



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

“DETECCIÓN DE MUTACIONES EN EL RECEPTOR HER 2, EN EXONES
19 Y 21 EN LINEAS CELULARES DE CARCINOMA DE CÉRVIX CALO E
INBL”

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUIMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

OCTAVIO ALBERTO ZERECERO CARREÓN

DIRECTOR: DRA. ISABEL SOTO CRUZ

ASESOR: M EN C ARTURO VALLE MENDIOLA

MEXICO, DF.

Noviembre 2009



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.

AGRADECIMIENTOS

*Al Laboratorio de Ontología Molecular L-9 P.B de la
Unidad Multidisciplinaria de Investigación
Experimental - Zaragoza, por las facilidades para la
realización del presente trabajo.*

*Un especial agradecimiento a la Dra. Isabel Soto Cruz y
al M. en C. Arturo Valle Mendiola por su total apoyo y
paciencia.*

*También agradezco el apoyo y ayuda brindada a todos
aquellos que de una u otra forma me impulsaron durante y al
término de mi carrera.*

*Por último agradezco a mi familia y ti que ya no estás;
gracias, muchas gracias.*

INDICE

			Pag.
		ABREVIATURAS	3
II		RESUMEN	8
I		INTRODUCCIÓN	8
III		MARCO TEÓRICO	8
	A	Visión general del cáncer	8
	1	Cáncer	8
	2	Diferentes tipos de cáncer	8
	B	Cáncer cérvico uterino	9
	1	Factores promotores del cáncer cérvico uterino	10
	2	Clasificación según la fase clínica	10
	3	Nomenclatura citológica	10-11
	C	Receptores Celulares	12
	1	Receptores con actividad tirosina cinasa, familia EGFR	13-14
	2	Her2/Neu/ErbB2	1
	3	Activación de Her2/ErbB2	20-21
	4	Her2/ErbB2 en cáncer de mama	23
IV		PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	24-25
V		OBJETIVOS	26
	A	Objetivo general	26
	B	Objetivo particular	26
VI		HIPÓTESIS	27
VII		METODOLOGÍA	28-31
	A	Material y equipo	31
VIII		RESULTADOS	30-44
IX		ANÁLISIS DE RESULTADOS	45-46
X		CONCLUSIONES	47
XI		PERSPECTIVAS	47
XII		BIBLIOGRAFÍA	46-54

ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
CALO	Línea celular de carcinoma de cérvix estadio IIIB
°C	Grados centígrados
HPV	Virus de papiloma humano
INBL	Línea celular de carcinoma de cérvix estadio IIIB
mM	Mili molar
μl	Microlitros
μg	Microgramos
ng	Nanogramos
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PI3K	Fosfatidilinositol-3 cinasa
MAPK	Cinasas activadas por mitogeno
Ras	Oncogén activado en sarcoma de Rous
VGEF	Factor de crecimiento vascular endotelial

II. RESUMEN

El gen *her2*, también conocido como Neu/ErbB2 codifica a la proteína p185 o receptor de tirosina cinasa Her2 que pertenece a la familia de EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico humano). En células normales solo se encuentran dos copias; sin embargo en algunas células cancerosas existen más copias del gen *her2* con la consecuente elevación en la producción de la proteína Her2.

La sobre-expresión de p185 se ha encontrado y relacionado con el 30% de los casos de cáncer de mama y otros tipos como: cáncer de próstata, cáncer de ovario, etc. El receptor fosforila río abajo otras proteínas, activa una variedad de cascadas de señalización incluyendo las vías PI3K/AKT (fosfatidilinositol-3 cinasa/PKB) y la vía Ras/MAPK. Esta regulación de señales en cascada promueve la supervivencia celular y su desregulación puede inducir el desarrollo tumoral y la metástasis.

La expresión de Her2/ErbB se ha relacionado con el cáncer de mama metastásico, aunque su expresión se ha demostrado de igual manera en otros tipos de cáncer como cáncer de próstata y cáncer de ovario. Nuestro grupo de trabajo ha demostrado la presencia y activación constitutiva del receptor Her2 en, las líneas celulares de carcinoma de cérvix CALO e INBL. Debido a lo anterior, analizamos la presencia de mutaciones en el gen *her2* que pudieran generar una activación constitutiva, específicamente en los exones 19 y 21 que se incluyen dentro del dominio tirosina cinasa de Her2, en los cuales se ha reportado la mayor cantidad de mutaciones en diversos tipos de cáncer.

Para obtener el DNA de las líneas celulares de carcinoma de cérvix CALO e INBL se utilizó papel FTA. Se tomaron dos círculos de 1mm de diámetro para realizar el PCR. Los productos del PCR, se secuenciaron y se llevó a cabo un análisis y comparación con la base de datos del Centro Nacional de Biotecnología e Información (NCBI). Los resultados muestran que no existen mutaciones en las regiones analizadas en los exones 19 y 21; sin embargo, en la muestra proveniente de la línea celular CALO correspondiente al exón 19, parece existir un cambio en el marco de lectura.

Lo anterior podría interpretarse como un evento favorable para generar posibles deleciones o inserciones que pudieran modificar la estructura, conformación y actividad del receptor Her2/ErbB2.

I. INTRODUCCIÓN

La presencia del virus del papiloma humano (VPH) y su relación con el cáncer cervical invasivo en la población mundial femenina alcanza cifras realmente importantes que van de 350 – 500 mil mujeres infectadas con el virus VPH y que presentan este tipo de cáncer, de los cuales 230 mil casos corresponden a fallecimientos a nivel mundial, convirtiéndose en la segunda causa de muerte en la población femenina global⁽¹⁻²⁾, donde el mayor número de casos reportados corresponde a países en vías de desarrollo, como sucede en los países que conforman América Latina^(1,2).

En América Latina las muertes relacionadas con VPH representan el 14% de los casos reportados por fallecimiento del total de todos los tipos de cáncer. En nuestro país, representa la segunda causa de muerte en mujeres entre los 25 a 45 años^(1,2).

La expresión y sobre expresión del receptor con actividad de tirosina cinasa Her2/ErbB2, juega un papel preponderante en múltiples procesos celulares, incluyendo la carcinogénesis. La característica oncogénica de Her2/ErbB2 se encuentra ligada a su habilidad para afectar a una variedad de rutas o mecanismos de control celular que derivan en la apoptosis⁽¹⁻³⁾.

El presente trabajo se centra en el análisis de la presencia de mutaciones en los exones 19 y 21 del receptor con actividad de tirosina cinasa Her2/ErbB2 en las líneas celulares de carcinoma de cérvix. Se ha reportado la presencia de estas mutaciones en casos de cáncer de mama donde se ha confirmado la expresión, sobre-expresión de Her2/ErbB2, así como su asociación con el desarrollo y progresión de tumores altamente invasivos.

III MARCO TEÓRICO

A. Visión general del cáncer

1. Cáncer

En un crecimiento tisular patológico originado por una proliferación continua de células anormales que produce una enfermedad con capacidad para producir sustancias con actividad biológica como citocinas (IL-2, IL-6), factores de crecimiento como el VEGF , que pueden actuar sobre un grupo de células, promoviendo su expansión local o por su potencial de invasión de estas mismas conduciendo a la destrucción de los tejidos adyacentes o a distancia. El cáncer, que puede originarse a partir de cualquier tipo de célula de los diferentes tejidos del organismo, no es una enfermedad única sino un conjunto de enfermedades con manifestaciones y curso clínico muy variables en función de la localización y de la célula de origen ⁽¹⁻³⁾.

2. Diferentes tipos de cáncer

Existen numerosos tipos de cánceres, entre los que destacan 3 subtipos principales. En primer lugar se encuentran los sarcomas, que proceden del tejido conjuntivo presente en los huesos, cartílagos, nervios, vasos sanguíneos, músculos y tejido adiposo. El segundo tipo lo constituyen los carcinomas que surgen en los tejidos epiteliales como la piel o las mucosas que tapizan las cavidades y órganos corporales como el sistema respiratorio o digestivo o en los tejidos glandulares de la mama y la próstata. Los carcinomas incluyen algunos de los cánceres más frecuentes como el cáncer de pulmón, el de colon o el de mama. Los carcinomas a su vez se subdividen en aquellos provenientes de células de tipo epitelial, aquellos que presentan una estructura glandular denominados adenocarcinomas, provenientes de células que constituyen el revestimiento interno de las glándulas de secreción externa. En el tercer subtipo se encuentran las leucemias y los linfomas, que incluyen los cánceres que se originan en los tejidos formadores de las células sanguíneas. Pueden producir una inflamación de los ganglios linfáticos (adenopatías), aumento de tamaño del bazo (esplenomegalia) o invasión y destrucción de la médula ósea, así como una producción excesiva de leucocitos o linfocitos inmaduros. El conjunto de características particulares y en virtud de las células de las que provienen son su clasificados para su estudio⁽²⁻⁴⁾.

Según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 2005 fallecieron a causa de cáncer 7,6 millones de personas en todo el mundo y se estima que unos 84 millones de personas morirán como consecuencia del cáncer en los próximos 10 años. El cáncer es la

segunda causa de muerte en los adultos en el mundo occidental, después de las enfermedades cardiovasculares, y es la principal causa de muerte por enfermedad (por detrás de los accidentes de cualquier tipo) en niños de 1 a 14 años. Existe una gran variabilidad en la incidencia de los distintos tipos de cáncer según el área geográfica. Estudios sobre poblaciones que han emigrado de un área geográfica a otra diferente sugieren que tales variaciones se deben más a diferencias en el estilo de vida que al origen étnico. Esto es comprensible, si se considera que la mayor parte de los cánceres se relacionan con factores ambientales más que con la herencia, pese a que ambos influyen.

Los cánceres que producen mayor mortalidad en Estados Unidos y en Europa son el cáncer de pulmón (primer lugar en los hombres), el cáncer de mama y de útero representa la segunda causa de muerte en las mujeres, el cáncer de próstata y de estómago son la segunda causa de fallecimiento en varones, el cáncer colo-rectal ocupa el cuarto lugar para ambos sexos. La suma total de los tipos de cáncer antes mencionados son responsables de más del 55% de todas las muertes por cáncer. Cada año se producen entre 2 y 3 millones de casos de cáncer de piel, de los cuales unos 130,000 se agravan en forma de melanoma maligno. En España, los cánceres más frecuentes son los del sistema respiratorio (pulmón) seguidos por los del estómago, próstata, colon y mama. En México dentro de la población femenina por cada 100,000 mujeres que presentan cáncer de mama fallecen 11.2; en cáncer cérvico uterino el número de fallecimientos por cada 100,000 que presentan este tipo de cáncer asciende a 9.9 ambos tipos de cáncer son los más frecuentes y de mayor importancia en la población femenina. En varones el cáncer de próstata se presenta como el más frecuente y de mayor relevancia⁽³⁻⁶⁾.

B. Cáncer cérvico uterino

A nivel mundial el virus de papiloma humano (VPH) se asocia a cáncer cervical invasor a más de 500 mil mujeres y 230 mil muertes en los países en vías de desarrollo. Es la segunda causa de muerte en la población femenina global. Causa 10 millones de displasias de cuello uterino de alto grado y 30 millones de bajo grado. Otros 300 millones lo padecen pero sin manifestaciones citológicas. En Estados Unidos aproximadamente 20 millones de personas están actualmente infectadas por el VPH. Se estima que al menos el 50% de las mujeres y hombres sexualmente activos contraerán la infección genital en algún momento de sus vidas; el 80 % de las mujeres la habrán contraído al llegar a los 50 años de edad; cerca de 6.2 millones de estadounidenses contraen una nueva infección genital del VPH cada año. En España se

presentan 2.000 casos de cáncer cérvico uterino por año, de los que 700 fallecen.

En Latinoamérica se presentan más de 77.000 casos de cáncer cervical anualmente (17% de todos los cánceres); 30.500 muertes anuales (14% de todos los fallecimientos por cáncer). Es la principal causa de mortalidad por cáncer en mujeres conjuntamente con el cáncer de mama (Organización Panamericana de Salud)^(4, 5).

En México, de la población femenina de 25 – 45 años de edad, la segunda causa de muerte la ocupa el cáncer cérvico uterino, cuya causa generalmente es la presencia del virus del papiloma humano (VPH)⁽¹⁻³⁾ y de otros factores no asociados al VPH. El virus VPH presenta diferentes variantes, las cuales se dividen en un grupo de alto riesgo y uno de bajo riesgo. Cabe destacar que aún cuando a nivel nacional el cáncer cérvico uterino ha sido señalado recientemente como la segunda causa de muerte después del cáncer de mama, esto de ninguna manera debe traducirse como una disminución de casos que presentan cáncer cérvico uterino⁽²⁻⁴⁾. Por otro lado, la carencia de: estudios epidemiológicos recientes, servicios médicos, campañas de prevención y difusión, son las causas por las que no se ha podido afrontar de manera directa y decisiva el problema.

En los países en vías de desarrollo se presenta la mayor concentración de casos observados anualmente en el mundo, y representan aproximadamente el 80%, de todos los casos reportados de HPV asociados a cáncer cervical, de los cuales cerca del 99.7% de los casos de cáncer de cuello uterino se encuentra vinculado a ciertos tipos del virus del papiloma humano tales como el VPH 16 (el de mayor porcentaje 50%), VPH 18 (12%), VPH 45(8%), VPH 31(5%)⁽¹⁻⁴⁾.

Cabe destacar que la sola presencia de este virus en cualquiera de las variantes señaladas anteriormente no constituye una causa suficiente para la aparición de cáncer de cérvix, se necesitan además otros factores de riesgo como son, tabaquismo, malos hábitos alimenticios, predisposición genética, entre otros ^(3 - 6).

