



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

**EL PAPEL DE PTP1B EN LA MODULACIÓN DE LA
EXPRESIÓN DE HER 2 EN LÍNEAS CELULARES Y
CULTIVOS PRIMARIOS DE CÁNCER DE GLÁNDULA
MAMARIA**

TESIS DE POSGRADO

QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE
SUB-ESPECIALISTA EN ONCOLOGÍA MÉDICA

PRESENTA

DR. IVÁN ROMARICO GONZÁLEZ ESPINOZA

TUTOR

DR. EUCARIO LEÓN RODRÍGUEZ

ASESORES DE TESIS

DRA. MARÍA DE JESÚS IBARRA SÁNCHEZ

DR. JOSÉ ESPARZA LÓPEZ

DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA



MÉXICO, D. F. AGOSTO 2011



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.

Autorización:

Dr. Eucario Leon Rodriguez
Coordinador y profesor titular de Oncología Médica
Tutor de Tesis

Dra Maria de Jesús Ibarra Sanchez
Investigadora em Ciencias Médicas
Cotutora de Tesis

Dr. Luis F. Uscanga Dominguez
Director de Enseñanza

Este trabajo se realizo en la Unidad de Bioquímica del Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición Salvador Zubirán y se conto con el apoyo económico del protocolo Del Conacyt 102825

DEDICATORIAS

A mis padres y hermanas, por su amor y apoyo incondicionales.

A mis maestros (Dr León, Dra. María Ibarra, Dr. José Esparza, Dr. Zentella, etc), por enseñarme que el trabajo duro y continuo tratando de perseguir la excelencia es el camino que todo medico debe de seguir siempre con el interés de ayudar a las personas.

A la UNAM por crear profesionales de salud de primer nivel.

A mis compañeros y amigos de generación Jorge, Alejandra y Elizabeth por crear un ambiente idóneo para la sub-especialidad y por enseñarme valores.

A esa persona a quien le corresponde mi corazón y que me hace ser fuerte.

A las pacientes que confiaron en mí para su tratamiento y realización de este protocolo de investigación.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor y a mis asesores de tesis, por la confianza y el apoyo que me brindaron y los conocimientos que me han transmitido.

A todo el personal del Laboratorio de Bioquímica del INCMNSZ por el esfuerzo extra que hicieron y el tiempo que invirtieron en apoyarme.

A todos mis compañeros residentes de Oncología.

A Diana Gómez Martín y a José por sus críticas constructivas y su apoyo en el laboratorio.

“Dondequiera que se ame el arte de la medicina, se ama también a la humanidad”

Platón

ÍNDICE

Página

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Introducción..... | 8 |
| 1. Cáncer de mama. | |
| a. Epidemiología del cáncer de mama en el mundo. | |
| b. Epidemiología del cáncer mamario en México. | |
| 2. Transformación celular. | |
| 3. El papel de la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina en la oncogénesis. | |
| 4. El papel de Her2 Neu en cáncer de mama. | |
| 5. El papel de PTP1B en la modulación de la expresión de Her 2 en líneas celulares y cultivos primarios de cáncer de glándula mamaria. | |
| a. El papel de la fosforilación de proteínas. | |
| b. Familia de proteínas fosfatasas de tirosina. | |
| c. PTP 1B | |
| Planteamiento del Problema..... | 35 |
| Justificación..... | 35 |
| Objetivos generales..... | 36 |
| Objetivos específicos..... | 36 |
| Hipótesis..... | 37 |
| Material y Métodos..... | 38 |
| Resultados..... | 41 |
| Discusión y Conclusiones..... | 49 |
| Bibliografía en cada capítulo..... | 53 |

Introducción

Cáncer de mama.

Epidemiología de cáncer de mama en el mundo.

El cáncer de mama es el más frecuente entre mujeres con un estimado de 1.38 millones de nuevos casos diagnosticados en el 2008 (23% de todos los cánceres), y se encuentra ubicado en el segundo lugar de manera global (10.9% de todos los cánceres). En la actualidad es el cáncer más común tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo con cerca de 690 000 nuevos casos estimados en cada región (relación de población 1:4). Las tasas de incidencia varían desde 19.3 por 100 000 mujeres en el este de África a 89.7 por 100 000 mujeres en el oeste de Europa, y son altas (>80 por 100 000) en regiones desarrolladas del mundo (excepto Japón) y bajas (<40 por 100 000) en la mayoría de las regiones en vías de desarrollo. El rango de tasas de mortalidad es mucho menor (aproximadamente 6-19 por 100 000) como consecuencia de una supervivencia mayor de cáncer de mama en países desarrollados. Estos datos ubican al cáncer de mama como la quinta causa de muerte de todos los cánceres (458 000 muertes), pero continua siendo la causa más frecuente de muerte por cáncer en mujeres, a pesar de los progresos en la oncología moderna del cáncer de mama^{1,2}. Sin embargo, en los países en vías de desarrollo es donde ocurren la mayoría de las muertes por este tipo de cáncer. El riesgo de enfermarse es superior en las mujeres de países con nivel socioeconómico alto, pero con un menor riesgo de morir por esta patología. Las mujeres en países pobres tienen mayor riesgo de morir debido al menor acceso a los servicios de salud para su detección temprana, tratamiento y control. **(Figuras 1A, 1B).**



