS

Se anexan los siguientes trabajos publicados:

1) Taja CL, Candelaria M, Brom R, Trejo BC, Meza F, Duenas GA. Response to gefitinib in bronchioalveolar carcinoma in the absence of EGFR mutation. *Lung Cancer*, 2005; 50:259-263.

2) Taja-Chayeb L, Chavez BA, Martínez TJ, González FA, Candelaria M, Jose ChanonaVJ, Dueñas GA. Expression of platelet derived growth factor family members and the potential role of imatinib mesylate for cervical cancer. *Cancer Cell International* 2006;

Primary research

Open Access

Expression of platelet derived growth factor family members and the potential role of imatinib mesylate for cervical cancer

Lucia Taja-Chayeb¹, Alma Chavez-Blanco¹, Jorge Martínez-Tlahuel², Aurora González-Fierro¹, Myrna Candelaria², Jose Chanona-Vilchis³, Elizabeth Robles² and Alfonso Dueñas-Gonzalez*¹

Address: ¹Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, Instituto Nacional de Cancerología/Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Mexico, ²Division of Clinical Research, Instituto Nacional de Cancerología, Mexico and ³Department of Pathology, Instituto Nacional de Cancerología, Mexico

Email: Lucia Taja-Chayeb - chayeb@salud.gob.mx; Alma Chavez-Blanco - celular_alma@hotmail.com; Jorge Martínez-Tlahuel - jorgetlahuel1973@yahoo.com; Aurora González-Fierro - aufierro@hotmail.com; Myrna Candelaria - myrnac@prodigy.net.mx; Jose Chanona-Vilchis - jgchanonav@yahoo.com; Elizabeth Robles - elizit00@yahoo.com.mx; Alfonso Dueñas-Gonzalez* - alfonso_duenasg@yahoo.com

* Corresponding author

Published: 02 October 2006

Received: 12 July 2006

Cancer Cell International 2006, 6:22 doi:10.1186/1475-2867-6-22

Accepted: 02 October 2006

This article is available from: <http://www.cancerci.com/content/6/1/22>

© 2006 Taja-Chayeb et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: Despite significant achievements in the treatment of cervical cancer, it is still a deadly disease; hence newer therapeutical modalities are needed. Preliminary investigations suggest that platelet-derived growth factor (PDGF) might have a role in the development of cervical cancer, therefore it is important to determine whether this growth factor pathway is functional and its targeting with imatinib mesylate leads to growth inhibition of cervical cancer cells.

Results: PDGF receptors (PDGFR) and their ligands are frequently expressed in cervical cancer and the majority exhibited a combination of family members co-expression. A number of intronic and exonic variations but no known mutations in the coding sequence of the *PDGFR α* gene were found in cancer cell lines and primary tumors. Growth assays demonstrated that PDGFBB induces growth stimulation that can be blocked by imatinib and that this tyrosine kinase inhibitor on its own inhibits cell growth. These effects were associated with the phosphorylation status of the receptor.

Conclusion: The PDGFR system may have a role in the pathogenesis of cervical cancer as their members are frequently expressed in this tumor and cervical cancer lines are growth inhibited by the PDGFR antagonist imatinib.

Background

Cervical cancer remains as one of the biggest killers of women worldwide [1]. The oncogenic role of human papillomavirus for the development of this cancer has been vastly demonstrated [2], however, an unknown number of genetic [3] and epigenetic [4] defects are also needed

for tumor formation, such as alterations in the epidermal growth factor receptor (EGFR) and other membrane receptors [5]. Abnormalities in platelet derived growth factor (PDGF) family members have been underscored as important players for neoplasms such as meningiomas, gliomas, melanomas, neuroendocrine tumors, sarcomas

and ovarian, pancreas, gastric, lung, breast and prostate carcinomas [6-8]. PDGF is a potent mitogen and chemotactic factor for mesenchymally derived cells, and was one of the first polypeptidic growth factors identified that signals through a cell surface tyrosine kinase receptor (PDGFR), to stimulate various cellular functions including growth, proliferation, and differentiation. Since then, several related genes have been identified constituting a family of ligands (PDGFA B, C and D) and their cognate receptors (PDGFR alpha and beta) [9-11]. PDGF isoforms are dimeric molecules that bind two receptors simultaneously which dimerize upon binding. These receptors may generate homo- or heterodimers resulting in the next combinations PDGFR $\alpha\alpha$, $\alpha\beta$ or $\beta\beta$. The PDGFR α is able to bind to PDGF chains A, B and C, while PDGFR β binds only PDGF chains B and D [12]. Interestingly, the heterodimeric receptor complex $\alpha\beta$ have different properties compared to the homodimers [13].

The recent availability of potent and specific tyrosin kinases inhibitors such as imatinib mesylate, which was developed as an ATP competitive inhibitor of ABL tyrosine [14] that, at concentrations required for inhibition of Bcr-Abl, also inhibits PDGFR and c-Kit [15], has revived the interest on the PDGFR as potential therapeutic target for several neoplasms, including solid tumors [16,17]. Regarding cervical cancer, the role of the PDGFR system remains to be explored. So far there are some indications that PDGFR could participate in the HPV-driven carcinogenic process. It has been shown that transformation by the bovine papillomavirus type 1 (BPV-1) E5 protein binds to and activates PDGFR β inducing its dimerization and sustained activation similarly to PDGF [18,19]. Further, it was proven that the E5-induced tyrosine phosphorylation or mitogenic activity of the receptor is ligand PDGFR independent. Thus, it seems that PDGFR β is the main cellular target of the BPV-E5 oncoprotein [20,21]. Little is known regarding the PDGF and PDGFR expression in cervical cancer. There is only one small study where the expression of the PDGFR protein was investigated in 11 patients with mild, moderate or severe dysplasia as well as four invasive cervical cancers. Expression of PDGFR β was observed at high levels in low-grade cervical lesions, while expression was depressed in high-grade lesions, suggesting a role for PDGFR during early stages of cervical carcinogenesis [22].

On the other hand, PDGFR β participates in the regulation of interstitial fluid pressure (IFP), by modulating the tension between cells and extracellular matrix structures [23]. Subsequently it was demonstrated that IFP is elevated in most malignant tumors, mainly as a result of the abnormal tumor vasculature that develops from unregulated angiogenesis, resulting in a diminished hydrostatic gradient from capillary to interstitium and thereby impairing

the exchange of solutes over the capillary membrane, creating a physiological barrier to tumor uptake of drugs from circulation [24,25]. Increased interstitial fluid pressure has also been demonstrated in cervical cancer patients [26]. Interestingly, a prospective study in 102 cervical cancer patients, demonstrated a strong independent prognostic value of pre-treatment IFP measurements in tumors. Patients with high IFP are significantly more likely than those with low IFP to recur after radiotherapy and die of progressive disease [27].