1. Factores promotores de cáncer cérvico uterino

En la actualidad se reconoce un número amplio de factores o condiciones que pueden favorecer la infección por VPH y a su vez facilitar el desarrollo de cáncer cérvico-uterino. Dentro de estos se reconocen: el tener relaciones sexuales con varias parejas, el inicio de la actividad sexual a temprana edad, las relaciones sexuales con parejas de alto riesgo, el contagio de otro tipo de enfermedades de transmisión sexual como herpes, gonorrea, sífilis, clamidia; todos ellos incrementan el riesgo de infección por VPH con la posibilidad de desarrollar cáncer cérvico uterino. Así mismo, deben tomarse en cuenta otros eventos que influyen en el organismo que debiliten o comprometan el sistema inmunológico del mismo, tal como los trasplantes, la enfermedad de

Hodgkin's, así como los cambios fisiológicos que se originan por variaciones en los niveles hormonales, el uso algunos medicamentos de remplazo hormonal o por falta de nutrientes⁽²⁻⁵⁾.

Otras condiciones que influyen pueden ser el nivel socioeconómico bajo, ya que en muchas ocasiones carecen de acceso a información sobre métodos de prevención y del tratamiento oportuno, ambas son condiciones o elementos que posibilitan la entrada del VPH en una persona. Por último los factores que principalmente influyen en el pronóstico son el estadio, el volumen, el grado de tumor, el tipo histológico, la propagación linfática, así como la vascularización de la zona afectada ⁽⁵⁻⁷⁾.

2. Clasificación a partir de la fase clínica

Las etapas se definen según la clasificación de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO), tomadas de ^(5, 6)

3. Clasificación FIGO

Etapa I

La etapa I es el carcinoma estrictamente limitado al cérvix; no se debe tener en cuenta la extensión al cuerpo uterino.

Etapa IA:

Carcinomas invasivos sólo diagnosticados por microscopio. Todas las lesiones de gran magnitud aún con invasión superficial se consideran como cáncer en etapa IB. La invasión se limita a la invasión del estroma con una profundidad máxima de 5 mm y no más de 7 mm de ancho.

Etapa IA1:

Invasión medida del estroma de no más de 3 mm de profundidad y no más de 7 mm de diámetro.

Etapa IA2:

invasión medida del estroma de más de 3 mm pero no de más de 5 mm de profundidad y no más de 7 mm de diámetro.

Etapa IB: Lesiones clínicas limitadas al cuello uterino o lesiones pre-clínicas de mayor extensión que la etapa IA.

Etapa IB1: lesiones clínicas de no más de 4 cm de tamaño. Etapa IB2: lesiones clínicas de más de 4 cm de tamaño.

Etapa II

En la etapa II el carcinoma se extiende más allá del cérvix uterino, pero no se ha extendido a la pared pélvica. El carcinoma afecta la vagina, pero no llega al tercio inferior.

Etapa IIA: No hay complicación obvia del parametrio, dos tercios de la parte superior de la vagina se encuentran afectados.

Etapa IIB: Complicación obvia del parametrio, pero sin llegar a la pared pélvica lateral.

Etapa III

La etapa III implica que el carcinoma se ha extendido a la pared pélvica. Acorde al examen rectal, no hay espacio libre de cáncer entre el tumor y la pared pélvica. El tumor afecta el tercio inferior de la vagina. Se deben incluir todos los casos con hidronefrosis o con insuficiencia renal, a menos que se sepa que se deben a otras causas.

Etapa IIIA: sin extensión a la pared pélvica, pero sí al tercio inferior de la vagina.

Etapa IIIB: Extensión a la pared pélvica, hidronefrosis o insuficiencia renal.

Etapa IV

La etapa IV implica que el carcinoma se ha extendido más allá de la pelvis misma o ha afectado clínicamente la mucosa vesical o rectal.

Etapa IVA: propagación del tumor a órganos adyacentes a la pelvis.

Etapa IVB: propagación a órganos distantes.

*La profundidad de la invasión no debe ser mayor de 5 mm desde la base del epitelio, en la superficie o en las glándulas. La invasión del espacio vascular, ya sea venoso o linfático, no debe alterar la clasificación^(7, 8).

C. Receptores celulares

Dentro de los sistemas y mecanismos desarrollados por las células para llevar a cabo la comunicación y transmisión de información, se encuentra el que se realiza a través de moléculas cuyo objetivo final es producir cambios en el metabolismo acordes al estímulo que desencadena tal respuesta. Estos sistemas celulares de producción y reconocimiento de una señal extracelular son los llamados sistemas de transducción de señales.

Estos procesos de comunicación requieren básicamente de dos factores importantes como lo es la molécula o ligando y su receptor específico. En las células se reconocen dos clases de receptores, los de superficie o extracelulares y los intracelulares o citoplasmáticos.

Los receptores de superficie o extracelulares se subdividen en tres tipos: Los receptores asociados a canales iónicos, regulados básicamente por neurotransmisores, que generalmente actúan alterando la permeabilidad de la membrana plasmática.

Los receptores de superficie asociados a proteína G, con actividad GTPasa intrínseca.

Los receptores con actividad enzimática, asociados a proteínas con actividad tirosina cinasa y los receptores con actividad enzimática intrínseca.

1. Receptores con actividad tirosina cinasa, familia EGFR

Los sistemas celulares de producción y reconocimiento de una señal extracelular son los llamados sistemas de transducción de señales. Dentro de estos eventos, uno de los más importantes es la regulación mediante mecanismos de fosforilación (realizado por las proteínas con actividad tirosina cinasa) y desfosforilación (realizada por las fosfatasas). Algunas proteínas con actividad de tirosina cinasa pueden funcionar como receptores, se encargan de la transferencia de un grupo fosfato entre el ATP y una biomolécula susceptible a ser fosforilada, después de que se ha llevado a cabo la interacción receptor-ligando. Representa uno de los principales mecanismos de activación de transducción de señales, entre estos receptores se encuentran los factores de crecimiento, proliferación, diferenciación y apoptosis. Se ha relacionado la presencia de mutaciones en proteínas como la causa de muchas enfermedades como el cáncer, diabetes, entre otras^(6,7). En general, los receptores son glucoproteínas ancladas o embebidas en la membrana citoplasmática que interactúan con un ligando, y se inducen o reprimen por diferentes estímulos durante sus etapas de proliferación y diferenciación. Un receptor prototipo de la familia de receptores de tirosina cinasa es el Receptor para el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR), consta de un dominio extracelular amplio compuesto por cuatro subregiones, permanece cerrado o inactivo, está constituido por interacciones intramoleculares entre las subregiones II y IV, previene la extensión del dominio extracelular del receptor y evita la exposición de las sub-regiones II y IV que pudieran dar lugar a la formación de dímeros y al mismo tiempo la yuxtaposición de las subregiones I y III en el sitio de unión al ligando; un dominio o región transmembranal y un dominio intracelular yuxtapuesto con el dominio de tirosina cinasa y una región C-terminal de regulación (Fig. 1). La unión del ligando a su receptor activa la región con actividad tirosina cinasa localizado en el dominio citoplasmático. Las tirosinas fosforiladas de inmediato se vinculan con las moléculas efectoras, ancladas en la superficie interna de la membrana o con mediadores citosólicos⁽⁸⁾.

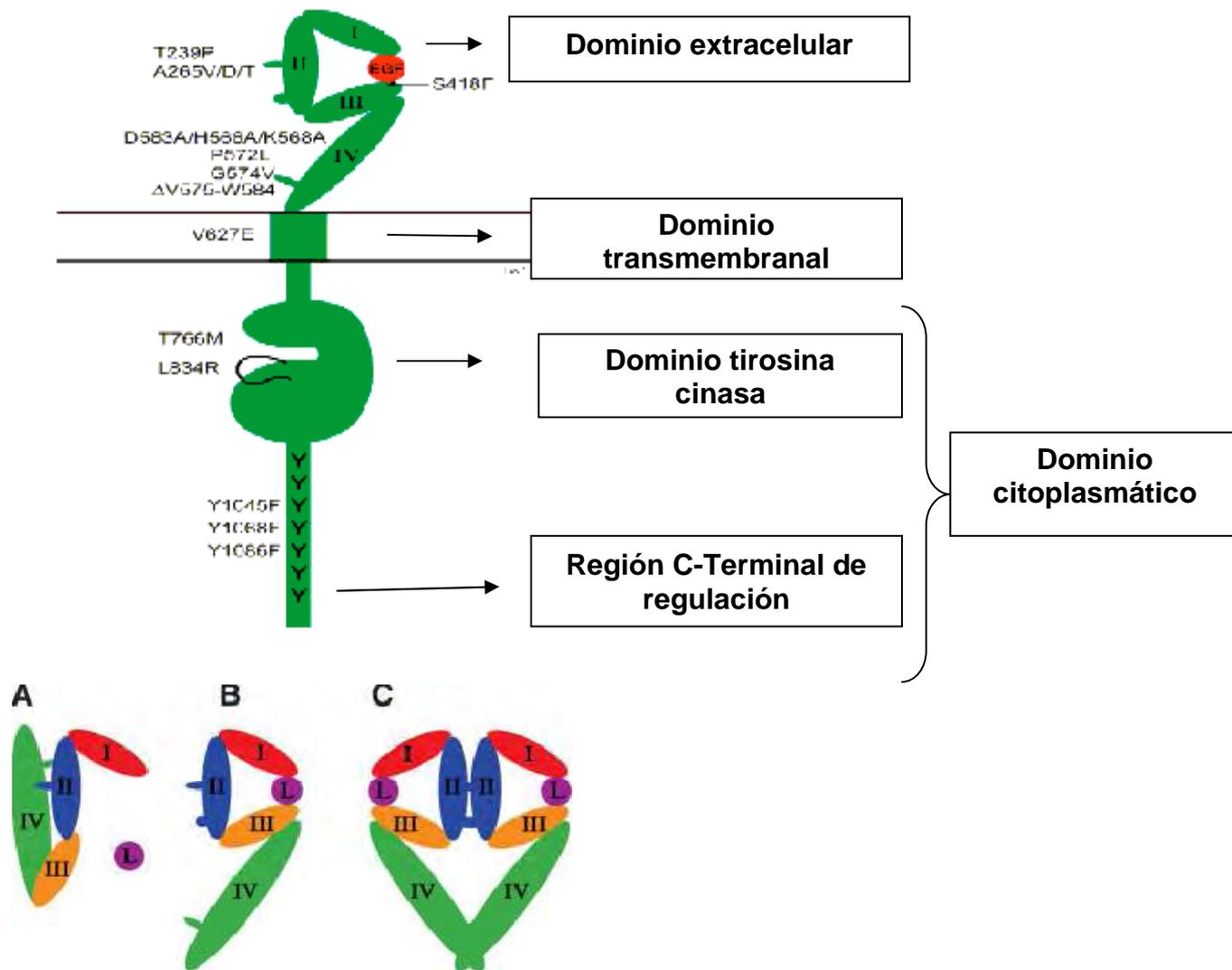


Fig. 1 Estructura general y disposición espacial de los dominios que conforman a cada uno de los miembros de la familia EGFR, y los distintos estados en los que pueden encontrarse los receptores EGFR, (A) representa el estado basal en ausencia de ligando, (B) muestra la unión del ligando a su receptor, (C) formación de dímeros, modificado de (9).

Los miembros de la familia EGFR poseen diferentes ligandos que inducen su activación, por ejemplo EGF y TGF- α muestran una alta afinidad por los receptores EbrB1/Her1, en la formación de dímeros el potencial transformante y la vía de transducción son diferentes y distintivas de cada uno (9,10).

La formación de dímeros robustece la transducción de señales, como sucede en la formación de los dímeros ErbB1 – ErbB1 si se compara con

el heterodímero ErbB1–ErbB2⁽⁹⁻¹¹⁾. Todos los miembros de la familia EGFR/ErbB tienen el potencial para estimular la cascada de señalización Raf-MEK-ERK ⁽¹¹⁾, otras uniones particulares como la fosfolipasa C α que se une a fosfotirosinas en ErbB1 lo que favorece la formación de diacilglicerol e inositol 1,4,5-trifosfato que son segundos mensajeros. La unión específica de la subunidad reguladora de la fosfatidilinositol-3 cinasa a fosfotirosinas en los receptores ErbB3 y ErbB4 conlleva a la activación de la enzima; la activación del fosfatidil inositol 3-fosfato activa a su vez a la proteína cinasa B o AKT⁽¹¹⁻¹³⁾.

La formación de heterodímeros entre los diferentes miembros de la familia ErbB/EGFR, incrementa la diversidad de reconocimiento de ligandos que individualmente no sería posible, ya que permite el reclutamiento de diferentes complementos o moléculas con capacidad de unión o reconocimiento a fosfotirosinas e incrementa ampliamente el repertorio de vías de señalización que podrían ser activadas por un solo receptor^(14,15). Las proteínas con dominios SH2, pueden formar enlaces con fosfotirosinas en las regiones C-terminal en el primer dominio y N-terminal en el segundo dominio⁽⁹⁻¹⁵⁾.

Existen algunas variaciones entre los miembros de la familia de EGFR/ErbB, Erb1 se compone de un dominio extracelular de unión a EGF, compuesto de 622 residuos, un segmento transmembranal de 23 residuos, y un dominio intracelular de 522 residuos con actividad de tirosina cinasa. Para el segundo miembro Her2/ErbB2, se desconoce hasta el momento su ligando, y tiende a formar heterodímeros en lugar de homodímeros; tales heterodímeros pueden unirse a factores de crecimiento cuya variedad propicia una amplia gama de tipos de cáncer como el cáncer de mama, cérvix, colón, endometrio, esofágico, de pulmón y de páncreas ^(10, 11, 15,16).

El tercer miembro de la familia, ErbB3/Her3, a pesar de presentar una gran homología en el dominio tirosina cinasa con los otros miembros de la familia no posee actividad de proteína cinasa, aún cuando si, presenta unión a ligando, por lo tanto requiere la formación de heterodímeros con los otros miembros de ErbB. ErbB3 se encuentra presente en casos de cáncer de mama, colon, próstata y estómago^(11, 15,17).