Figura 1A y 1B. Muestran la distribución de la mortalidad e incidencia por cáncer de mama a nivel mundial (Dato que proviene del Globocan 2008, publicado en el 2011).

Epidemiología del cáncer mamario en México.

En México, el cáncer de mama es un problema de salud pública, ya que con el tiempo la mortalidad y el número de casos se han incrementado paulatinamente. A partir de 2006 ocupa el primer lugar como causa de muerte por neoplasia maligna en las mujeres de 25 años en adelante y ha desplazado de esta posición al cáncer cervicouterino. En ese mismo año se registraron 4,440 defunciones con una tasa de mortalidad de 15.8 fallecimientos por 100 000 mujeres de 25 y más años, lo que representa un incremento de 9.7% en relación con el año 2000³ (Figura 2).



El análisis de la mortalidad por área geográfica muestra variaciones importantes por entidad federativa. Diez estados concentran 50% de las muertes por esta causa, los cuales se ubican principalmente en el norte del país, además de Jalisco y el Distrito Federal, caracterizándose por tener los mejores niveles socioeconómicos en México. En 2006, de las 4,461 muertes que se produjeron en todas las edades, 68% ocurrió en mujeres mayores de 50 años, con una edad promedio al morir de 58.3 años. La distribución de muertes, muestra que la mayor cantidad de defunciones ocurrió en mujeres derechohabientes del Instituto Mexicano del Seguro Social (47.7%), mientras que 25% fueron en enfermas sin seguridad social. Respecto a la incidencia, según los últimos datos del Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas (RHNM), en el año 2003 hubo 12,433 nuevos casos de cáncer de mama, 3 316 más que en el año anterior. La mayor parte en los grupos de 40 a 59 y de 70 años de edad y más, patrón similar al encontrado en 2002⁴. Esto significa que en el año 2003 las instituciones del Sistema Nacional de Salud diagnosticaron más de 50 casos de cáncer mamario en cada día laborable; la mayoría descubiertos en etapas avanzadas. El porcentaje promedio de diagnósticos, de acuerdo con el estadio clínico, es el siguiente: estadio 0 y I, 7.4%, estadio II, 34.4%, estadio III y IV, 42.1%, no clasificable 16.1%. No se cuenta con reportes más recientes del registro pero los datos por institución parecen indicar un mayor número de enfermas diagnosticadas en etapas más tempranas. Aun así, ya sea en estadios tempranos o avanzados, esta enfermedad representa un enorme costo emocional, familiar, social y económico. En resumen, en México esta patología se ha convertido en un problema creciente de salud pública. Tanto la mortalidad como el número de casos nuevos que se presentan cada año se han incrementando paulatinamente. Por todo lo anterior se deduce que los servicios de salud del país tienen un gran reto ya que deberán invertir en

ampliar la cobertura y mejorar su calidad con la finalidad de ofrecerle a la población mexicana en general una detección, diagnóstico y tratamiento oportunos.

Bibliografía.

1. Organización Mundial de la Salud: página de internet <http://Globocan.iarc.fr/> .
2. Organización Mundial de la Salud
<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>>.
<http://www.emro.who.int/lncd/publications/breast_cancers_screening.pdf>.
3. Centro Nacional de Equidad de Género y Salud Reproductiva, Dirección de Cáncer en la Mujer, Secretaría de Salud.
4. Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas (RHNM), en el año 2003. Secretaria de Salud.

Transformación celular.

En el 2001 Hanahan y Weinberg propusieron que el vasto catálogo de genotipos celulares cancerosos son una manifestación de 6 esenciales alteraciones en la fisiología celular que colectivamente dictan el crecimiento maligno: autosuficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad a las señales inhibitorias, evasión de la apoptosis, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida e invasión tisular y metástasis¹. Actualmente a estas alteraciones esenciales se le han aumentado dos que son la evasión de la destrucción inmune y desregulación del proceso energético celular¹⁰.