It has been demonstrated that not only overexpression of PDGFR participates in carcinogenesis; also genetic changes have a role in this process. So far, Heinrich demonstrates that activating gene mutations of PDGFR α in GISTs have biological consequences, highlighting a crucial role for PDGFR α in the pathogenesis of a solid tumor [28]; in fact some of this mutations induce imatinib resistance [29].

All together these data clearly suggest that blocking the PDGFR system would be of therapeutic value in cervical cancer, hence in this work we analyzed the expression of PDGF family members as well as the mutational status of the PDGFR α gene in a series of cervical cancer cell lines and primary tumors of cervical cancer patients. In addition, the growth inhibitory effect of imatinib was also investigated in a cervical cancer cell line.

Results

Expression of PDGF family members in cervical cancer cell lines

Expression of PDGF ligands and receptors was investigated in eight cervical cancer cell lines. The results, presented in Table 1 demonstrate that all cell lines tested, expressed PDGFR α but none expressed PDGFR β . In regard to the ligands, the PDGFB was present in five (62.5%) out of eight cell lines whereas 50% (4 out of 8) of the cell lines expressed PDGFA. Interestingly, all cell lines co-expressed the PDGFR α with at least one of the lig-

Table 1: Expression of PDGF family members in cervical cancer cell lines.

Cell line	PDGFR α	PDGFA	PDGFR β	PDGFB
C33A	+	-	-	+
INBI	+	-	-	+
ViPa	+	-	-	+
ViBo	+	-	-	+
HeLa	+	+	-	-
SiHa	+	+	-	-
CaLo	+	+	-	+
CasKi	+	+	-	-

Cell lines were analyzed by immunocytochemistry. CaLo cells co-expressed the receptor alpha and both ligands. Positivity was considered when 5% or more of the cell population stained.

ands. There was only one cell line (CaLo) which co-expressed both ligands along with the receptor. Hence this cell line was chosen for further testing.

Expression of PDGF family members in primary tumors

The immunohistochemical expression of PDGF and PDGFR family members was evaluated in the primary tumors of 36 patients. Biopsies were taken before the patients received any anticancer therapy; mean age for the patients was 40.8 years; 6 patients were staged as IB2-IIA, 14 as IIB and 16 as IIIB; 32 and 4 were histologically classified as squamous and adeno/adenosquamous respectively. The immunohistochemistry results are shown in Figure 1. Overall, PDGFR α was expressed in the malignant cell component of the sample in 15 (41.6%) of cases, 3 of them (8.3%) showed positive reaction in tumor cells as well as in stroma; and in 2 cases (5.5%) only in the stroma. Regarding the PDGFR β , 19 samples (52.7%) expressed the receptor in the tumor component, 13 out of the 19 samples showed signal in tumor and stroma; 4 cases (11.1%) were positive only in the stroma. PDGF ligands were evaluated only in 25 samples because of sample limitations. PDGFA was expressed in 15 cases (60%) in the tumor cell component; 17 samples (68%) stained in the stroma, 14 of them were positive in both components, while 3 (12%) only in the stroma. None of the samples expressed the PDGFB. Representative cases are shown in Figure 2.

Mutational analysis of the PDGFR α gene

To further characterize the potential participation of PDGFR in cervical cancer development and to determine the presence of gene-activating mutations or mutations associated to imatinib resistance, we performed a mutational analysis of the PDGFR α exons 12 and 18 in the DNA extracted from the 8 cell lines and the frozen cervical tumors. Table 2 shows that cell lines ViPa, HeLa, CaLo and INBL were wild type for the exon 12 and presented a silent mutation in codon 824 C>T leading to a Val>Val change (SNP rs10015469, previously reported) in exon 18. On the other hand, C33, CasKi and SiHa cells were wild type for exon 18 but showed a G>A in codon 571 leading to a Glu>Lys substitution (unreported changes). Interestingly ViBo cell line had three silent mutations at exon 12 and two intronic variations, whereas in exon 18 no exonic variations but two intronic variations were found. Regarding the analysis of the 17 tumor samples, all were wild type for exon 12. At exon 18, seven patients were wild type and ten had the same silent mutation found in cell lines at codon 824 (Table 3). Regarding normal tissues, we performed the sequence analysis in three cervical tissues and in the lymphocytes from 8 healthy donors, the three cervical samples had the codon 824 silent mutation in exon 18 and, two of them presented an intronic polymorphism in exon 12 (Table 3). All the lymphocyte donors were wild type for exon 12 and three of them had the silent mutation at codon 824 (data not shown).

Case	PDGFR α	PDGFA	PDGFR β
1			
2		▤	
3			
4			
5		▤	
6		▤	
7			
8		▤	
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15		▤	
16		▤	
17		▤	
18			
19		▤	
20		▤	
21			
22			
23			
24			
25			
26			
27			
28			
29		▤	
30		▤	
31			
32			
33			
34			
35			
36			

Figure 1
 Expression of PDGF family members in primary tumors. In this figure we show the co-expression of receptors and ligand in each sample. Gray boxes indicate positivity, white negativity and line-drawing not done. Summary of the results is: **PDGFR α** : 15 cases (41.6%) were positive in tumor cells, of these, 3 cases show expression in tumor and stroma cells. Two cases were positive only in stroma (5.5%). **PDGFR β** : 19 cases (52.7%) were positive in tumor cells, of these 13 samples show expression in both tumor and stoma cells. Four tumors were positive only in stroma cells (11.1%). **PDGFA**: 15 cases (60%) were positive at the tumor component, 14 of them in both tumor and stroma; 3 cases (12%) positive only in stroma. **PDGFB**: All negative