ErbB4, el último miembro de la familia, comparte prácticamente el 75% de los residuos que componen el dominio transmembranal con los otros miembros, un 70% en el dominio intracelular que son alrededor de 276 residuos y un 20% en la región C-terminal dentro del dominio catalítico ^(10,18).

ErbB4 también forma heterodímeros con los otros miembros de la familia ErbB, principalmente con ErbB1 y ErbB2⁽¹⁰⁾.

2. Her2/Neu/ErbB2

Características bioquímicas del receptor Her2

Se ha postulado que el dominio extracelular de los receptores EGFR, contiene elementos que inhiben la dimerización del receptor y por lo tanto, de la señalización; por lo que la remoción de estos elementos extracelulares permite la dimerización constitutiva y la señalización^(17, 19,20).

De igual forma, se ha señalado que los dominios transmembranal y citoplasmático son suficientes para la dimerización constitutiva del receptor y activación de la señalización, sin embargo, la existencia de un dominio extracelular favorece el proceso de señalización de una vía en particular^(12, 13, 20,21).

EL dominio extracelular de los miembros de la familia ErbB se compone de cuatro subregiones, las subregiones II y IV son ricas en cisteínas y cada una contiene cerca de 10 puentes de disulfuro^(21,22).

Los factores EGF y TGF α solo pueden unirse a un solo receptor por vez, es decir un ligando se puede unir a un solo receptor, no se unen a dos receptores al mismo tiempo, la subregión II es el principal componente en la unión de dos receptores, a manera de un brazo extendido compuesto por 242-259 residuos. EGF y TGF α interactúan con los residuos estructurales del dominio I y con los grupos R de los aminoácidos de la subregión III, los residuos de Arg41 en EGF y Arg42 en TGF α , altamente conservados, interactúan con Asp355 del receptor y Leu47 en EGF y Leu48 en TGF α se proyectan formando un sitio hidrofóbico en la superficie de la subregión III^(12, 20,21).

La unión de los ligandos a su respectivo receptor, altera la disposición de los dominios II y III del receptor pero no la orientación relativa de las subregiones I y II. En el receptor que no se encuentran activadas las subregiones II y IV, se hallan unidas y el brazo de dimerización se encuentra plegado impidiendo la interacción con un receptor adyacente, inclusive, las subregiones de unión a ligando I y III se localizan muy distantes para que un solo ligando pueda interactuar con ambas simultáneamente. Para que la activación pueda llevarse a cabo, es decir para que el ligando pueda unirse a su receptor se requiere de una rotación de 130° de las subregiones I y III, este rearrreglo permite la conformación extendida, dado que rompe las uniones intramoleculares de las subregiones II/IV, facilitando la participación del brazo extendido en la formación de dímeros a partir de interacciones intramoleculares. Se estima que un 95% de los receptores permanece en su forma inactiva contra un 5% que presenta una forma activa dependiendo de la presencia de ligando, lo que origina una baja o una alta afinidad del receptor por su ligando^(9,22,23). Probablemente la forma

o estado de baja afinidad está asociada al arreglo en que se encuentran las subregiones I y III^(9 - 25).

Estructura de la proteína Her2

El receptor Her2/Neu (ErbB2) es un miembro de la familia EGFR de receptores transmembranales con actividad intrínseca de tirosina cinasa, la cual incluye también a los receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR ó ErbB1), Her 3 ó ErbB3 y Her 4 ó ErbB4(Fig. 1)^(9, 26 - 31).

Estructuralmente hablando, el receptor Her2 esta constituido por tres dominios: el dominio extracelular dividido en subregiones formadas por 632 aminoácidos; de manera particular la conformación del dominio extracelular no es propicia para formar un sitio de unión al ligando como sucede en los demás miembros de la familia EGFR. Esto se puede explicar mediante análisis por cristalografía, ya que estudios realizados a estructuras cristalinas del receptor Her2 muestran , una variación en el arreglo de las subregiones III y IV, donde se aprecia una relación de interdominio que asemeja un estado de activación similar al que presentan otros miembros de la familia EGFR cuando se unen a su ligando respectivo. Probablemente esto se debe a que no se conservan dos regiones clave en la subregión IV, en donde los residuos de contacto Gly563, His565 presentes en Her3 se remplazan por residuos de Pro y Phe respectivamente en Her2, lo cual puede explicar la ausencia de región de contacto de las subregiones II y IV y la interfase I y III favorecida por la existencia de grupos de residuos hidrofóbicos rodeados por contactos hidrofílicos que inducen una conformación más estable. Todos estos cambios perfilan el funcionamiento de ErbB/HER2 como receptor cooperador con otros miembros de la familia de receptores que si poseen ligados propios, por lo que Her2/ErbB2, sería un receptor con actividad constitutiva por no requerir la unión directa a un ligando específico^(9,23,24).

La región transmembranal se compone de 22 aminoácidos y el dominio intracelular se conforma por 580 aminoácidos^(9, 24 -30). La región citoplasmática está compuesta por 580 aminoácidos, que conforman una estructura bilobulada con actividad de cinasa y el asa de activación.

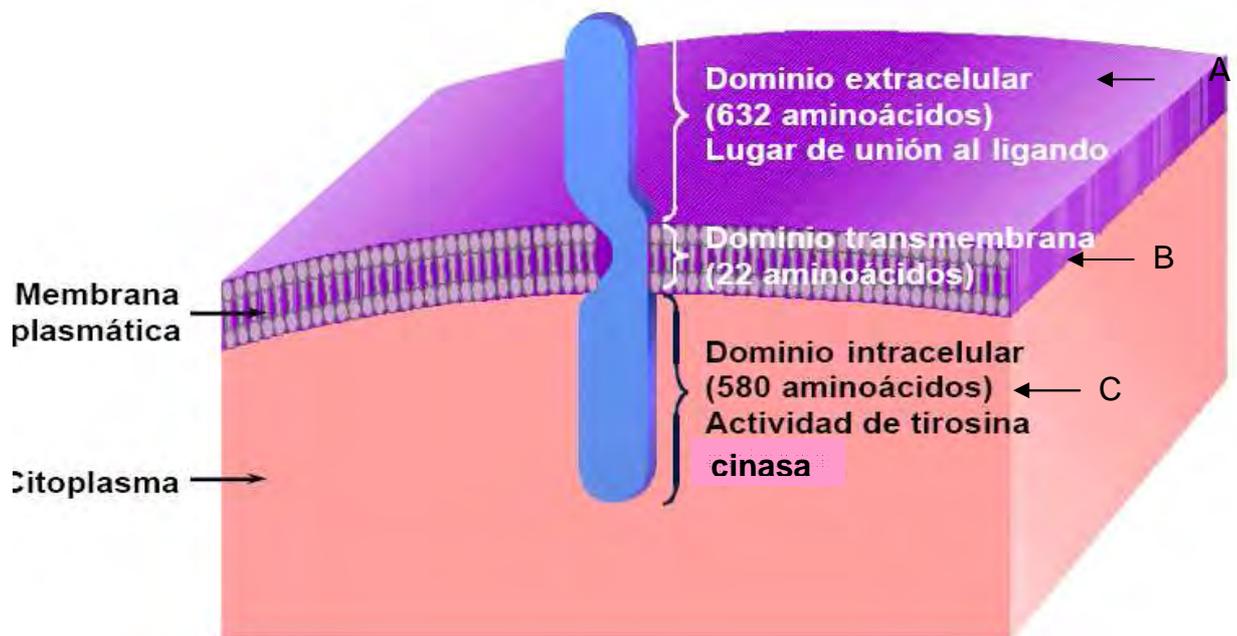


Fig. 2 Estructura del receptor Her2/Neu y conformación de los tres dominios: dominio extracelular o de unión a ligando(A), dominio transmembranal o de fijación a la membrana (B) y dominio intracelular con actividad tirosina cinasa(C), modificado de 26.

Dominio tirosina cinasa

El dominio tirosina cinasa posee una estructura de característica bilobulada en toda la familia de receptores ErbB/EGFR, donde los residuos 685-769 comprenden el lóbulo amino-terminal con actividad tirosina cinasa y los residuos 773-953 componen el lóbulo mayor (carboxi-terminal). El lóbulo menor tiene un arreglo de láminas β en antiparalelo, con regiones ricas en glicina y el asa de unión a ATP comprendida entre los residuos 695-700^(12, 31, 35,36).

En el del lóbulo mayor (carboxi-terminal) predomina la estructura de α -hélice, este lóbulo es el responsable de la unión del péptido o la proteína sustrato. Al igual que en otras proteínas con actividad tirosina cinasa, el sitio catalítico se encuentra en la hendidura formada por los dos lóbulos; la secuencia compuesta por Leu-Val-Ile (955-957) del lóbulo carboxi-terminal y la región C-Terminal de regulación juegan un papel importante en la dimerización de receptor independiente de la unión a ligando, ambas secuencias interactúan con el sitio catalítico y el lóbulo mayor del dominio cinasa del otro receptor (23,37).

Hasta el momento se han descrito doce subdominios que constituyen el sitio catalítico de proteínas con actividad tirosina cinasa, de ellos, el motivo compuesto por los aminoácidos K/D/D participa de manera importante en las propiedades catalíticas del receptor de EGF (11,12, 23).

Por ejemplo, el aminoácido Lys-721 del receptor EGFR, representa un residuo invariable en la familia de receptores ErbB/EGFR, que tiende a formar iones pares con los fosfatos β y γ del ATP. Por otro lado, el aminoácido Asp-813 es la base de la actividad catalítica que tiene como función orientar el grupo tirosil de la proteína sustrato, de tal forma que favorece la extracción de un protón de la tirosina, posibilitando así el ataque nucleofílico del fósforo- γ del complejo Mg-ATP. El residuo Asp-831 es el primer aminoácido del asa de activación que corresponde a una parte del lóbulo mayor, el Asp-831 se une al Mg^2 que coordina los grupos fosfatos β y γ del ATP. Para la familia de tirosina cinasas ErbB, el sitio de transferencia de grupo fosfato en el asa catalítica se compone de los aminoácidos HRDLAARN para Her1 (His-811- Asn 818), para Her2 (822-829) y en Her4(816-823), en contraste para Her3/ErbB3, que tiene una secuencia HRNLAARN(813 -820) donde la base catalítica Aspartato se convierte en Aspargina (N815) dando como resultado la nulidad catalítica de la cinasa (11,12,23,37).

Bajo condiciones fisiológicas el ligando se une a su receptor, lo que induce la formación de homodímeros o heterodímeros, que a su vez permiten la activación del dominio citoplasmático y su correspondiente subregión con actividad tirosina cinasa(23,24,37). La dimerización resulta en una auto fosforilación o una transfosforilación de los residuos de tirosina en el segmento C-terminal, que funcionan como sitios de anclaje para las moléculas de señalización que presenten dominios SH2 y PTB(23,38).

La activación de los dominios de unión a ligando en la familia ErbB, induce cambios conformacionales en el dominio citoplasmático que conllevan a la activación del sitio catalítico.

La transferencia del γ -fosfato del ATP a los residuos de tirosina blanco incluye la participación de varias asas que comprenden el dominio catalítico de tirosina cinasa y su correcta conformación, por ejemplo, para Her2 los residuos 844-850 comprometen el asa de activación C-asa, que es crucial para la transferencia del grupo fosforil. El asa α C-

hélice formada por los residuos 761-775 y el asa de unión a nucleótido ó N-asa, residuos 727-

732, son responsables de la coordinación del ATP y el sustrato de tirosina blanco^(9,11,38). El asa de activación ó A-asa que comprende los residuos 863-884 regula la activación de la tirosina cinasa, al cambiar su conformación a una forma extendida y descubriendo el asa catalítica ó C-asa, permite el acceso del sustrato blanco a la maquinaria catalítica y posibilita la interacción de la región rica en tirosinas del sustrato con la región del asa catalítica ^(11, 23,39).

En muchas proteínas cinasas el asa de activación se encuentra en forma compacta debido a la existencia de puentes de hidrógeno que se forman entre el grupo hidroxilo de una tirosina no fosforilada con un residuo de aspartato del sitio catalítico, lo que impide la unión de sustratos al sitio catalítico de la proteína, solo hasta que la tirosina se fosforila se puede activar, el caso contrario se presenta en los receptores de EGF ^(11,39).

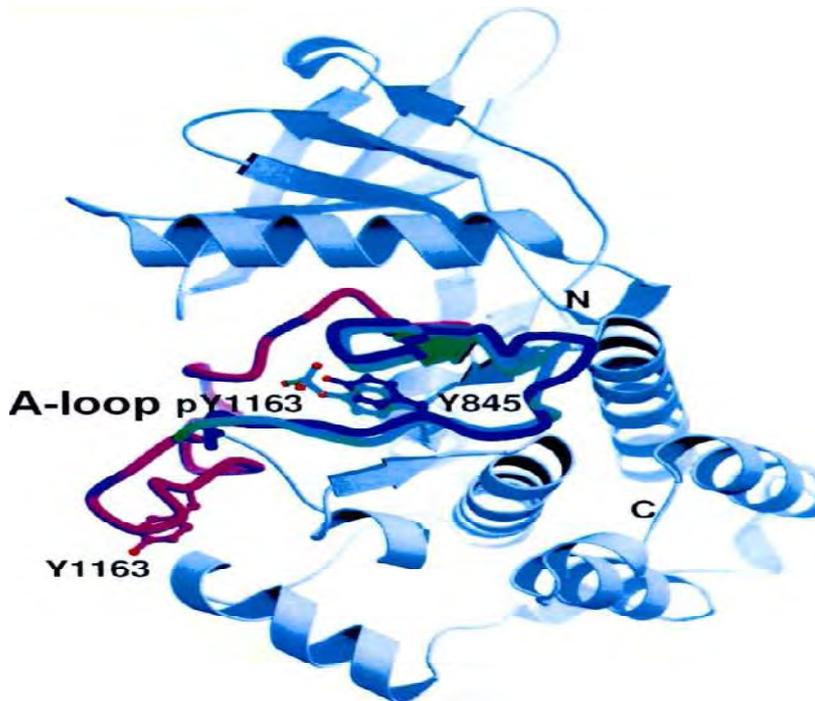


Fig. 3 Estructura bilobulada del dominio tirosina cinasa del receptor ErbB, modificado de 11.