Existe evidencia que indica que la tumorigénesis en humanos es un proceso compuesto por múltiples pasos, que refleja alteraciones genéticas que controlan y dirigen la transformación progresiva de células humanas normales hacia sus derivados altamente malignos¹. Muchos tipos de cánceres son diagnosticados en la población humana con una incidencia edad dependiente implicando 4-7 como tasa limitante de eventos estocásticos². Análisis patológicos de varios órganos con cáncer revelan que las lesiones que aparecen representan los pasos intermedios en un proceso a través del cual las células evolucionan progresivamente de la normalidad hacia varias series de estados premalignos hasta desarrollar cánceres invasores³. Estas observaciones han rendido información más concreta y precisa indicando que los genomas de células tumorales están invariablemente alterados en múltiples sitios, sufriendo lesiones sutiles como mutaciones puntuales y tan obvias como cambios en el complemento de cromosomas⁴. La transformación de los cultivos celulares es por sí misma un proceso de múltiples pasos: las células de los roedores requieren al menos la introducción de 2 cambios genéticos antes de que ellos puedan adquirir competencia tumorigénica; sin embargo, sus contrapartes humanas requieren más ya que son más

difíciles de transformar⁵. Modelos transgénicos de tumorigénesis han repetidamente apoyado la conclusión de que la tumorigénesis en ratones involucra una tasa de eventos que limita los pasos de transformación celular⁶. Analizando toda esta información proveniente de observaciones de cánceres humanos y modelos animales se puede argumentar que el desarrollo tumoral procede vía a un proceso análogo a la evolución Darwiniana en la cual la sucesión de cambios genéticos, confiere uno u otro tipo de ventaja para el crecimiento que conduce a la conversión progresiva de células humanas normales en células cancerosas^{3,7}.

En la actualidad el cáncer es una patología conocida como una enfermedad Genética. Existen alteraciones en genes donde hay ganancia de función, que se denominan oncogenes. La mayoría de los oncogenes tienen su contraparte normal, la cual se les conoce como proto-oncogen que codifican proteínas que se encuentran involucradas en procesos biológicos como la proliferación celular, migración, diferenciación y disminución de la apoptosis. Los oncogenes son genes que promueven el crecimiento celular en ausencia de estímulos mitogénicos (autonomía). Los oncogenes pueden ser clasificados en 5 grupos basados en sus propiedades bioquímicas y funcionales, estos grupos son; factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento, transductores de señalización, factores de transcripción, y microRNAs. Dichos oncogenes pueden ser activados por los procesos antes mencionados de mutación, fusión génica, por yuxtaposición de elementos aumentadores o por amplificación⁸. Algunos de los ejemplos más representativos de oncogenes en diversos tipos de tumores (por ejemplo; cáncer de mama, pulmón, colon, GIST y leucemia entre otros) son los siguientes; BCR-ABL, C-KIT, EGFR y Her 2 Neu⁸. Dichos oncogenes han servido para la creación de drogas cuyo objetivo sea inhibir las

consecuencias de la activación de estas moléculas. Otra disfunción que también es relevante es la pérdida de Genes Supresores de Tumor (GST) ⁹ que son los encargados de salvaguardar el genoma y son la contraparte de los oncogenes sobre la apoptosis y proliferación celular.

Bibliografía:

1. Douglas Hanahan* and Robert A. Weinberg. The Hallmarks of Cancer Cell, Vol. 100, 57–70, January 7, 2000.
2. Renan, M.J. (1993). How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Mol. Carcinogenesis* 7, 139-146.
3. Foulds, L. (1954). *The Experimental Study of Tumor Progression. Volumes I–III* (London: Academic Press).
4. Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87, 159–170.
5. Hahn, W.C., Counter, C.M., Lundberg, A.S., Beijersbergen, R.L., Brooks, M.W., and Weinberg, R.A. (1999). Creation of human tumor cells with defined genetic elements. *Nature* 400, 464–468.
6. Bergers, G., Javaherian, K., Lo, K.-M., Folkman, J., and Hanahan, D. (1999). Effects of angiogenesis inhibitors on multistage carcinogenesis in mice. *Science* 284, 808–812.
7. Nowell, P.C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194, 23-28.
8. Carlo M Croce. Oncogenes and cancer. *NEJM* 2008; 358:502-511.
9. Diamandis, EP. Clinical applications of tumor suppressor genes and oncogenes in cancer: *Clinica Chimica Acta* 257 (1997) 157-180.
10. Douglas Hanahan* and Robert A. Weinberg. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, March 4, 2011.