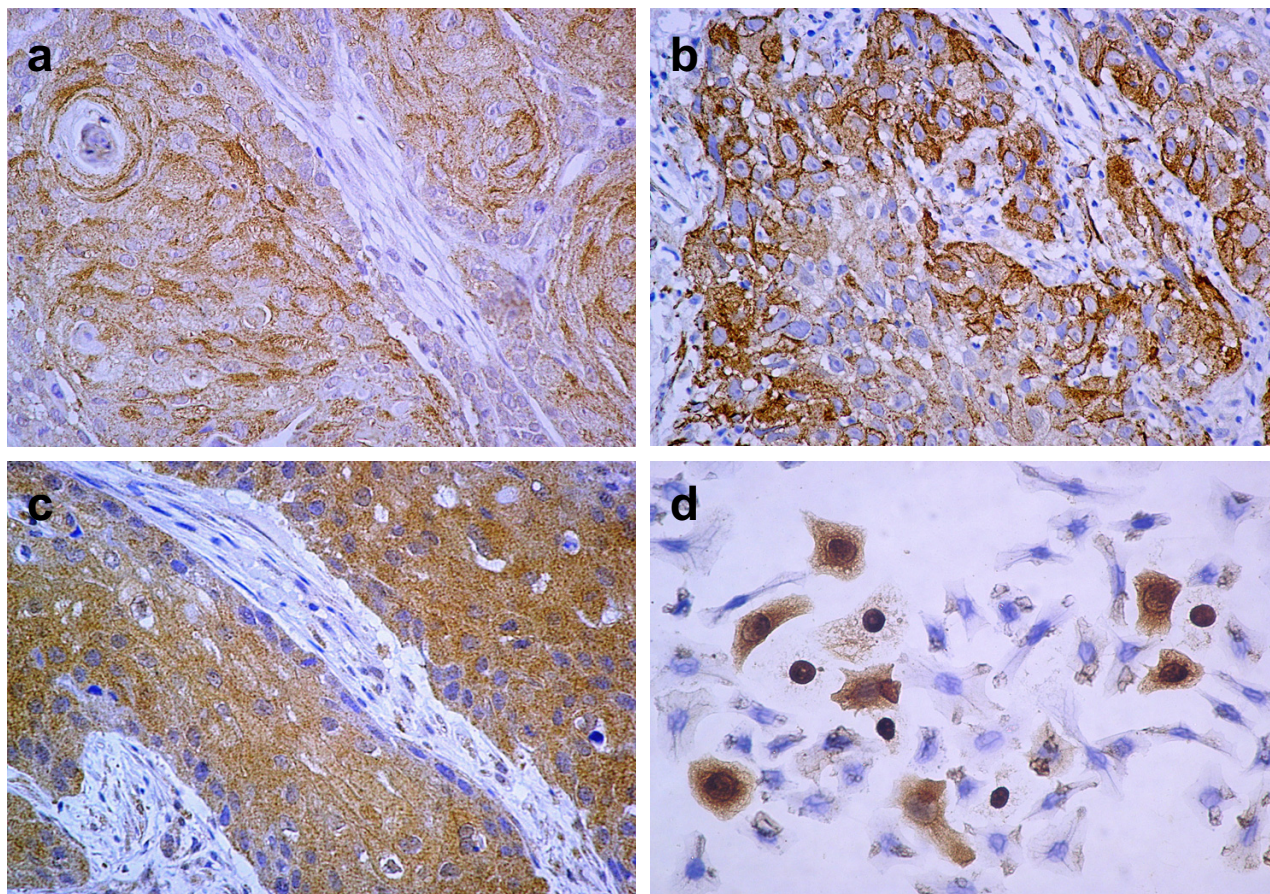


Figure 2

Representative samples of primary tumors expressing: a) PDGFR α , b) PDGFA and c) PDGFR β . (100X). d) shows the staining for PDGFR α in the cell line CaLo (400X).

Cell proliferation

In order to investigate whether the PDGF system has a role in regulating cell growth, the cell line CaLo which co-express three family members, was grown for two days in the absence of serum and then re-plated for treatment with imatinib, recombinant PDGFBB or both for five days. The results show that the ligand BB led to a 37% growth stimulation as compared to the untreated control ($p < 0.001$). On the contrary imatinib induced a statistically significant growth inhibition as compared to untreated control ($p < 0.001$); and when cells were co-treated with the ligand and imatinib, the growth-inducing activity of the PDGFBB was partly blocked by imatinib ($p < 0.001$), (Figure 3a).

PDGFR α phosphorylation

The growth assays clearly demonstrated that in this model, cells are responsive to the growth stimulatory effect of the PDGFBB which can be partly blocked by the

PDGFR kinase inhibitor imatinib. To assess whether this effect was associated with receptor activation, serum deprived CaLo cells were transiently stimulated with the PDGFBB for 15 min in the presence or absence of imatinib, and then analyzed by western blot with an antibody against the phosphorylated PDGFR α . Figure 3b shows that in untreated control cells, there was a basal level of receptor phosphorylation which increased after stimulation with the growth factor, but was inhibited to a similar degree of untreated cells by imatinib treatment.

Discussion

Treatment results of locally advanced cervical cancer are suboptimal despite the recent success of first line therapy with concurrent chemoradiation [31,32]; or with and cisplatin plus topotecan for recurrent and metastatic [33]. Nevertheless, it is necessary to evaluate newer forms of therapy. Preclinical and clinical development of newer agents targeting molecular defects present in tumors [34]

Table 2: Sequence analysis of PDGFR α exons 12 and 18 from eight primary cervical cancer cell lines.

CELL LINE	EXON 12				EXON 18			
	localization	change	position	amino acid	localization	change	position	amino acid
ViBo	Exon	G>A CCA >CCG	Codon 567	Pro > Pro	Intron	C >G	IVS18 +21	---
	Exon	G>A CCA >CCG	Codon 577	Pro > Pro	Intron	A >G	IVS18 +25	---
	Exon	A>G TCA >TCG	Codon 584	Ser > Ser		----		
	Intron	A > G	IVS12 +17	----		----		
	Intron	T > C	IVS12 +35	----		----		
ViPa		WT			Exon	C >T GTC>GTT	Codon 824	Val > Val
HeLa		WT			Exon	C >T GTC>GTT	Codon 824	Val > Val
CaLo		WT			Exon	C >T GTC>GTT	Codon 824	Val > Val
INBL		WT			Exon	C >T GTC>GTT	Codon 824	Val > Val
C33	Exon	G >A GAA>AAA	Codon 571	Glu > Lys		WT		
Caski	Exon	G >A GAA>AAA	Codon 571	Glu > Lys		WT		
SiHa	Exon	G >A GAA>AAA	Codon 571	Glu > Lys		WT		

WT: wild type; IVS: intronic variation sequence. We found 7 intronic and 5 exonic variations sequences [RefSeq accession D50017]. None of the intronic variations have been reported: for exon 12 we found, A >G IVS12+17 and T >C IVS12+35, and for exon 18, C >G IVS18+21 and A >G IVS18+25. The exonic changes were: G >A in codon 567 CCA >CCG, Pro>Pro [rs1873778] synonymous; G>A codon 577 CCA >CCG, Pro >Pro (unknown) synonymous; C >T in codon 824 GTC >GTT, Val >Val [rs10015469] synonymous; G >A codon 571 CCA >CCG, Glu > Lys (unknown) not deleterious; and A >G in codon 584 CCA >CCG, Ser > Ser (unknown) synonymous.

open the way for the identification of molecular targets in cervical cancer.