Mutaciones en el dominio citoplasmático

Recientemente se han detectado mutaciones en el dominio cinasa en los receptores de la familia EGFR que están presentes de un 10 – 30% en carcinoma de pulmón, donde de manera recurrente se encuentran mutaciones sin sentido en el residuo L834R y L855R y algunas deleciones en el marco de lectura correspondientes al sitio catalítico bilobulado^(9, 23,40).

Se ha propuesto que estas mutaciones pudieran incrementar la señalización de EGFR para que de manera selectiva active señales que inducen la sobrevivencia río abajo, de hecho, estas mutaciones incrementan su actividad de cinasa^(9, 11, 41,42) y favorecen la fosforilación de AKT y STAT5^(11, 43,44).

Algunas de estas mutaciones parecen favorecer la conformación activa del receptor y en algunos casos se presentan en los receptores que no dependen de la unión al ligando^(9, 43,44). En ErbB2/HER2 se han detectado mutaciones en diferentes tipos de cáncer ^(43,44), muchas de ellas se encuentran localizadas en la región de unión al ATP o en la cercanía del sitio activo del dominio cinasa, lo cual sugiere que estas mutaciones incrementan la actividad de tirosina cinasa del receptor. La inserción en el dominio cinasa en ErbB (Ins776VMA) que se encuentra en muestras de carcinoma de pulmón, propicia un incremento en la actividad tirosina cinasa, suprime la apoptosis y posee una actividad transformante ^(9, 11, 46,47).

Mutaciones en los sitios de fosforilación.

Las mutaciones en los receptores EGFR y ErbB pueden alterar la capacidad de señalización, la fosforilación de residuos de tirosina en el dominio citoplasmático de los receptores ErbB puede crear sitios de adhesión para proteínas con dominios SH2 o PTB que participan en las vías de señalización, de igual forma, la supresión de estos sitios conduce a la incapacidad de unión de las proteínas al receptor^(9,12, 47).

Por ejemplo, la fosforilación en la Tyr1045 en el receptor EGFR permite la interacción de c-Cbl lo que origina la ubiquitinación e inhibición de EGFR, una mutación artificial en el mismo sitio da como resultado una desregulación de EGFR y un incremento en la señalización del receptor EGFR^(41,46,49), probablemente una sustitución de una fosfotirosina en el dominio citoplasmático por un glutamato o un aspartato podría favorecer una activación constitutiva de las vías de señalización y los eventos río abajo^(40,50,51).

La activación de HER2/Neu

La unión de ligandos (como el EGF o la heregulina) al ectodominio de EGFR, ErbB3 y ErbB4 resulta en la formación de heterodímeros, catalíticamente activos, en los cuales Her2 se recluta preferentemente como contraparte. Aunque Her2 no puede unirse directamente a los ligandos para el receptor ErbB, su actividad se puede amplificar por la heterodimerización con otro miembro de la familia que se haya unido al ligando y/o por estabilización ó reciclado de receptores^(22,26, 28).

La activación de la red ErbB, conlleva a la autofosforilación en los dominios de tirosinas y el reclutamiento en estos sitios de anclaje de moléculas transductoras de señales citoplasmáticas que regulan procesos celulares tales como: proliferación, diferenciación, motilidad, adhesión, protección de la apoptosis, y transformación, señales que se dirigen al núcleo de la célula^(27-29,49).

De manera particular, la activación de Her2 vía la dimerización del receptor conduce a la fosforilación de residuos de tirosina en la región carboxi-terminal del dominio con actividad cinasa. La fosforilación de estos residuos de tirosina funcionan como sitios de anclaje para las cinasas de la familia Src con dominios SH2 y para proteínas con dominio PTB de unión a tirosina que involucran a proteínas inmersas en los procesos de transducción, proliferación, transformación, o señales de diferenciación hacia el núcleo celular; ejemplos de éstas son la asociación de moléculas intracelulares como Crk, Grb7, PLC1 y c-Src que se activan por Her2, así como otro tipo de proteínas adaptadoras asociadas a Her2 que están implicadas en la regulación o modulación de Ras por la formación del complejo Ras-GTP a través de las proteínas de intercambio SOS, Shc, Grb2 y Nck^(9,27,47).

Los transductores de señales citoplasmáticos activados en esta red incluyen las proteínas cinasas de tirosina como cinasas Jak; las proteínas G pequeñas como Ras y su efector Raf, las cinasas activadas por mitógenos como las MAP cinasas y cinasas de fosfatidilinositoles como PI3K^(12, 30, 31).

El receptor transmembranal Her2, forma dímeros y heterodímeros con otros miembros de la familia de receptores EFGR, lo que origina señales antiapoptóticas al interior del núcleo celular (Fig. 4).

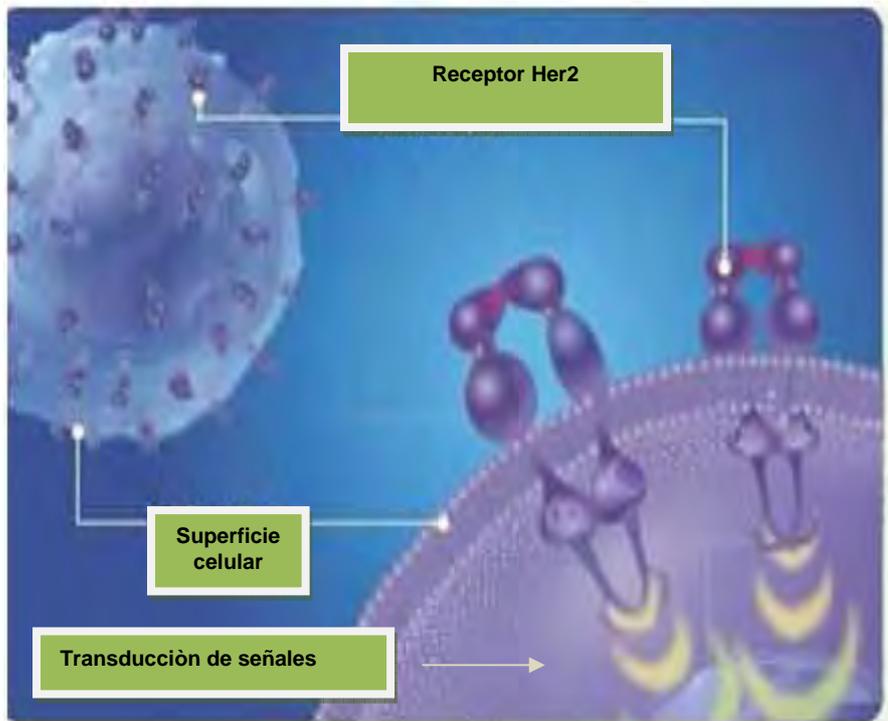


Fig.4 Diagrama de señalización del receptor Her2 a partir de la formación de heterodímeros (modificado de 14).

Her2 en cáncer de mama

La amplificación de Her2 representa una de las anomalías genéticas presentes en las muestras de tejido en mama, es responsable de la progresión de epitelios normales de mama, hacia células cancerosas. Existen reportes de la presencia de Her2 en carcinomas de mama, se presentan particularmente en tumores agresivos con un marcado incremento en la proliferación y en el potencial metastásico ⁽³⁷⁾. Aún cuando la sobreexpresión de Her2 no es suficiente para inducir la transformación, se ha encontrado al mismo tiempo la vía AKT activada por mutaciones en PI3K⁽³³⁾ en estudios realizados en líneas celulares MCF-7 y T47D que muestran la activación de la MAPcinasa(ERK) y la cinasa C-Jun(SAPK) que se ven favorecidas por la sobre-expresión de Her2⁽³³⁾.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El receptor de tirosina cinasa Her2/Neu, juega un papel preponderante en múltiples procesos celulares, incluyendo la carcinogénesis⁽¹⁵⁻¹⁷⁾. La característica oncogénica de Her2/Neu se encuentra ligada a su habilidad para afectar a una variedad de rutas o mecanismos de control celular que derivan en la apoptosis, creando, de esta manera un ambiente anti-apoptosis en las células que presentan una sobre-expresión de esta proteína⁽¹⁸⁻²¹⁾.

El status de sobre-expresión de Her2 es predictivo para la respuesta o resistencia a diferentes terapias endócrinas o quimioterapéuticas, lo que permite una mejor selección de las mismas, de aquí la importancia de una detección precisa^(20- 23).

Estudios realizados con antelación por nuestro grupo de trabajo han demostrado que la proteína Her2, que es miembro de la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano EGFR, se encuentra fosforilada de manera constitutiva en las líneas celulares de carcinoma de cérvix CALO e INBL⁽⁹⁾ y su actividad se bloquea por el inhibidor B42^(47,48).

Existen diferentes trabajos experimentales encaminados al estudio de mutaciones dentro de la región citoplasmática del receptor EGFR, específicamente en la subregión con actividad cinasa en el carcinoma de pulmón, donde se ha encontrado una correlación clínica de la respuesta selectiva con moléculas pequeñas de inhibidores de la región cinasa de EGFR (Iressa; gefitinib y Tacerva; erlotinib). En estos casos las mutaciones recurrentes, como la mutación sin sentido L834R o L858R y pequeños cambios en el marco de lectura como deleciones dentro del sitio catalítico de EGFR, se asocian con un incremento en la sensibilidad a medicamentos como erlotinib y gefitinib. Se ha propuesto que estas mutaciones sean la causa de un incremento en la señalización de EGFR que activa de manera selectiva diferentes vías de señalización. Estas mutaciones generan un incremento en la actividad cinasa del receptor EGFR aunado a la fosforilación de la vía PI3K, AKT y STAT5. Consecuentemente, un bloqueo en la señalización de EGFR en este tipo de células a través de inhibidores de actividad cinasa conlleva a la muerte de las células malignas y la disminución del tumor⁽⁹⁾.

El presente trabajo se centra en la búsqueda de mutaciones dentro de la región catalítica del receptor Her2 que favorezcan su activación constitutiva, para determinar si estas mutaciones se pueden utilizar como marcadores que puedan predecir el posible desarrollo de un tumor y en el caso de pacientes con cáncer de cervix, una selección específica del tratamiento más adecuado para cada individuo.

La detección temprana e identificación de las mutaciones más comunes en los exones 19 y 21 del receptor Her2, que concentran el

mayor número de mutaciones (hotspots) y que son parte del dominio tirosina de Her2, permitirá determinar si existe una mayor probabilidad del desarrollo de cáncer altamente invasivo. Esto representaría un apoyo en el diagnóstico preventivo y su respectivo tratamiento a través de la proteína Her2^(25 - 27,56).

V. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Analizar la presencia de mutaciones en el dominio de tirosina cinasa del receptor HER2/Neu en células de carcinoma de cérvix.

OBJETIVOS PARTICULARES:

Establecer las condiciones experimentales para detectar las mutaciones mediante PCR - secuenciación.

Determinar si se presentan mutaciones en los exones 19 y 21 en el receptor con actividad de tirosina cinasa HER2/Neu, en las líneas celulares de carcinoma de cérvix CALO e INBL.

VI. HIPÓTESIS:

Una amplia variedad de reportes relacionados principalmente con cáncer de mama describen mutaciones en los exones, 19, 21, como posibles responsables de la actividad incrementada y de la sobreexpresión de Her2^(11, 13, 17, 20, 57,58).

Por lo anterior inferimos que la molécula Her2 que se expresa en las líneas de carcinoma de cérvix CALO e INBL presenta mutaciones en los exones 19 y 21, las cuales favorecen su fosforilación constitutiva y por tanto una activación permanente.

VII. METODOLOGÍA:

Cultivo celular

El material biológico consistió en células de las líneas celulares de carcinoma de cérvix CALO (estadio clínico IIIB) e INBL (estadio clínico IVB) obtenidas a partir de biopsias de pacientes mexicanas. Estas células permanecen criopreservadas en la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer de la FES Zaragoza UNAM.

Las células CALO e INBL se cultivaron en medio RPMI-1640 (Microlab, México) adicionado con 10% suero fetal de bovino previamente desactivado (Invitrogen USA.), Todos los cultivos se mantuvieron en incubadora (Sanyo Electric Co; Ltd. Moriguuchi City, Osaka Japón, MCO-17AC, Inc. USA.) en un ambiente al 5% de CO₂, 37°C y humedad saturada en botellas de cultivo de 75cm² (NUNC, Serving Life Science).

Resiembra

Esta se realizó cada tercer día con una inspección previa utilizando un microscopio invertido (Micro Star, American Optical) para asegurar el estado y proliferación celular de cada línea, determinando de esta forma si se requería solamente el retiro del medio y adición de medio fresco o la resiembra. Para esto se utilizó solución verseno para despegar las células adheridas a la botella de cultivo respectiva, las células se centrifugaron a (5000rev/5min), se retiró el sobrenadante y se agregaron 10 mL de medio RPMI con suero fetal bovino al 10%.

Conteo celular

Para realizar el conteo de células de cada línea, se procedió a retirar el medio contenido de cada botella de cultivo, agregando 7mL de solución verseno por cada botella de cultivo colocándolas dentro de la incubadora por 5 minutos para despegar las células. Después, se procedió a retirar la solución verseno-células se depositó en tubos de plástico de 50mL se agregaron 10mL de medio RPMI sin suero, se centrifugó a 3000rpm/5min; se retiró el sobrenadante y se agregó 1mL de medio de cultivo con suero al 10% se resuspendió el botón celular de cada línea. Por último, se tomaron 20µL de la solución resuspendida y se colocaron en una cámara de Neubauer para el conteo celular utilizando un microscopio óptico (Leica DME).