El papel de la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina en la oncogénesis.

La fosforilación de proteínas en residuos de tirosina es uno de los más importantes acontecimientos postraduccionales que las células utilizan para regular respuestas celulares. La regulación de este proceso es crucial para varios efectos biológicos que incluyen la proliferación celular, diferenciación, migración y muerte celular. Además, representa un punto de control para la integración de señales extracelulares y su conversión en respuestas celulares. Los niveles en la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina se encuentran estrechamente controlados por una coordinada acción de dos tipos de enzimas llamadas proteínas tirosinas cinasas (PTK, del inglés protein tyrosine kinase) y las proteínas fosfatasas de tirosina (PTP, del inglés protein tyrosine phosphatases)¹. Las PTKs se encargan de añadir un grupo fosfato sobre residuos de tirosina de proteínas sustrato causando un cambio estructural y promoviendo las interacciones entre proteínas en las cascadas de señalización celular. La acción de las PTKs es equilibrada por la acción de las PTPs, las cuales se encargan de remover un grupo fosfato de un residuo de tirosina de una proteína sustrato. La alteración del balance normal entre la actividad de las PTK y las PTPs resulta en una fosforilación aberrante de residuos de tirosina, la cual ha sido ligada a la etiología de varias enfermedades humanas, incluyendo el cáncer²⁻⁵.

Bibliografía.

1. Zhong-Xing Jiang and Zhong-Yin Zhang. Targeting PTPs with small inhibitors in cancer treatment. *Cancer Metastases Rev.* 2008 June; 27(2): 263-272.
2. Hunter T. The Phosphorylation of proteins on tyrosine: its role in cell growth and disease. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci* 1998; 353:583-605.
3. Zhang Z-Y. Protein tyrosine Phosphatases: prospects for therapeutics. *Curr. Opin. Chem. Biol* 2001; 5:416-423.
4. Arena S, Benvenuti S, Bardelli A. Genetic analysis of the kinome and phosphatome in cancer. *Cell. Mol. Life Sci* 2005; 62: 2092-2099.
5. Ventura JJ, Nebreda AR. Protein kinases and phosphatases as therapeutic targets in cancer. *Clin. Transl. Oncol* 2006;8:153-160.

El papel de Her 2 Neu en cáncer de mama.

Los receptores de factores de crecimiento pueden ser constitutivamente activados por un exceso en los niveles del ligando, mutaciones activadoras o amplificación/sobreexpresión genética que conducen a una actividad inapropiada de la cinasa promoviendo el crecimiento y la activación de segundos mensajeros. Los receptores de factores de crecimiento juegan un papel esencial en iniciar ambas vías en cáncer de mama como son la proliferación y supervivencia. Estos receptores tienen una región extracelular que se une al ligando, una región transmembranal y un dominio intracelular con actividad de tirosina cinasa la cual activa diferentes cascadas de señalización.

El receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (Her 2/Neu o erbB2) es un miembro de una familia de receptores de tirosina cinasas que incluyen HER1 (receptor del factor de crecimiento epidérmico EGFR), HER 3 (erbB3) y HER4 (erbB4) y fue el gen primeramente descubierto por Weinberg y colaboradores en 1984¹ este se localiza en el cromosoma 17q y codifica una proteína transmembranal².

La familia de HER está involucrada en la regulación de un repertorio de procesos celulares diversos que controlan el crecimiento celular, supervivencia, diferenciación y migración^{3,4}.

Las proteínas HER existen en la membrana plasmática en un estado inactivado que se activa cuando su ligando se une, a excepción de HER 2 el cual no tiene ligando. La unión de ligando y receptor produce un cambio conformacional que induce la formación de homodímeros o heterodímeros. Los heterodímeros con HER 2 parecen ser más potentes en promoción de la señalización que los homodímeros⁴. La dimerización induce fosforilación de residuos de tirosina altamente conservados dentro del dominio citoplásmico del receptor³, estos dominios sirven como puntos de anclaje para proteínas adaptadoras y ligan al receptor con

conexiones y señales río debajo de supervivencia y proliferación (como por ejemplo PI3K, MAPK)³. A diferencia de otros miembros de la familia HER, el HER2 está constitutivamente activo y puede someterse a dimerización no dependiente de ligando y se asocia preferentemente a otros miembros de la familia de proteínas HER⁶. Por ejemplo, HER 3 contiene 6 sitios de unión para la subunidad catalítica p85 de PI3K, haciéndolo el más potente activador de la vía de supervivencia PI3K entre todos los miembros de la familia HER. Como consecuencia los heterodímeros formados por HER2/HER3 son potentes mediadores de señales de supervivencia⁷. Se ha documentado redundancia y comunicación cruzada entre receptores y vías de señalización lo que ocasiona crecimiento y supervivencia de tumores epiteliales mamarios (**Figura 3**).