The availability of the tyrosin kinase inhibitor imatinib which not only targets bcr/abl but also c-kit and PDGFR

Table 3: Sequence analysis of PDGFRA exons 12 and 18 from primary cervical cancer tumors and normal cervix samples.

SAMPLE	EXON 12				EXON 18			
	localization	change	position	amino acid	localization	change	position	amino acid
CU-194		WT				WT		
CU-493		WT			Exon	C >T GTC>GTT ht	Codon824	Val > Val
CU-693		WT				WT		
CU-794		WT			Exon	C >T GTC>GTT hm	Codon 824	Val > Val
CU-1094		WT			Exon	C >T GTC>GTT ht	Codon 824	Val > Val
CU-1194		WT			Exon	C >T GTC>GTT ht	Codon 824	Val > Val
CU-1494		WT				WT		
CU-1593		WT			Exon	C >T GTC>GTT ht	Codon 824	Val > Val
CU-2294		WT			Exon	C >T GTC>GTT ht	Codon 824	Val > Val
CU-3194		WT			Exon	C >T GTC>GTT hm	Codon 824	Val > Val
CU-3293		WT			Exon	C >T GTC>GTT ht	Codon 824	Val > Val
CU-3994		WT			Exon	C >T GTC>GTT hm	Codon 824	Val > Val
CU-4594		WT				WT		
CU-4793		WT				WT		
CU-4994		WT				WT		
CU-5393		WT				WT		
CU-5593		WT			Exon	C >T GTC>GTT ht	Codon 824	Val > Val
CN-893	Intron	C > A	IVS12 +22	-----	Exon	C >T GTC>GTT ht	Codon 824	Val > Val
CN-993	Intron	C > A	IVS12 +22	-----	Exon	C >T GTC>GTT ht	Codon 824	Val > Val
CN-994		WT			Exon	C >T GTC>GTT ht	Codon 824	Val > Val
HD		WT				WT		

WT: wild type; IVS: intronic variation sequence; ht: heterozygous; hm: homozygous. CU = cervical cancer, CN = non-neoplastic cervix, HD = healthy donor lymphocytes. The polymorphisms were presented as ht = heterozygous or hm = homozygous. [RefSeq accession D50017]. All patients were wild type in exon 12, and 10 out of 17 had the silent mutation C >T in codon 824 GTC >GTT, Val >Val [rs10015469]. 2 samples of non-neoplastic cervical tissue presented the intronic variation C >A IVS12+22 [rs2307051] and all 3 presented the silent mutation in codon 824 [rs10015469]. In this table we show the results of only one lymphocytes donor, but all 8 donors were wild type for exon 12, and 3 out of 8 presented the polymorphism at codon 824.

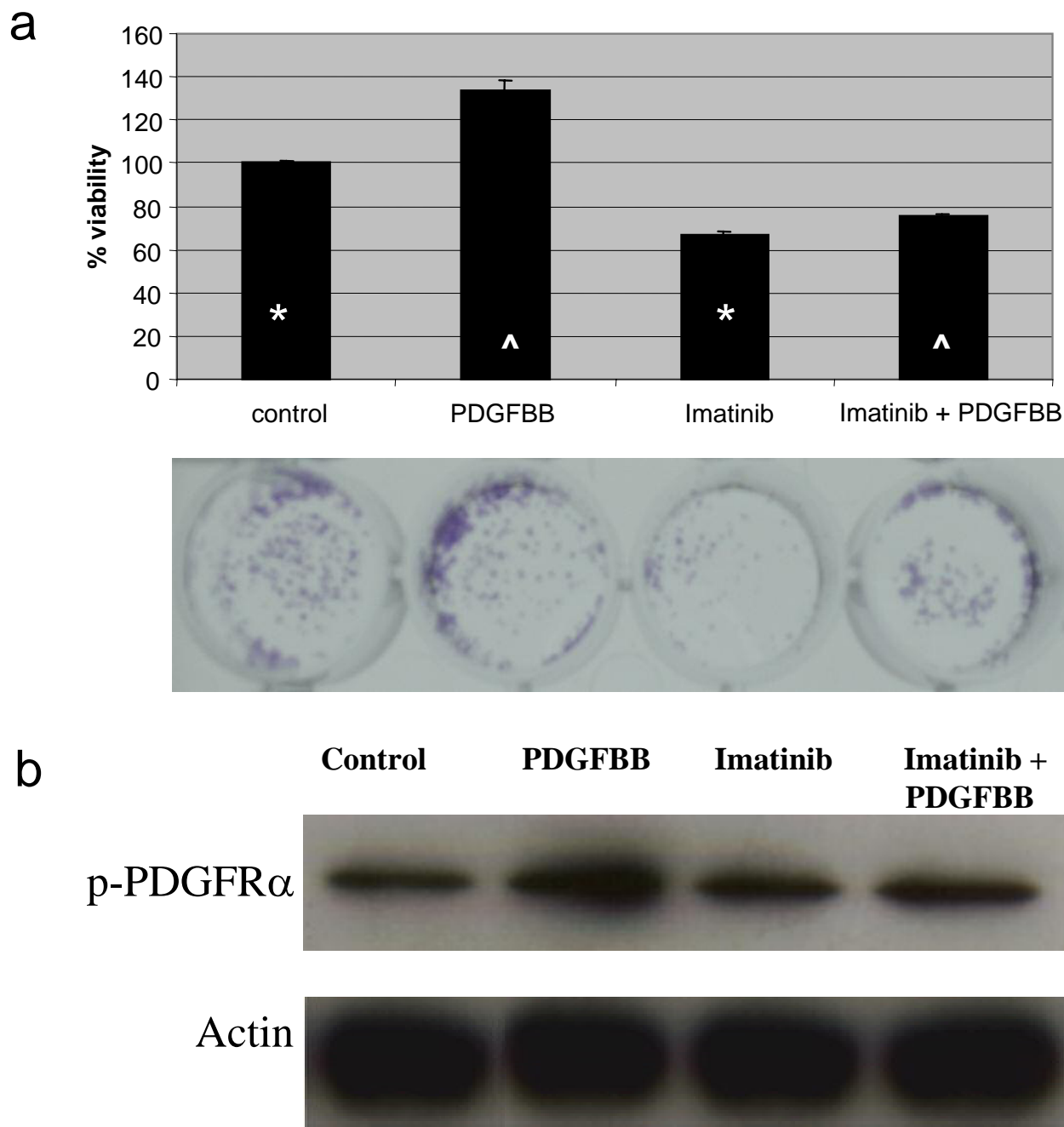


Figure 3

a) Effect of imatinib in cervical cell line growth. CaLo cells were grown for two days in the absence of serum and then re-plated for treatment with imatinib, PDGF $\beta\beta$ or both for five days. PDGFBB stimulated cell growth as compared to the untreated control. On the contrary imatinib induced growth inhibition and when cells were co-treated with the ligand and imatinib, the growth-inducing activity of the PDGFBB was partly blocked by imatinib (comparison are marked with * or ^, all these differences were statistically significant $p < 0.001$). Their corresponding pictures of the plates stained with crystal violet is shown below. **b)** Inhibition of phosphorylation of PDGFR α by imatinib. CaLo cells were stimulated with PDGFBB at 10 ng/mL, for 10 min; treated with imatinib at 10 μ M for 2 hours; treated with imatinib for two hours and then with PDGFBB for 15 min; or no treatment as control. Equal loading confirmed with actin. Receptor phosphorylation is increased in the PDGFBB lane and inhibited by imatinib treatment.