Extracción de DNA

Una vez realizado el conteo celular, se procedió a tomar la alícuota de 3×10^6 células, se centrifugó y se retiró el sobrenadante. Posteriormente se realizaron lavados consecutivos de los botones celulares con 1mL de solución de PBS, se centrifugó y se retiró el sobrenadante. Se agregaron 100 µL de solución de PBS a cada botón se resuspendió y se depositó

cada muestra en una tarjeta FTA (Whatman, Promega) y se dejó secar a temperatura ambiente por tres horas.

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

Reacción de polimerasa en cadena (PCR)

Se utilizó 1 círculo de papel FTA con DNA para realizar el PCR, con las siguientes condiciones:

Mezcla de reacción

Volumen total 20µL	STOCK	Volumen final
Amortiguador de PCR	10x	3 µL(S/C)
Cloruro de Magnesio	25 mM	2.5 µL
dNTPs	5 mM	0.8µL
Oligo de interés	20 nM	1µL
Enzima Taq	5 U/mL	0.2µL
Agua libre de RNAsas		11.5µL
DNA	1	1

CONDICIONES (30 CICLOS)		
	Temperatura (°C)	Tiempo (min.)
1	95	5
2	58	1
3	72	1
4	95	1
5	29 veces del paso del paso 2 al paso 4	
6	58	2
7	72	7
8	20	60

Tabla 1 Termociclador M J Research PTC – 2000

Para llevar a cabo el PCR se utilizaron los siguientes oligos:

HER 19

R (AAG AGA GAC CAG AGC CCA GAC CTG)

F (TGG AGG ACA AGT AAT GAT CTC CTG G)

HER 21

R (CCA, CTC, AGA, GTT, CTC, CCA, TGG)
F (GGT, GAG, TCT, CAA, GAG, GGT, ACC)

β - Actina

R (GGG, TCA, GAA, GGA, TTC, CTA, TG)
F (GGT, CTC, AAA, CAT, GAT, CTG, GG)

Electroforesis de los productos de PCR

Para analizar los productos de PCR y detectar los resultados por medio de electroforesis, se preparo un gel de agarosa al 1.5% con TBE 1X en 100ml de agua destilada, utilizando un horno de microondas (Panasonic modelo NN-76187) para la mejor disolución de la agarosa, se dejo reposar a temperatura ambiente por 20min y se adicionaron 30 μ L de bromuro de etidio al 10%. Posteriormente se realizó el vaciado de la solución de agarosa en la cámara de electroforesis colocando el separador de carriles o peine, eliminando cualquier formación de burbujas.

Se adicionaron 8 μ L de cada producto de PCR por carril, dejando un pozo para el marcador de peso molecular y otro pozo para el control de carga (β - Actina). Se aplico una corriente de 90milivolts por 2 horas.

Por último, se coloco el gel en el equipo analizador de imágenes (UV Transilluminator UVP Biolmaging Systems GDS – 8000) utilizando el software del equipo para obtener las imágenes respectivas.

Detección de mutaciones

La detección de mutaciones se realizo mediante secuenciación de los productos de PCR obtenidos, en un secuenciador automatizado ABI-3730 (Applied Biosystems, USA se utilizó el kit para secuenciación Big Dye v3.1 Cycle sequencing Applied Biosystems. Para realizar la secuenciación se uso el método por terminación de cadena, el cual se llevo a cabo en el Laboratorio de Genética Evolutiva, Centro de Investigaciones Genómicas de la UNAM, Cuernavaca Morelos y en la FES Iztacala UNAM con un secuenciador automatizado ABI-3100 (Applied Biosystems, USA).

Se realizó una comparación de los resultados de secuenciación de los productos de PCR obtenidos con las secuencias de los exones 19 y 21 del receptor Her2 que se encuentran reportadas en la base de datos NCBI, para determinar la presencia de mutaciones.

A. Material y Equipo

Micropipetas

Vórtex

Termociclador MJ Research PTC – 200 Peltier thermal Cycler)

Tubos Eppendorf (libres de DNAsas y RNAsas)

Puntas para pipeta estériles (libre de DNAsas y RNAsas)

Incubadora de CO₂ (Sanyo Electric Co.,Ltd. MCO-17AC)

Campana de flujo laminar

Equipo Milli-Q (Milli – Q academia Cat. No QGARD00R1)

Microcentrífuga (Eppendorf Centrifuge 5415 C)

Analizador de imágenes (UV Transilluminator UVP Biolmaging Systems

GDS – 8000, Camera kit NTSC lents 8 – 48)

Horno de microondas (Panasonic modelo NN-76187)

Reactivos

Medio RPMI (Micro LAB México)

Buffer de lisis FTA (FTA Purification Reagent Cat No WB120204) Whatman.

Soporte FTA (FTA Micro Card Cat No WB120210) Whatman.

Horadador (Harris Micro-Punch UNI-CORE 1.2mm) Whatman.

Suero fetal bovino (Invitrogen) RPMI 1640

DNA de líneas celulares CALO e INBL

Kit Taq polimerasa (Fermentas)

Agua estéril calidad Millipore

Oligos (Invitrogen)

Material biológico

Línea celular de carcinoma de cérvix CALO, estadio IIIB

Línea celular de carcinoma de cérvix INBL, estadio IVB

VIII. RESULTADOS

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

Para comprobar la presencia de mutaciones en los exones 19 y 21 de la proteína Her2, se obtuvieron los productos de PCR utilizando los oligos reportados en la literatura ⁽³⁰⁾; y se mandaron a secuenciar los productos de PCR.

Se establecieron las condiciones experimentales para obtener los productos de PCR con base a la información proporcionada por el fabricante, tal como se muestra en la tabla 2. Posteriormente se realizaron algunas modificaciones hasta que se establecieron las concentraciones de los reactivos tales como: 0.21 μ L de enzima (Fermentas), 2.0 μ L de dNTP's (25Mm), 2.5 μ L de MgCl₂ (25Mm) que representaron las condiciones óptimas para la amplificación de los productos de PCR, (tabla 3).

Mezcla de Reacción

Volumen total 20 μ L	STOCK	Volumen final
Amortiguador de PCR	10x	3 μ L(S/C)
Cloruro de Magnesio	25 mM	3.0 μ L
dNTPs	5 mM	0.8 μ L
Oligo de interés	20 nM	1 μ L
Enzima Taq	5 U/mL	0.2 μ L
Agua libre de RNAsas		12.0 μ L
DNA(círculo FTA)	1	1

CONDICIONES (30 CICLOS)		
	Temperatura (°C)	Tiempo (min.)
1	95	5
2	58	1
3	72	1
4	95	1
5	29 veces del paso 2 al paso 4	
6	58	2
7	72	7
8	20	60

Tabla 2. Mezcla de reacción y condiciones iniciales para el PCR.

Mezcla de Reacción

Volumen total 20 μ L	STOCK	Volumen final
Amortiguador de PCR	10x	3 μ L(S/C)
Cloruro de Magnesio	25 mM	2.5 μ L
dNTPs	5 mM	0.9 μ L
Oligo de interés	20 nM	1 μ L
Enzima Taq	5 U/mL	0.2 μ L
Agua libre de RNAsas		12.2 μ L
DNA(círculo FTA)	1	1

CONDICIONES (30 CICLOS)		
	Temperatura (°C)	Tiempo (min.)
1	95	5
2	58	1
3	72	1
4	95	1
5	29 veces del paso del paso 2 al paso 4	
6	58	2
7	72	7
8	20	60

Tabla 3. Condiciones optimas para la amplificación y obtención de productos de PCR en el laboratorio.

Secuenciación

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

Cuando se estableció la pureza de los productos, se clasificaron como: B05, B08, B09 para la línea celular INBL y B06, B07 para la línea celular CALO para determinar mutaciones en el exón 21.

Se enviaron para obtener la secuencia en un secuenciador automatizado ABI-3730 (Applied Biosystems, USA utilizando el kit para secuenciación Big Dye v3.1 Cycle sequencing Applied Biosystems) en el Instituto de Ciencias Genómicas, UNAM, Cuernavaca Morelos.

Los resultados obtenidos después de la secuenciación para los fragmentos correspondientes al exón 21, muestran la secuencia esperada al compararlas con las secuencias ya descritas en las bases de datos ⁽⁵⁵⁾.

Aún cuando se observa un corrimiento en el marco de lectura de la muestra B06 correspondiente a la línea celular CALO, no se pudo determinar la presencia de mutaciones en la región analizada del exón 21, figuras 5,6 y 7 respectivamente (tabla 12).

Los productos de PCR para Her 2 exón 19 fueron: M1 para la línea CALO y M2 para la línea INBL, éstas muestras se procesaron en un secuenciador automatizado ABI-3100 (Applied Biosystems, USA) utilizando el kit para secuenciación Big Dye v3.1 Cycle sequencing Applied Biosystems en la FES Iztacala.

Cromatogramas HER2 21

Línea celular INBL

Query= B05_F05.fasta.screen.Contig1

>ref|NM_001005862.1| Homo sapiens v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog
2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)
(ERBB2), transcript variant 2

Query: 290aggggatgagctacctggaggatgtgctggctcgtagacagggacttggccgctcggaacg
|||||

Sbjct 2922aggggatgagctacctggaggatgtgctggctcgtagacagggacttggccgctcggaacg

Query:1350tgctgggtcaagagtccaaccatgtcaaaattacagacttcgggctggctcggtgctgg
|||||

Sbjct:2982tgctgggtcaagagtccaaccatgtcaaaattacagacttcgggctggctcggtgctgg

Query: 1410 acattgacgagacagagtacatgcagatgggggcaaggt
|||||

Sbjct: 3042 acattgacgagacagagtacatgcagatgggggcaaggt

Tabla 4. Comparación de secuencia, muestra B05(Query) y la secuencia obtenida de la base de datos NCBI para ErbB 2(Sbjct).

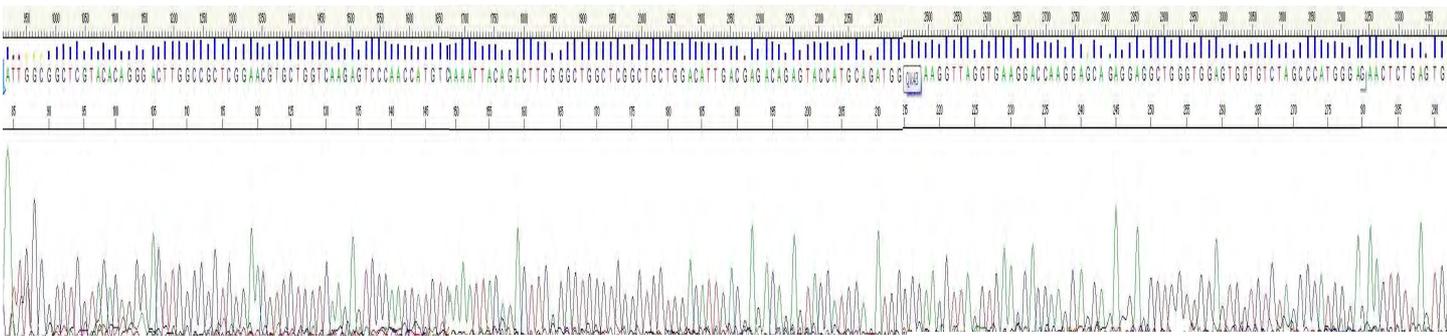


Fig. 5 Electroferograma que muestra los picos de absorción de la secuencia de nucleótidos identificados por el secuenciador automatizado ABI-3730 (Applied Biosystems, USA) pertenecientes a la muestra B05.

```

Query= B08_F08.fasta.screen.Contig1

>ref|NM_001005862.1| Homo sapiens v-erb-b2 erythroblastic leukemia
viral oncogene homolog
      2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)
      (ERBB2), transcript variant 2

Query: 464aggggatgagctacctggaggatgtgctggctcgtagacacagggacttggccgctcggaacg

      |||
Sbjct:2922 ggggatgagctacctggaggatgtgctggctcgtagacacagggacttggccgctcggaacg

Query: 524 gctggtcaagagtcccaacctatgtcaaaattacagacttcgggctggctcggtgctggtg

      |||
Sbjct 2982tgctggtcaagagtcccaacctatgtcaaaattacagacttcgggctggctcggtgctggtg

Query: 584 acattgacgagacagagtaccatgcagatgggggcaaggt
      |||
Sbjct: 3042 acattgacgagacagagtaccatgcagatgggggcaaggt

```

Tabla 5. Comparación de secuencia, muestra B08 (Query) y la secuencia obtenida de la base de datos NCBI para ErbB 2(Sbjct).

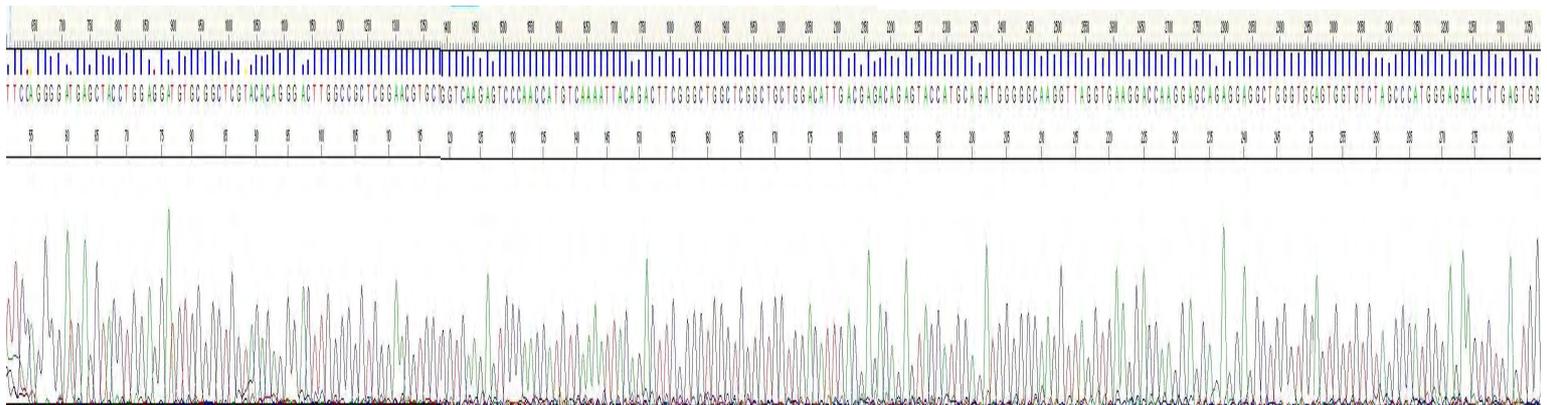


Fig. 6 Electroferograma se muestran los picos de absorción de la secuencia de nucleótidos identificados por el secuenciador automatizado ABI-3730 (Applied Biosystems, USA) pertenecientes a la muestra B08.

```

Query= B09_F09.fasta.screen.Contig1

>ref|NM_001005862.1| Homo sapiens v-erb-b2 erythroblastic leukemia
viral oncogene homolog
      2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)
      (ERBB2), transcript variant 2

Query: 230aggggatgagctacctggaggatgtgctggctcgtagacagggacttggccgctcggaacg
      |||
Sbjct:2922aggggatgagctacctggaggatgtgctggctcgtagacagggacttggccgctcggaacg

Query:1290tgctggtcaagagtccaacatgtcaaaattacagacttcgggctggctcggtgctggtg
      |||
Sbjct:2982tgctggtcaagagtccaacatgtcaaaattacagacttcgggctggctcggtgctggtg

Query: 1350 acattgacgagacagagtacatgcagatgggggcaaggt
      |||
Sbjct: 3042 acattgacgagacagagtacatgcagatgggggcaaggt

```

Tabla 6. Comparación de secuencia, muestra B09 (Query) y la secuencia obtenida de la base de datos NCBI para ErbB 2(Sbjct).

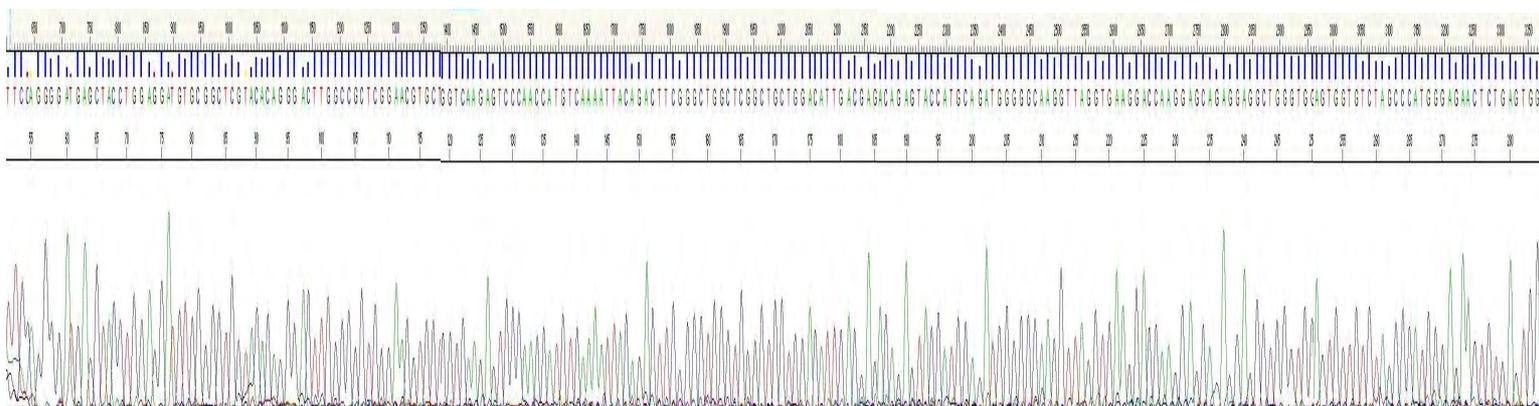


Fig. 7 Electroferograma que muestra los picos de absorción de la secuencia de nucleótidos identificados por el secuenciador automatizado ABI-3730 (Applied Biosystems, USA) pertenecientes a la muestra B09.

Las muestras B05, B08, B09, representan los productos de PCR de la línea celular INBL para una región específica correspondiente al exón 21. Los fragmentos de secuencia de los nucleótidos comprendidos entre las región 2730-2889, que corresponden al dominio cinasa de la proteína, se muestran en la tabla 12.

Línea celular CALO

Query= B06_F06.fasta.screen.Contig1

ref|NM_001005862.1| Homo sapiens v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog
2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)
(ERBB2), transcript variant 2

Query: 16 aggatgtgctgctcgctacacagggacttggccgctcggaacgtgctgggtcaagagtccca
|||||
Sbjct:2940 aggatgtgctgctcgctacacagggacttggccgctcggaacgtgctgggtcaagagtccca

Query: 76 accatgtcaaaaattacagacttcgggctggctcggtgctggacattgacgagacagagt
|||||
Sbjct:300 accatgtcaaaaattacagacttcgggctggctcggtgctggacattgacgagacagagt

Query: 136 accatgcagatgggggcaaggt
|||||
Sbjct: 3060 accatgcagatgggggcaaggt

Tabla 7. Comparación de secuencia, muestra B06 (Query) y la secuencia obtenida de la base de datos NCBI para ErbB 2(Sbjct).

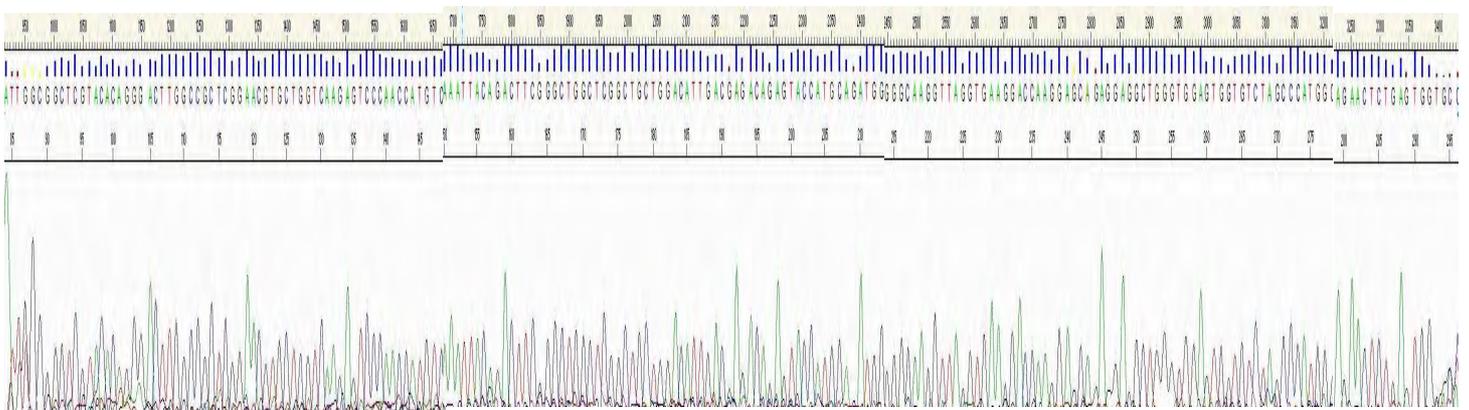


Fig. 8 Electroferograma que muestra los picos de absorción de cada una de la secuencia de nucleótidos identificados por el secuenciador automatizado ABI-3730 (Applied Biosystems, USA) pertenecientes a la muestra B06.

Cromatogramas HER 19

Línea celular CALO

Query= M1_Fw_2009-05-20_C01_005.ab1

>ref|NM_001005862.1| Homo sapiens v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog
2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)
(ERBB2), transcript variant 2

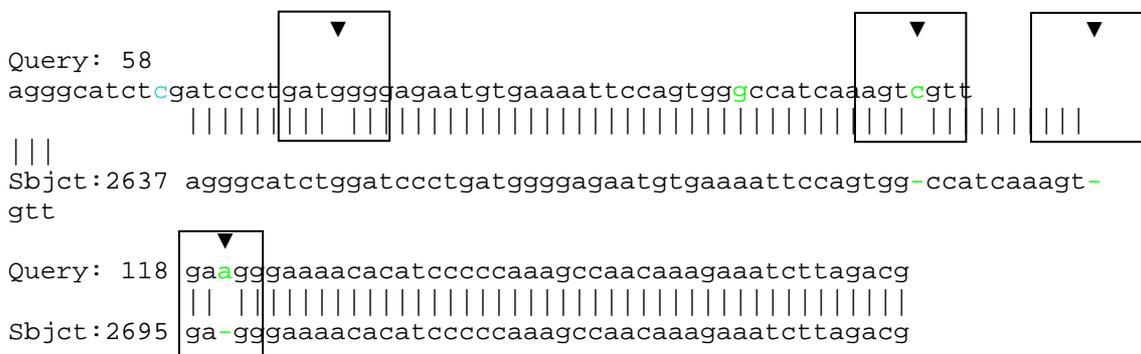


Tabla 9. Comparación de secuencia, muestra M1 (Query) y la secuencia obtenida de la base de datos NCBI para ErbB 2(Subjct).

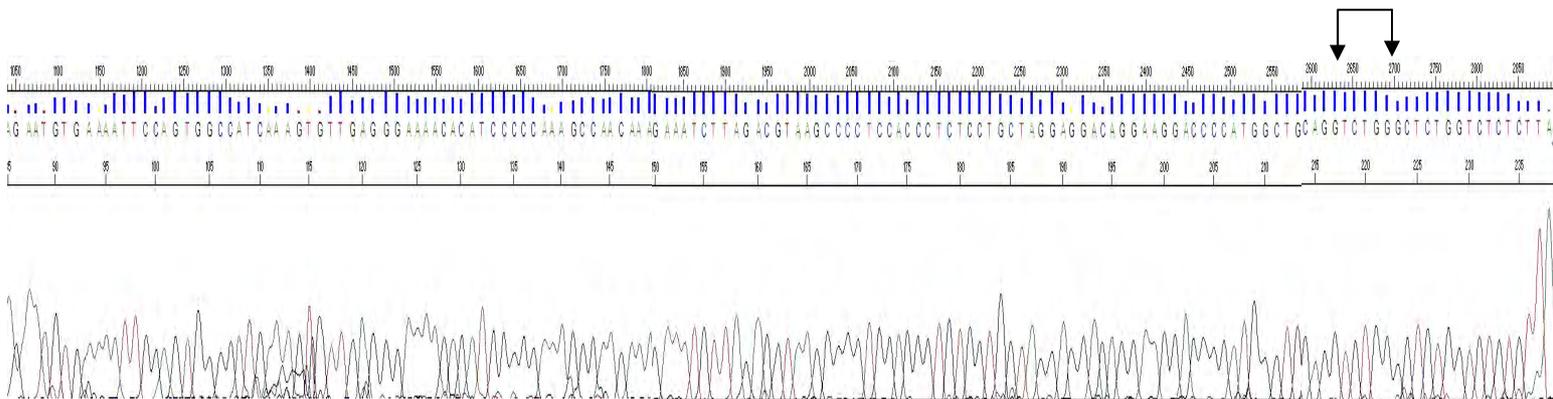


Fig. 10 Electroferograma que muestran los picos de absorción de la secuencia de nucleótidos identificados por el secuenciador automatizado ABI-3100 (Applied Biosystems, USA) pertenecientes a la muestra M1, así como las inserciones y cambios de bases marcadas dentro de los recuadros.

Cuando se realizó una comparación de los datos obtenidos después de secuenciar los fragmentos del exón 19, de la muestra M1 correspondiente a la línea celular CALO, región 2637-2695, se detectó un cambio de base de una C por una G en la región 2646 y tres

inserciones G, C, A, en las regiones 2681, 2691, 2696, correspondientes a la secuencia de ErbB2 consultada en la base de datos NCBI (tabla 9 y 13).

Línea celular INBL

Query= M2_Fw_2009-05-20_D01_007.ab1

>ref|NM_001005862.1| Homo sapiens v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog
 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)
 (ERBB2), transcript variant 2

```

Query: 68
tccctgatgggggagaatgtgaaaattccagtgccatcaaagtgttgaggggaaaacaca
|||||
Sbjct:2649 tccctgatgggggagaatgtgaaaattccagtgccatcaaagtgttgaggg
ggaaaacaca

Query: 128 tcccccaaagccaacaagaatccttagacg
|||||
Sbjct: 2708 tcccccaaagccaacaagaatccttagacg
  
```

Tabla 10. Comparación de secuencia, muestra M2 (Query) y la secuencia obtenida de la base de datos NCBI para ErbB 2(Sbjct).