has led to investigate the participation of these two receptors in several solid malignancies, particularly in small cell lung cancer and prostate carcinoma which over-express the c-kit receptor. However, early results using imatinib as a single agent have not been encouraging [35-37] which suggests that the sole presence of the putative target may not be sufficient to achieve tumor responses, besides, it is necessary to demonstrate that the pathway is functional and of relevance for one or more characteristics of the malignant phenotype in the tumor to be targeted.

So far, the role of the PDGFR pathway for the development of cervical cancer has been only studied in *in vitro* models, derived from the observation of the interaction between the E5 papilloma virus protein with the PDGFR [19,20]. There is a single study showing that the four primary cervical cancers analyzed by immunohistochemistry expressed the PDGFR β [22]. In several tumors, where the participation of PDGF family has been demonstrated, a simultaneous expression of the receptors and the ligands seems to be important, suggesting an autocrine stimulation mechanism [38]. In the present study we evaluated a larger sample of primary tumors for the expression of the ligands and receptors of PDGF at both the malignant and stroma components of the biopsy. The expression of these growth factor family members in stroma is important as they are regulators of mesenchymal cell proliferation and migration during development, and therefore could play important roles in stromal fibroblast recruitment and tumor progression [39,40].

Our results indicate that around half of the tumors express the PDGFR α , PDGFR β and PDGFA, in both tumor and stroma as shown in Figure 1. We found no expression of the B ligand in tumor samples, which was surprising as 5 out of 8 cervical cancer cell lines expressed this ligand. In addition, both ligands have been found expressed in a number of other tumor types [9]. Whether this feature is unique to primary cervical cancer tumors merits further study.

Interestingly 78% of the primary tumors express either the alpha or beta receptor. This elevated frequency of expression and co-expression highly suggest autocrine and paracrine functioning in cervical cancer tumors. This high frequency of expression and co-expression also occurred in the cervical cancer cell lines studied. It has been shown that the sole expression of PDGF receptors correlates with known adverse prognostic factors such as axillary lymph node metastases in breast cancer [28]. However, in this study we found no correlation between any combination of PDGF members expression with neither clinical characteristics of patients nor survival (data not shown). This observation does not exclude the possible prognostic significance of these receptors in cervical cancer. We also

studied the mutational status of the PDGFR α , based on the identification of activating gene mutations within a subset of GISTs that lacked *KIT* gene mutation, and where constitutive phosphorylation of PDGFR α was observed, and the corresponding PDGFR α isoforms demonstrated ligand-independent kinase activity [29]. These observations have profound implications for the treatment of solid tumors with imatinib, as some of these mutations confer either sensitivity or resistance to this tyrosine kinase inhibitor [41]. This can be explained on the lack of differences in the activation of downstream signaling intermediates between *KIT*-mutant and PDGFR α -mutant tumors, suggesting that mutant PDGFR α provides oncogenic signals that parallel those of mutant *KIT* [29].

Our sequence results indicate that the cervical cancer cell lines and primary tumors analyzed showed a number of intronic and exonic variations, most of them previously unreported, (Tables 2 and 3). The mutation G>A in codon 571 leading to a Glu>Lys substitution found in three of the cell lines has not been reported; however, the deletion/substitution SPDGHE566-571R (already reported) involves codon 571 which corresponds to the juxtamembrane domain of the protein. The significance of this change in regard to imatinib sensitivity is unknown [42] but this deletion increases PDGFR α activation in the presence of PDGFA [29] suggesting that the mutation that we found, could affect the PDGFR α functioning. In an attempt to study the possible effect of this mutation on the protein, we used the simulation program PolyPhen [43] to predict whether this mutation, found in the cell lines, is likely to have biological meaning. The results indicate that the G>A at codon 571 of exon 12 is "benign". It is clear however, that this is only a theoretical approximation hence; the meaning of changes found must be investigated in experimental systems [44]. Besides, most of the intronic changes that we found are located in the proximity of the exon boundaries, and their possible meaning has to be studied. Regarding the samples from patients, we found the silent mutation at codon 824 already reported, in 10 out of 17 patients (59%). In the normal cervical samples, we found that 6 out of 11 presented the polymorphism at codon 824 (55%), indicating that this polymorphism is very common in our population. In exon 12, two samples presented the intronic change C>A IVS12+22 already reported [rs2307051] with no known consequence.

As stated above, the sole expression of the PDGFR or ligand is not an indication that the pathway is functional and that regulates the growth of the expressing tumor. Hence, we wanted to evaluate whether CaLo cell line which express the receptor alpha and both ligands is responsive to the growth factor and its inhibitor. Our results clearly demonstrate that while CaLo cells exhibit

growth stimulation by PDGFBB, imatinib has on their own a small but significant growth inhibitory effect in serum-deprived cells, and that imatinib also partly blocks the PDGFBB-induced growth stimulation. These effects on growth are likely due to activation of the PDGFR pathway as the results of western blots employing a primary antibody specific for the activated form of the receptor alpha indicate phosphorylation after the stimulation with PDGFBB, and that is back to unstimulated levels upon exposure to imatinib. It is noteworthy however, that in untreated cells despite being inhibited in their growth by imatinib, the basal level of phosphorylation of the receptor was unchanged after imatinib treatment, which may suggest that under the experimental conditions tested, the method has not enough sensitivity to detect a certain degree of phosphorylation inhibition. Even that we did not evaluate the activation of known downstream phosphorylation targets of the PDGFR pathway, the results demonstrate that as observed in other tumors such as osteosarcoma [45] and ovarian carcinoma [38], the blocking of this pathway could have therapeutical implications. Nevertheless, further functional characterization of the pathways either Src-PI3K-ERK, JNK1-p21 or other [46], known to be activated by PDGFR stimulation in other systems, is needed in order to optimize the potential use of PDGFR inhibitors in this malignancy. Likewise, is desirable to increase the number of primary tumors tested for activating mutations of the PDGFR to rule out the existence of activating mutations at this receptor that could be specifically blocked by PDGFR inhibitors. In addition, it remains to be explored whether the *in vivo* blocking the receptor affects the interstitial pressure and would facilitate drug penetration into tumors.