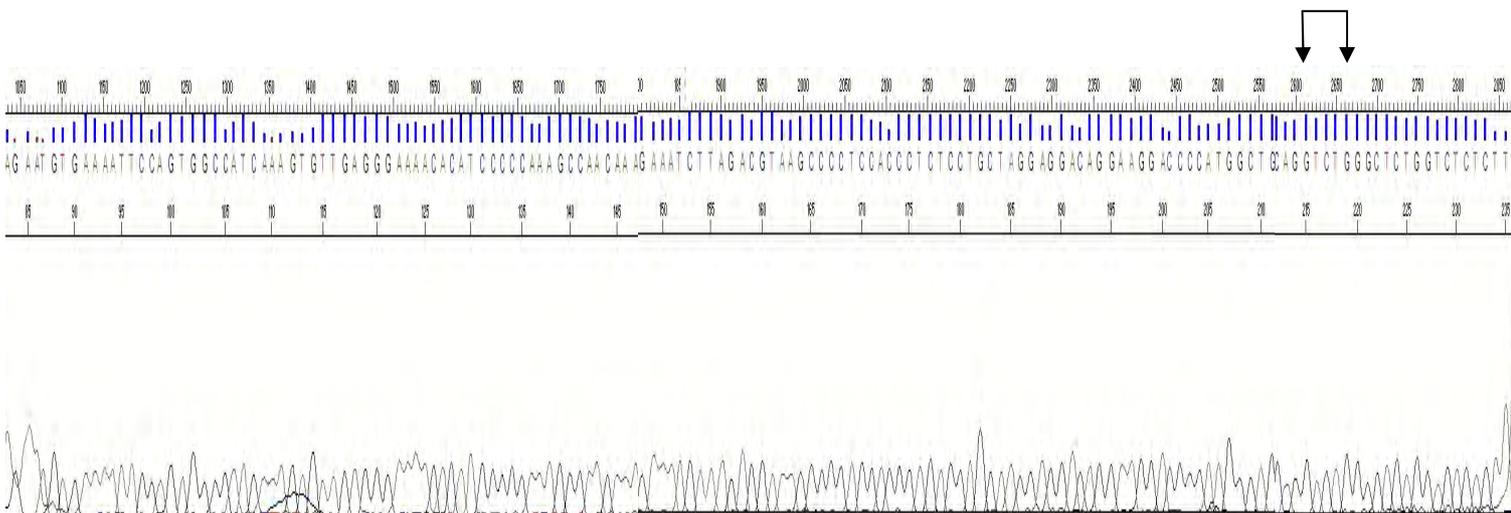


Fig. 11 Electroferograma que muestra los picos de absorción de la secuencia de nucleótidos identificados por el secuenciador automatizado ABI-3100 (Applied Biosystems, USA) pertenecientes a la muestra M2, en el recuadro se muestra una posible inserción.

Para la muestra M2 se realizó el mismo procedimiento, y al confrontarla con la base de datos (NCBI, ErbB2) se encontró una posible inserción en la región 2696, aunque el secuenciador no pudo precisar el nucleótido insertado, (tabla 10 y 13).

Para la búsqueda de mutaciones en el exón 21 se enviaron a secuenciar 5 muestras (B06, B07 que corresponden a la línea CALO y B05, B08, B09 que corresponden a la línea INBL).

El secuenciador ABI 3730 xl, genera automáticamente dos archivos forward y reverse de cada muestra con el sufijo *.ab1. Para asignar los valores de calidad de cada nucleótido, se utilizó el programa phred; donde la calidad está dada por el valor (Q) que le asigna el secuenciador a cada base y este valor generalmente se sugiere que sea de $Q > 20$ ⁽³²⁾.

$Q = - 10 * \text{Log}(p_e)$; p_e : es la probabilidad de que la base sea un error de secuencia

$Q = 20$ 1 error en 100, $Q = 30$ 1/1000, $Q = 40$ 1/10000, $Q = 50$ 1/100000

El valor de Q, aplicado a todas las muestras tanto para el exón 19 y 21 fue de $Q = 20$. Equivalente a una lectura de una base sea erróneo entre 100.

Para ajustar los valores de calidad, se utilizó el ensamblador phrap, este reafirma los valores en función de la frecuencia de lecturas, en la siguiente tabla (11) se puede observar que solamente una región de las secuenciadas tiene un soporte en función a la calidad.

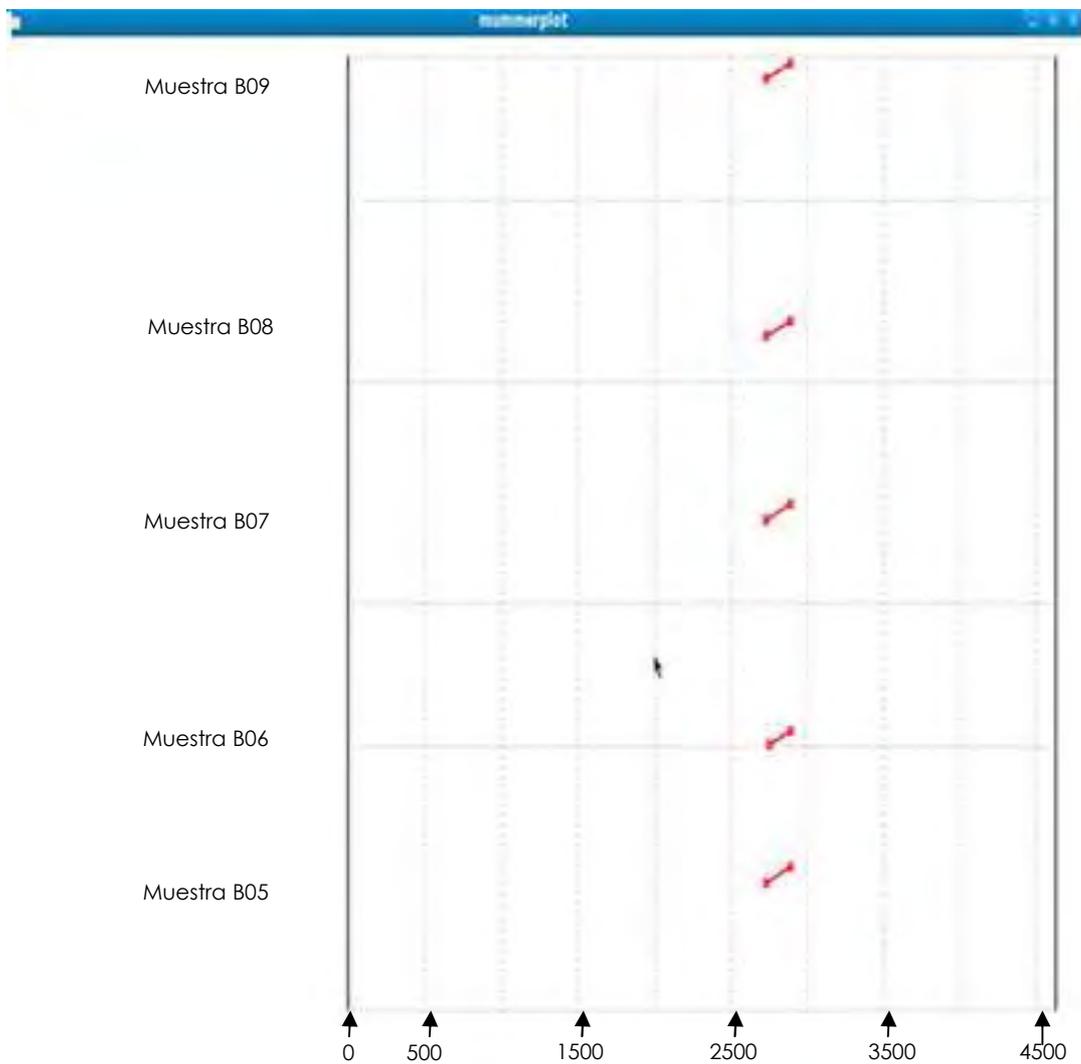
Región	Muestra	Línea	Q	p_e	Significado
EXON 21	B05	INBL	20	0.000001	(-)
EXON 21	B08	INBL	20	0.000001	(-)
EXON 21	B09	INBL	20	0.000001	(-)
EXON 21	B06	CALO	20	0.000001	(-)
EXON 21	B07	CALO	20	0.000001	(-)
EXON 19	M1	CALO	20	0.000001	(*)
EXON 19	M2	INBL	20	0.000001	(*)

Tabla 11. Valores de calidad utilizados por el ensamblador phrap para cada una de las muestras donde p_e representa la probabilidad de que una base sea un error de secuencia, $Q = 20$, equivale a una base errónea entre 100. Los símbolos (-) representan la no existencia de algún cambio como: inserciones o deleciones y (*) representa la posibilidad de encontrar algún tipo de inserción o deleción dentro de la secuencia analizada.

El análisis de las posibles mutaciones, se realizó con estadística bayesiana. Se utilizó el algoritmo implementado en Polybayes por el programa⁽³³⁾, este programa utiliza los valores de calidad generados por

el ensamblador phrap y calcula la probabilidad de que un sitio sea polimórfico. Sin embargo, esto podría llevar a una subestimación de las mutaciones (falsos negativos), ya que no existen más bases que refuercen el valor de calidad.

Se realizaron alineamientos y se compararon las muestras vs la secuencia de la proteína HER2. Esto permite ver si los diseños de los oligos fueron correctos. En la figura 12 se observa en el eje de las "y" las muestras y en el eje de las "x" la longitud en nucleótidos de la proteína. Aproximadamente 160 pb que se alinearon con la secuencia de nucleótidos de la proteína y dicho alineamiento tiene identidad del 100% lo que indica que no existen mutaciones.



IX. ANALISIS DE RESULTADOS

Los trabajos relacionados con la sobre-expresión de Her2 se han realizado en su mayoría en cáncer de mama, sin embargo, se ha descrito la sobreexpresión de Her2 en otros tipos de cáncer⁽⁵⁹⁻⁶¹⁾. Investigaciones realizadas por nuestro grupo de trabajo permitieron establecer la existencia de una sobre expresión de Her2 en líneas celulares de carcinoma de cérvix CALO e INB y que la proteína se encuentra fosforilada de manera constitutiva^(48, 49).

Debido a que existe una relación entre la sobre expresión de Her2 y el desarrollo de un cáncer metastático⁽⁶³⁻⁶⁵⁾ nos dimos a la tarea de establecer si dicha desregulación se debía a la presencia de mutaciones en el dominio tirosina cinasa de Her2.

Se eligieron dos exones comprendidos dentro del dominio tirosina cinasa, ya que dentro de él se han descrito mutaciones significativas en cáncer de mama^(50,56,61) y decidimos probar si se presentaban de igual forma en células de carcinoma de cérvix.

Por esta razón se eligieron oligos utilizados para la detección de mutaciones en Her2 en cáncer de mama, se probó cada alineamiento in-silico en la base de datos NCBI.

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

Para analizar los resultados obtenidos se compararon las secuencias de nuestras muestras con la secuencia reportada para Her2/Neu en la base de datos NCBI para buscar posibles mutaciones o la presencia de algún polimorfismo.

Para el exón 21, en las cinco muestras seleccionadas: B05, B08, B09 (línea celular INBL) y B06, B07 (línea celular CALO), las comparaciones del DNA que corresponde al exón 21 de Her2/ErbB2 de los contigs logrados durante el proceso de secuenciación de las muestras sugieren un desplazamiento del marco de lectura original, lo que podría significar posibles mutaciones que conlleven a un cambio funcional de la proteína HER2, sin embargo, no es posible asegurar lo anterior si no se realiza una búsqueda de corrimiento del marco de lectura con un oligo

que permita evaluar una región más amplia de la que se utilizó para el exón 21, para confirmar si realmente existen tales mutaciones y el tipo de mutación presente.

Se diseñaron oligos específicos para amplificar el exón 19, los productos de PCR se secuenciaron y se alinearon para compararlos con la base de datos NCBI del gen ErbB2.

Cuando se realizó este análisis a la línea celular CALO (muestra 1), se detectaron cambios en el marco de lectura en los nucleótidos 26468(C), 2682(G), 2693(C) y 2697(A), que corresponden a la inserción del aminoácido glutamina que se encuentra dentro de una región importante que comprende el sitio de unión del ATP^(57,70,71,72), la región de formación del dímero^(59,66,76), el sitio de unión al sustrato^(59,73,-75), y el asa de activación^(59,66,76), por lo que sugerimos que estas posibles mutaciones pudieran incidir en la activación constitutiva del receptor Her2.

Una expectativa mayor sería la consecuencia de cambios e inserciones de los nucleótidos en esta región, así como la comparación de los resultados obtenidos experimentalmente con los ya existentes en la literatura y sobre todo con los referentes a carcinoma de mama cuya importancia radica en la confluencia de subregiones, que podrían tener un impacto negativo, como la sobre-expresión de Her2, siendo este un marcador de mal pronóstico para pacientes con cáncer o personas que todavía no desarrollan cáncer.

Se sabe de la existencia de mutaciones activadoras en la familia de receptores ErbB⁽⁷⁷⁻⁷⁹⁾ que se encuentran localizadas a lo largo de los dominios que conforman al receptor ^(61,63, 66), sin embargo solo un número reducido de casos se han detectado en muestras de tumores, por lo tanto, el análisis más detallado podría ayudar a establecer de manera clara la asociación de las diferentes clases de mutaciones, su relación con la presencia de tumores y el desarrollo de diferentes tipos de cáncer y ayudar a establecer una terapia específica para cada paciente^(58 - 80).

X. CONCLUSIONES

Se estandarizaron las condiciones para la obtención de productos de PCR, para los exones 19 y 21.

En las regiones analizadas correspondientes a los exones 19 y 21, no se encontraron mutaciones. Sin embargo en el exón 19 se encontró un posible cambio en el marco de lectura que pudiera derivar en una mutación en el receptor Her2.

XI. PERSPECTIVAS

Diseño de nuevos primers que permitan analizar otros exones, también dentro del dominio tirosina cinasa de HER2.

Analizar fragmentos más grandes que permitan evaluar la existencia de posibles mutaciones y si estas son suficientes para cambiar la estructura conformacional del sitio activo del receptor Her2 activándolo y favoreciendo la formación de heterodímeros. Aumentando el grado de unión entre los dímeros formados, condiciones que pueden afectar la capacidad terapéutica de los medicamentos utilizados en el caso de sobre-expresión de Her2.

XII.BIBLIOGRAFÍA

1. Instituto Nacional de Salud Pública.
<http://www.insp.mx/medios/noticias/>
2. <http://www.saludbcs.gob.mx/cancer-cervicouterino.html>
3. http://www.universia.net.mx/index.php/news_user/content/view/full/9042
4. <http://www.dgepi.salud.gob.mx/diveent/RHNM.htm>
5.
www.economia.gob.mx/work/normas/noms/kartemod/mod014ssa2.pdf
6. Watson J.D, Baker T , Bell S, Gann A, Levine M, Losick R, (2007) Molecular Biology of the gene, 6th edition. Benjamín Cummings, USA
7. www.cancer.gov/español
http://www.cancer.gov/espanol/pdq/tratamiento/cuellouterino/health_professional/allpages/print#Section
8. [http://www.cancerstaging.org/mission/whatis.html\(nomenclatura del cáncer\)](http://www.cancerstaging.org/mission/whatis.html(nomenclatura%20del%20c%C3%A1ncer))
9. Riese D, Gallo R, Settleman J. Mutational activation of ErbB family receptor tyrosine kinases: insights into mechanisms of signal transduction and tumorigenesis. *BioEssays*, 2007; **29**: 558 – 565.
10. Burgess A. EGFR family: Structure physiology signaling and therapeutics targets. *Growth Factors*, 2008; **26**(5): 263 – 274.
11. Roskoski R. The ErbB/HER2 receptor protein-tyrosine kinases and cancer. *BBRC*, 2004; **319**:1-11.

12. Shannon E, Telesco R. Atomistic insights into regulatory mechanisms of the HER2 tyrosine kinase domain: A molecular dynamics study. *Biophysical Journal*, 2009; **96**:2321-2334.

13. Wang E, Narasana A, Torres P, Xiang B, Wu F, Yang S, Carpenter G, Gazdar F. HER 2 kinase domain mutation results in constitutive phosphorylation and activation of HER2 and EGFR and resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Cell* 2006(**10**); 25 – 38.

14. www.TYKERB.com

15. Qing-Bai She, Chandarlapaty S, Qing Ye, Lobo J, Haskell K, Leander K, DeFeo-Jones D., Huber H, Rosen N . Breast Tumor Cells with *PI3K* Mutation or *HER2* Amplification Are Selectively Addicted to Akt Signaling. *PLoS ONE*, 2008; **3**(8) 3065.

16. Mounawar M, Mukeira A, Le Calvez F, Hong J, Renard H. Patterns of EGFR,HER2, TP53 and KRAS mutations in relationship to smoking story. *Cancer Res*, 2007; **67**(12): 5667-5672.

17. Castiglion F, Tagliabue E, Campiglio M, Pupa M, Balsari A. Role of exon 16- deleted HER2 in breast carcinomas. *Endocr Relat Cancer*, 2006; **13**: 221-232.

18. Huang Y, Li X, Jiang J, Frank S. Prolactine modulates phosphorylation signaling and trafficking of epidermal growth factor receptor in human T47D breast cells. *Oncogene*, 2006; **25**: 7565-7576.

19. Morrison C, Zanagnolo V, Ramirez N. HER2 is an independent prognostic factor in endometrial cancer association with outcome in a large cohort of surgically staged patients. *J Clin Oncol*, 2006; **24**:2376-2385.

20. Abba M, Mourón A, Güerci A. Amplificación del proto-oncogén Her2/Neu, asociada a la infección por VHP de bajo riesgo, en citología exfoliativa cervical. *Rev Mex Patol Clín*, 2000; **47**(1): 26-31.

21. Konecny G, Venkatesan N, Dering J, Ginther C, Finn R, Rahmed M. Activity of a novel HER2 and EGFR dual kinase inhibitor in human endometrial cancer cell. *BJC*, 2008; **98**:1076-1084.

22. Grushko J, Filiaci V, Mundt J, Riderstrale K, Olopade O, Fleming G. An exploratory analysis of HER2 amplification and overexpression in advanced endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol*; 2008; **198**:3-9.

23. Kim H, Chan R, Dankort D, Zuo D, Najoukas M, Park M, Muller J. The c-Src tyrosine kinase associates with the catalytic domain of ERBB2, implications for ERBB2 mediated signaling and transformation. *Oncogene*, 2005; **24**:7599-7607.
24. Payne W, Holden A, Layfield J. Detection of EGFR and HER2 activating mutations in squamous cell carcinoma involving the head and neck. *Mod Pathol*, 2006; **19**: 634-640.
25. Normano N, Bianco C, Strizzi L, Mancinno M, Maiello M, De Luca A. The ErbB receptors and their ligands in Cancer: An Over view, *Current Drug Targets*, 2005, **6** 243 – 257.
26. XXX Reunión Anual de la Sociedad Española de Anatomía Patológica, Symposium sobre cáncer de mama. 2007 Madrid España.
27. Burke CL, Stern D. Activation of Neu(ErbB-2) mediated by disulfide bond-induced dimerization reveals a receptor tyrosine kinase dimer interface. *Mol. Cell. Biol*, 1998; **18**:5371-5379.
28. Ferguson K, Berger M, Mendrola J, Cho H, Leahy D, Lemmon M. EGF activates its receptor by removing interactions that inhibit ectodomain dimerization. *Mol. Cell*, 2003; **11**:507-517
29. Burgess A, Cho H, Eigenbrot C, Ferguson K, Garret D, Sliwkowski M, Ward W, Yocoyama S. An open and shut case? Recent insights into the activation of EGFR/ErbB receptors. *Mol. Cell*, 2003; **12**: 541 - 552.
30. Stephens P, Hunter C, Bignell G, Edkins S, Davies H, Lung cancer: intragenic ErbB kinase mutations in tumours. *Nature*, 2004; **431**:525-526.
31. Soung Y, Lee J, Kim S, Wang P, Jo K. Somatic mutations of the ErbB4 kinase domain in human cancers. *International Journal of Cancer*, 2006; **118**:1426-1429.
32. Karunagaran D, Azahar E, Beerli D, Chen X, Grass-Porta D, Ratzin B, Seger B, Hynes E, Yarden. ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications in breast cancer. *J EMBO*, 1996; **15**(2):254-264.
33. André F, Nahta R, Conforti R, Boulet T, Aziz M, Yuan L, Meslin F, Spillmann M, Esteva J. Expression patterns and predictive value of phosphorylated AKT in early-stage breast cancer. *Ann Oncol*, 2008; **19**: 315-320.

34. Prenzel N, Zwick E, Leserer M, Ullrich A. Tyrosine kinase signalling in breast cancer. Epidermal growth factor receptor: convergence point for signal integration and diversification, 2006; 2:184-190.
35. Hanks S, Quinn A, Hunter T. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of catalytic domains. *Science*; 1988; **241**:42-52.
36. Salomon D, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. Epidermal growth factor related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol*, 1995; **19**:183 -235.
37. Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases, *Cell*, 2003; **103**:211 -225.
38. Garret N, McKern N, Lou M, Elleman T, Adams T, Lovrecz G, Zhu H, Walker F, Frenkel M, Hoyne P, Jorissen R, Nice E, Burgess A, Ward W. Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor- α . *Cell*, 2002; **110**:763-773.
39. Hyun S, Mason K, Raymar k, Stanley A, Gabelli S, Denney Jr, Leahy D. Structure of the cellular region of HER2 alone and in complex with Herceptin Fab
40. Stamos J, Sliwkowski M, Eigenbrot C. Structure of the epidermal growth factor receptor kinase domain alone and in complex with a 4-anilinoquinazoline inhibitor. *Biol. Chem.*, 2002; **277**:46265 -46272.
41. Ogiso H, Ishitani R, Nureki O, Fukai S, Yamakana M, Kim H, Saito K, Sakamoto A, Inoue M, Shirouzu M, Yokoyama J. Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell*, 2002; **110**:775-787.
42. Penington J, Bryant I, Riese D. A Constitutively active ErbB4 and ErbB2 mutants exhibit distinct biological activities. *Cell growth & differentiation*, 2002; **13**: 247-256.
43. Bekaii-Saab T, Williams N, Plass C, Villalona M, Eng C. A novel mutation in tyrosine kinase domain of ErbB2 in hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer*, 2006; **6**:278.
44. Shigematsu H, Takahashi T, Nomura M, Madjmurar K, Susuki M, Lee H, Wistuba I, Fong M, Toyooka S, Shimizu N. Somatic mutations of HER2 kinase domain in lung adenocarcinoma. *Cancer Res*, 2005; **65**(5):1642-1646.

45. Hicks G. (2002). *Bioquímica, Segunda ed.* Mc Graw Hill, México.
46. Pasternak J. (2005). *Human Molecular Genetic, 2nd edition.* Wiley – Liss, USA.
47. Soto I, Rangel R, Valle A, Moreno V, Santiago R, Weiss B, Cáceres J. The tyrophostin B42 inhibits cell proliferation and HER2 phosphorylation in cervical carcinoma cell lines. *Cancer Invest*, 2008; **26**(2): 136-44.
48. Soto I, Santiago A, Morales X, Rangel R, Cáceres J. Implication of tyrosine kinase receptors c-kit and HER-2 in cell growth of cervical carcinoma. *Res Adv in Cancer*, 2003; **3**: 1–13.
49. Blume P, Hunter T. Oncogenic kinase signaling. *Nat*, 2001; **411**:355 - 365.
50. <http://www.ucm.es/info/genetica/AVG/practicas/secuencia/SecuenciaP.htm>
51. <http://www.appliedbiosystems.com.au/>
52. <http://www.fermentas.com>
53. Yarden Y, Sliwkowski. Untangling the ErbB signaling network. *Nat Rev*, 2001; **2**:127-137.
54. Harris R, Chung E, Coffey R. EGF receptor ligands. *Exp. Cell. Res*, 2003; **284**:2-13.
55. www.ncbi.nlm.nih.gov/
56. Jorissen R, Walker F, Pouliot N, Garrett T, Ward C, Burgess A. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signaling. *Exp Cell Res*.2003; **284**:31-53.
- 57 Zheng J, Knighton D, Ten Eyck L, Karlsson R, Xuong N, Taylor S, Sowadski J. Crystal structure of catalytic subunit of c-AMP –dependent protein kinase complexed with MgATP and peptide inhibitor. *Biochemistry*, 1993; **32**:2154-2161.
58. Yarden Y, Schlessinger. Self-phosphorylation of epidermal growth factor receptor: evidence for a model of intermolecular allosteric activation. *Biochemistry*, 1987; **26**:1437-1444.
59. Hubbard S, Till J. Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu. Rev Biochem*, 2000; **69**:373-398.

60. Carpenter G. ErbB mechanism of action and biology. *Exp Cell Res*, 2003; **284**:66-77.
61. Bargmann CI, Hung M, Weinberg R. Multiple independent activations of the neu oncogene by point mutation altering the transmembrane domain of p185. *Cell*, 1986; **45**:649-657.
62. Bargmann CI, Weinberg R. Increase tyrosine kinase activity associated with the protein encoded by the activated neu oncogene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988; **85**:5394-5398.
63. Bargmann CI, Weinberg R. Oncogenic activation of the neu-encoded receptor protein by mutation and deletion. *EMBO J*, 1988; **7**:2043-2052.
64. Sordella R, Bell W, Haber D, Settelman J. Genitib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activates anti-apoptotic pathways. *Science*, 2004; **305**:1163-1167.
65. Stephens P, Hunter C, Bignell G, Edkings S, Davies H, Lung cancer: intragenic ErbB kinase mutations in tumours. *Nature*, 2004; **431**:525-526.
66. Citri A, Skaria k, Yarden Y. The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3. *Exp Cell Res*, 2003; **284**:54-65.
67. Zhang X, Gureasko J, Shen K, Cole p, Kuriyan J. An allosteric mechanism for activation of kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell*, 2006; **125**:1137-1149.
68. Boerner J, Danielsen A, Maihle N. Ligand-independent oncogenic signaling by the epidermal growth factor receptor: v-ErbB as a paradigm. *Exp Cell Res*, 2003; **284**:111-121.
69. Wang S, Narasanna A, Perez M, Xiang B, Wu F. HER2 kinase domain mutation results in constitutive phosphorylation and activation of HER2 and EGFR and resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Cell*, 2006, **10**:25-38.
70. Schuzle W, Deng L, Mann M. Phosphotyrosine interactome of the ErbB receptor kinase family. *Mol. Syst Biol*, 2005; **1**:0008.
71. Komuro A, Nagai M, Navin N, Sudol M. WW domain-containing protein YAP associates with ErbB4 and acts as a co-transcriptional activator for the carboxi terminal fragment of ErbB-4 that translocates to nucleus. *Biol Chem*, 2003; **278**:33334-33341.

72. Smith SO, Smith C, Bormann B. Strong hydrogen bonding interaction a buried glutamic acid in transmembrane sequence of Neu/ErbB2 receptor. *Nat Struct Biol*, 1996; **3**:252-258.
73. Smith SO, Smith C, Shekar S, Peersen O, Ziliox M. Transmembrane interactions in activation of Neu receptor tyrosine kinases. *Biochemistry*, 2002;**41**;9321-9332.
- 74 Cho H, Leahy D. Structure of extracellular region of HER3 reveals an interdomain tether. *Science*, 2002; **297**:1330-1333.
75. Soung Y, Lee J, Kim S, Wang P, Jo K. Somatic mutations of the ErbB4 kinase domain in human cancers. *Int J Cancer*, 2006;**118**:1426-1429.
76. Wang S, Narasanna A, Perez M, Xiang B, Wu F. HER2 kinase domain mutation results in constitutive phosphorylation and activation of HER2 and EGFR and resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Cell*, 2006, **10**:25-38.
77. Qing-Bai She, Chandarlapaty S, Qing Ye, Lobo J, Haskell K, Leander K, DeFeo-Jones D, Huber H, Rosen N . Breast Tumor Cells with *PI3K* Mutation or *HER2* Amplification Are Selectively Addicted to Akt Signaling. *PLoS ONE*, 2008; 3(8) 3065.
78. Mounawar M, Mukeira A, Le Calvez F, Hong J, Renard H. Patterns of EGFR,HER2, TP53 and KRAS mutations in relationship to smoking story. *Cancer Res*, 2007; **67**(12): 5667-5672.
79. Wang J. A method for finding single-nucleotide polymorphism with allele frequencies in sequences of deep coverage. *BMC Bioinformatics*.2005, **6**:220.
80. Marth G. A general approach to single-nucleotide polymorphism discovery. *Nat Genet*.1999, **23**:452-456