Conclusion

This study shows that members of the PDGF system are expressed in cervical cancer cell lines and primary cervical cancer tumors. In addition it is shown that the *PDGFR α* gene has several intronic and exonic changes but none of them biologically relevant. More interestingly, the results demonstrate that in a cervical cancer cell line, the system is functional as recombinant PDGFBB induces cell growth and receptor phosphorylation which can be blocked by imatinib. Despite the absence of activating mutations of *PDGFR α* , the co-expression of PDGF receptors and PDGFA in both the malignant cell component and stroma of the tumors, suggests the existence of an autocrine/paracrine growth stimulation loop which can be blocked by imatinib.

Methods

Cell lines and reagents

DMEM culture media and Fetal Calf Serum were purchased from Gibco BRL Life Technologies (Grand Island, New York). HeLa, CasKi, SiHa and C33A were obtained

from the ATCC, ViBo, INBL, ViPa and CaLo carcinoma cell lines were kindly provided by Dr. Monroy (FES Zaragoza, UNAM, Mexico City). Cells were routinely grown in DMEM supplemented with 10% FCS at 37°C and 5% CO₂. For immunocytochemistry analyses, cells were grown on two-chamber polystyrene vessel Falcon® (Becton Dickinson, NJ.) and subsequently formalin-fixed for 24 hrs at room temperature, then rehydrated in graded ethanol. Afterwards immunochemistry was performed as below described.

Cervical cancer samples

Thirty-six paraffin-embedded tumor tissues from patients FIGO staged as IB2 to IIIB, treated with standard radiation concurrent with weekly cisplatin. Diagnosis was made on the basis of routine hematoxylin-eosin examination under light microscopy according to the World Health Organization criteria. Tumor specimens at diagnosis were taken before any treatment was instituted. For the mutational analysis of the *PDGFR α* 17 frozen samples of cervical cancer from an unrelated study were used. Biopsies from normal cervix and lymphocytes from 8 healthy donors were taken from a tissue bank.

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry for the PDGFRs and their ligands was performed using standard procedures. Briefly, sections were deparaffinized in xylene and rehydrated through graded ethanols to distilled water. The sections were immersed in Dako Epitope Retrieval Solution (10 mM citrate buffer, pH6) that had been preheated to 95°C in a water bath and then heat-treated at 95°C for 40 min. After a 20-minute cooldown period at room temperature, the sections were washed with PBS buffer, a procedure that followed every subsequent incubation. Endogenous peroxidase was blocked with Dako Blocking Buffer (0.3% hydrogen peroxide containing 15 mM sodium azide) for 5 min at room temperature. The sections were incubated for 30 min at room temperature with the following antibodies used at 1:75 dilution: PDGFA (monoclonal antibody sc-9974), PDGFB (polyclonal antibody sc-7878), *PDGFR α* (polyclonal antibody sc-338) and for *PDGFR β* (monoclonal antibody sc-6252) all four from Santa Cruz Biotechnology. Bound primary antibody was labeled by incubating the slides with the Dako Visualization reagent (Dako EnVision + System, peroxidase (DAB, K-4007 and K4011). The sections were counterstained with hematoxylin and eosin. Tissues used as positive controls were placenta for both ligands, and normal skin for the receptors. In the negative controls, the primary antibody was omitted. Positivity was considered when 5% or more of the malignant cell population or the stroma stained. The analysis was performed by two pathologists.

PCR-sequencing

For *PDGFR α* mutational analysis, genomic DNA derived from frozen samples and lymphocytes from 8 donors, was extracted following conventional techniques, with proteinase K digestion followed by phenol:chloroform extraction. *PDGFR α* DNA was amplified by PCR using the following primers: exon 12 forward: 5'-aagctctggtcactgggactt-3' and reverse: 5'-attgtaaagttgtgtcaaggga-3', product size 251 bp; exon 18 forward: 5'-tacagatggcttgatcctgagt-3' and reverse: 5'-agtgtggaggatgagcctg-3', product size 212 bp. PCR was performed in 25- μ L reactions containing 200 ng DNA, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 40 mmol/L KCl, 2 mmol/L MgCl₂, 200 μ mol/L of each dNTP, 1 μ mol/L of each primer, and 0.25 U Taq polymerase (Applied Biosystems). PCR reaction was carried out on an 2400 Thermalcycler (Applied Biosystems). Initial denaturation at 94°C for 5 minutes was followed by 40 cycles of amplification and a final extension step (5 minutes at 72°C). The cycles included denaturation at 94°C for 30 seconds, annealing at 60°C for 30 seconds, and extension at 72°C for 30 seconds. PCR amplicons were purified using isopropanol precipitation and then sequenced in both forward and reverse directions from at least two independent amplification products. Purified DNA was diluted and cycle-sequenced using the ABI BigDye Terminator kit v3.1 (ABI, Foster City, CA) according to manufacturer's instructions. Sequencing reactions were electrophoresed on an ABI3100 genetic analyzer. Electropherograms were analyzed in both sense and anti-sense direction for the presence of mutations.

Cell proliferation

CaLo cells were harvested in 75-cm² flasks, washed twice with PBS, and transferred in serum-free medium into 12-well plates at a seeding density of 1 × 10³ cells/well. Each treatment group was plated in triplicate which consisted in: no treatment, recombinant human PDGF-BB at 10 ng/mL, Imatinib at 10 μ M (freshly prepared in ddH₂O) from a commercial presentation) and both, the ligand and imatinib. Fresh medium containing these treatments was replaced at day 3. Cells were harvested after five days of treatment and analyzed by the crystal violet method as reported [30]. Briefly, cells were incubated in 0.1% crystal violet for 30 min at room temperature, excess dye was removed by three brief rinses with ddH₂O, the plates were air dried, and the dye was extracted with 10% acetic acid, which was then read in a plate reader (Wallac 1420; Perkin Elmer, Boston, MA, USA) at 570 nm. This method has shown to give an absorbance that correlates linearly with the number of cells over the range 1000 to 50,000 cells/well [30]. Assays were performed in triplicate and data are presented as a mean and SD. Statistical analysis of cell proliferation results was done using the ANOVA test.

Western Blot analysis

CaLo cells were cultured with complete medium in 75-cm² flasks and when reached a 50–75% confluence, washed twice with PBS and replenished with serum-free medium for two days. Cells were then stimulated with PDGF BB at 10 ng/mL, for 10 min; treated with Imatinib at 10 μ M for 2 hours; treated with imatinib for two hours and then with PDGF BB for 15 min; or no treatment as control. Cells were washed with ice-cold PBS solution and lysed in 0.2 mL of lysis buffer (Cell Signaling Technologies, Beverly, MA) at 4°C for 30 min. Lysates were cleared by a 10-min centrifugation at 10,000 × g, and protein determination was carried out according to the method of Bicinchoninic acid. Samples were subjected to 8% PAGE analysis after they were boiled for 5 min in sample buffer containing SDS. The separated proteins were transferred to an Hybond-P membrane (Amersham, Biosciences UK) and then blocked for 1 h in TBS (1× Tris-buffered saline) containing 5% nonfat milk. The membrane was then incubated with primary antibody in TBS overnight at 4°C. Primary antibody for p-PDGFR α , (Tyr 754 sc-12911-R, Santa Cruz Biotechnology, CA). Equal loading of protein samples (20 μ g) was confirmed by incubating membranes with a primary antibody specific for actin (Santa Cruz Biotechnology). Membranes were washed and then incubated for 1 h at room temperature with secondary antibody. Bound antibody was detected using enhanced chemiluminescence reagent (ECL; Biosciences UK).

Competing interests

The author(s) declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

LT-C performed the sequence analysis and contributed writing the manuscript; AC-B, AG-F and JC-V performed the immunohistochemistry analysis; JM-T and A C-B did the western blot analyses; MC, contributed writing the manuscript; ER contributed with clinical data; and AD-G conceived and wrote the final version of the manuscript.

Acknowledgements

This work was submitted in partial fulfilment of the requirements for the D. Sc. degree in for LTC at Doctorado en Ciencias Biomedicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

References

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P: **Estimating the world cancer burden: Globocan 2000.** *Int J Cancer* 2001, **94**:153-156.
2. Snijders PJ, Steenbergen RD, Heideman DA, Meijer CJ: **HPV-mediated cervical carcinogenesis: concepts and clinical implications.** *J Pathol* 2006, **208**:152-164.
3. Kersemaekers AM, van de Vijver MJ, Kenter GG, Fleuren GJ: **Genetic alterations during the progression of squamous cell carcinomas of the uterine cervix.** *Genes Chromosomes Cancer* 1999, **26**:346-354.
4. Duenas-Gonzalez A, Lizano M, Candelaria M, Cetina L, Arce C, Cervera E: **Epigenetics of cervical cancer. An overview and therapeutic perspectives.** *Mol Cancer* 2005, **4**:38.

5. Vaidya AP, Parnes AD, Seiden MV: **Rationale and clinical experience with epidermal growth factor receptor inhibitors in gynecologic malignancies.** *Curr Treat Options Oncol* 2005, **6**:103-114.
6. Ostman A: **PDGF receptors-mediators of autocrine tumor growth and regulators of tumor vasculature and stroma.** *Cytokine Growth Factor Rev* 2004, **15**:275-286.
7. Yu J, Ustach C, Kim HR: **Platelet-derived growth factor signaling and human cancer.** *J Biochem Mol Biol* 2003, **36**:49-59.
8. George D: **Platelet-derived growth factor receptors: a therapeutic target in solid tumors.** *Semin Oncol* 2001, **28**(5 Suppl 17):27-33.
9. Heldin C-H, Westermark B: **Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor.** *Physiol Rev* 1999, **79**:1283-1316.
10. Li X, Ponten A, Aase K, Karlsson L, Abramsson A, Uutela M, Backstrom G, Hellstrom M, Bostrom H, Li H, Soriano P, Betsholtz C, Heldin CH, Alitalo K, Ostman A, Eriksson U: **PDGF-C is a new protease-activated ligand for the PDGF alpha-receptor.** *Nat Cell Biol* 2000, **2**:302-309.
11. Bergsten E, Uutela M, Li X, Pietras K, Ostman A, Heldin CH, Alitalo K, Eriksson U: **PDGF-D is a specific, protease-activated ligand for the PDGF beta-receptor.** *Nat Cell Biol* 2001, **3**:512-516.
12. Reigstad LJ, Varhaug JE, Lillehaug JR: **Structural and functional specificities of PDGF-C and PDGF-D, the novel member of the platelet-derived growth factors family.** *FEBS J* 2005, **272**:5723-5741.
13. Heldin CH, Eriksson U, Östman A: **New members of the platelet-derived growth factor family of mitogens.** *Arch Biochem Biophys* 2002, **398**:284-290.
14. Buchdunger E, O'Reilly T, Wood J: **Pharmacology of imatinib (STI571).** *Eur J Cancer* 2002, **38**(Suppl 5):S28-S36.
15. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, Zimmermann J, Lydon NB: **Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells.** *Nat Med* 1996, **2**:561-566.
16. Carroll M, Ohno-Jones S, Tamura S, Buchdunger E, Zimmermann J, Lydon NB, Gilliland DG, Druker BJ: **CGP 5 a tyrosine kinase inhibitor, inhibits the growth of cells expressing BCR-ABL, TEL-ABL, and TEL-PDGFR fusion proteins.** *Blood* 1997, **90**:4947-4952.
17. Board R, Jayson GC: **Platelet-derived growth factor receptor (PDGFR): a target for anticancer therapeutics.** *Drug Resist Updat* 2005, **8**:75-83.
18. Petti L, DiMaio D: **Stable association between the bovine papillomavirus E5 transforming protein and activated platelet-derived growth factor receptor in transformed mouse cells.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, **89**:6736-6740.
19. Nilson LA, DiMaio D: **Platelet-derived growth factor receptor can mediate tumorigenic transformation by the bovine papillomavirus E5 protein.** *Mol Cell Biol* 1993, **13**:4137-4145.
20. Drummond-Barbosa DA, Vaillancourt RR, Kazlauskas A, DiMaio D: **Ligand-independent activation of the platelet-derived growth factor beta receptor: requirements for bovine papillomavirus E5-induced mitogenic signaling.** *Mol Cell Biol* 1995, **15**:2570-2581.
21. Nappi VM, Petti LM: **Multiple transmembrane amino acid requirements suggest a highly specific interaction between the bovine papillomavirus E5 oncoprotein and the platelet-derived growth factor beta receptor.** *J Virol* 2002, **76**:7976-7986.
22. Mayer TJ, Fraumeni EE, Meyers AC: **Expression of epidermal growth factor and platelet-derived growth factor receptors during cervical carcinogenesis.** *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2000, **36**:667-676.
23. Heuchel R, Berg A, Tallquist M, Ahlen K, Reed RK, Rubin K, Claesson-Welsh L, Heldin CH, Soriano P: **Platelet-derived growth factor beta receptor regulates interstitial fluid homeostasis through phosphatidylinositol-3' kinase signaling.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, **96**:11410-11415.
24. Milosevic M, Fyles A, Hill R: **Interstitial fluid pressure in cervical cancer: guide to targeted therapy.** *Am J Clin Oncol* 2001, **24**:516-521.
25. Pietras K, Ostman A, Sjoquist M, Buchdunger E, Reed RK, Heldin CH, Rubin K: **Inhibition of platelet-derived growth factor receptors reduces interstitial hypertension and increases transcapillary transport in tumor.** *Cancer Res* 2001, **61**:2929-2934.
26. Roh HD, Boucher Y, Kalnicki S, Buchsbaum R, Bloomer WD, Jain RK: **Interstitial hypertension in carcinoma of uterine cervix in patients: possible correlation with tumor oxygenation and radiation response.** *Cancer Res* 1991, **51**:6695-6698.
27. Milosevic M, Fyles A, Hedley D, Pintilie M, Levin W, Manchul L, Hill R: **Interstitial fluid pressure predicts survival in patients with cervix cancer independent of clinical prognostic factors and tumor oxygen measurements.** *Cancer Res* 2001, **61**:6400-6405.
28. Heinrich MC, Corless CL, Duensing A, McGreevey L, Chen CJ, Joseph N, Singer S, Griffith DJ, Haley A, Town A, Demetri GD, Fletcher CD, Fletcher JA: **PDGFRA activating mutations in gastrointestinal tumors.** *Science* 2003, **299**:708-710.
29. Corless CL, Schroeder A, Griffith D, Town A, McGreevey L, Harrell P, Shiraga S, Bainbridge T, Morich J, Heinrich MC: **PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors: frequency, spectrum and in vitro sensitivity to imatinib.** *J Clin Oncol* 2005, **23**:5357-5364.
30. Ishiyama M, Tominaga H, Shiga M, Sasamoto K, Ohkura Y, Ueno K: **A combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet.** *Biol Pharm Bull* 1996, **19**:1518-1520.
31. Dueñas-Gonzalez A, Cetina L, Mariscal I, de la Garza J: **Modern management of locally advanced cervical carcinoma.** *Cancer Treat Rev* 2003, **29**:389-399.
32. Duenas-Gonzalez A, Cetina-Perez L, Lopez-Graniel C, Gonzalez-Enciso A, Gomez-Gonzalez E, Rivera-Rubi L, Montalvo-Esquivel G, Munoz-Gonzalez D, Robles-Flores J, Vazquez-Govea E, de La Garza J, Mohar A: **Pathologic response and toxicity assessment of chemoradiotherapy with cisplatin versus cisplatin plus gemcitabine in cervical cancer: a randomized Phase II study.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005, **61**:817-823.
33. Long HJ 3rd, Bundy BN, Grendys EC Jr, Benda JA, McMeekin DS, Sorosky J, Miller DS, Eaton LA, Fiorica JV, Gynecologic Oncology Group Study: **Randomized phase III trial of cisplatin with or without topotecan in carcinoma of the uterine cervix: a Gynecologic Oncology Group Study.** *J Clin Oncol* 2005, **23**:4626-4633.
34. Ranson M, Jayson G: **Targeted antitumour therapy—future perspectives.** *Br J Cancer* 2005, **92**(Suppl 1):S28-S31.
35. Dy GK, Miller AA, Mandrekar SJ, Aubry MC, Langdon RM Jr, Morton RF, Schild SE, Jett JR, Adjei AA: **A phase II trial of imatinib (STI571) in patients with c-kit expressing relapsed small-cell lung cancer: a CALGB and NCCTG study.** *Ann Oncol* 2005, **16**:1811-1816.
36. Rao K, Goodin S, Levitt MJ, Dave N, Shih WJ, Lin Y, Capanna T, Doyle-Lindrud S, Juvadian P, DiPaola RS: **A phase II trial of imatinib mesylate in patients with prostate specific antigen progression after local therapy for prostate cancer.** *Prostate* 2005, **62**:115-122.
37. Krug LM, Crapanzano JP, Azzoli CG, Miller VA, Rizvi N, Gomez J, Kris MG, Pizzo B, Tyson L, Dunne M, Heelan RT: **Imatinib mesylate lacks activity in small cell lung carcinoma expressing c-kit protein: a phase II clinical trial.** *Cancer* 2005, **103**:2128-2131.
38. Matei D, Emerson RE, Lai YC, Baldrige LA, Rao J, Yiannoutsos C, Donner DD: **Autocrine activation of PDGFR alpha promotes the progression of ovarian cancer.** *Oncogene* 2006, **25**:2060-2069.
39. Forsberg K, Valyi-Nagy I, Heldin CH, Herlyn M, Westermark B: **Platelet-derived growth factor (PDGF) in oncogenesis: development of a vascular connective tissue stroma in xenotransplanted human melanoma producing PDGF-BB.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, **90**:393-397.
40. Dong J, Grunstein J, Tejada M, Peale F, Frantz G, Liang WC, Bai W, Yu L, Kowalski J, Liang X, Fuh G, Gerber HP, Ferrara N: **VEGF-null cells require PDGFR alpha signaling-mediated stromal fibroblast recruitment for tumorigenesis.** *EMBO J* 2004, **23**:2800-2810.
41. Carvalho I, Milanezi F, Martins A, Reis RM, Schmitt F: **Overexpression of platelet-derived growth factor receptor alpha in breast cancer is associated with tumour progression.** *Breast Cancer Res* 2005, **7**:R788-R795.
42. Lasota J, Dansonka-Mieszkowska A, Sobin LH, Miettinen M: **A great majority of GISTs with PDGFRA mutations represent gas-**

- tric tumors of low or no malignant potential.** *Lab Invest* 2004, **84**:874-883.
43. [<http://www.bork.embl-heidelberg.de/PolyPhen/>].
44. Tchernitchko D, Goossens M, Wajcman H: **In silico prediction of the deleterious effect of a mutation: proceed with caution in clinical genetics.** *Clin Chem* 2004, **50**:1974-1978.
45. McGary EC, Weber K, Mills L, Doucet M, Lewis V, Lev DC, Fidler IJ, Bar-Eli M: **Inhibition of platelet-derived growth factor-mediated proliferation of osteosarcoma cells by the novel tyrosine kinase inhibitor STI571.** *Clin Cancer Res* 2002, **8**:3584-3591.
46. Yu J, Ustach C, Kim HR: **Platelet-derived growth factor signaling and human cancer.** *J Biochem Mol Biol* 2003, **36**:49-59.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp