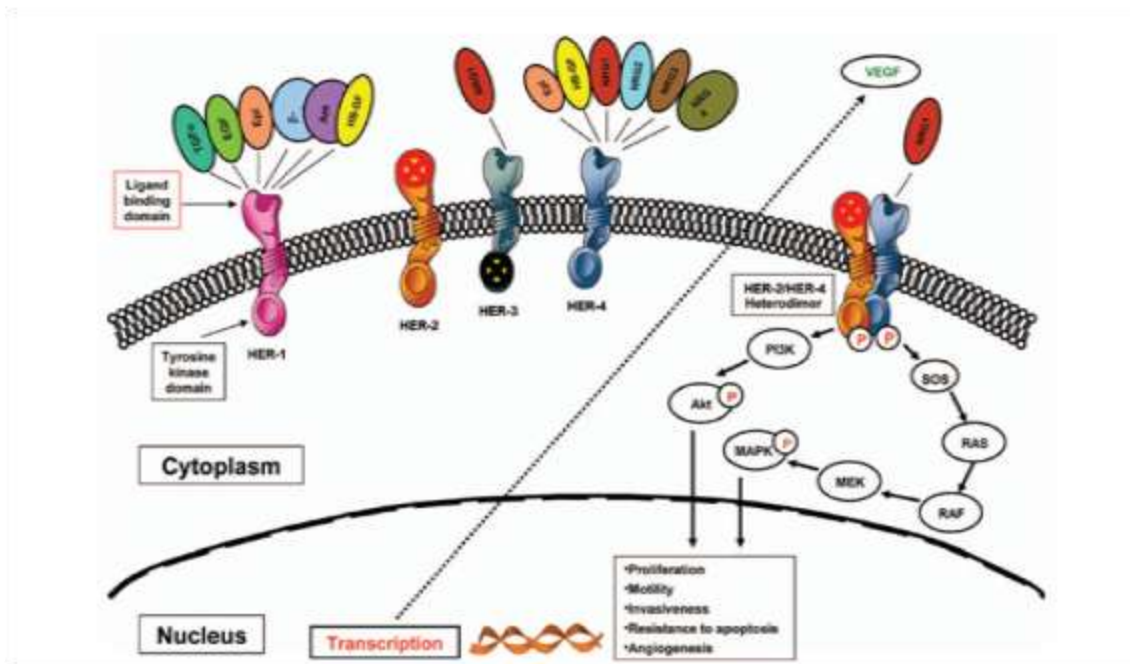


Figura 3. (Referencia numero 12) La familia HER. Esta imagen muestra la compleja conexión cruzada entre los miembros de la familia HER de receptores de tirosina cinasas y su señalización intracelular. El receptor HER 2 no tiene ligando conocido y el HER3 le falta un dominio tirosina cinasa. La señalización mediada por HER está asociada a proliferación, motilidad, resistencia a la apoptosis e invasividad, angiogénesis acelerada¹².

El gen *her 2/erb-b2/neu* codifica una proteína de 185kD. Su sobreexpresión, debida a la amplificación del número de copias de este gen, ocurre en 25 a 35% de los casos de carcinoma mamario y aumenta el riesgo de recurrencia y el comportamiento agresivo del tumor^{8,9,10}. También, se ha asociado a aumento de la proliferación, motilidad, invasividad y metástasis, angiogénesis acelerada y apoptosis reducida¹¹. Cuando son clasificados por parámetros clínico-patológicos rutinarios los canceres de mama HER 2 +++ son comúnmente de grado intermedio a alto, son habitualmente receptores hormonales negativos y tienden a tener metástasis a ganglios linfáticos al momento de la presentación¹. Además, la sobreexpresión de esta molécula se asocia a una sobrevida global y libre de progresión disminuida en pacientes con cáncer de mama^{13,14}. También, e ha asociado con una alta frecuencia de resistencia al tratamiento antihormonal en pacientes con receptores de estrógeno positivos y a los esquemas tradicionales de quimioterapia^{15,16}. Las metodologías con mayor aceptación para el estudio de la expresión de la proteína Her2/Neu son la inmunohistoquímica y la hibridización *in situ* con fluorescencia, para demostrar el número de copias del gen. Ambas metodologías muestran buena concordancia¹⁷ (**Figura 4**)

12.

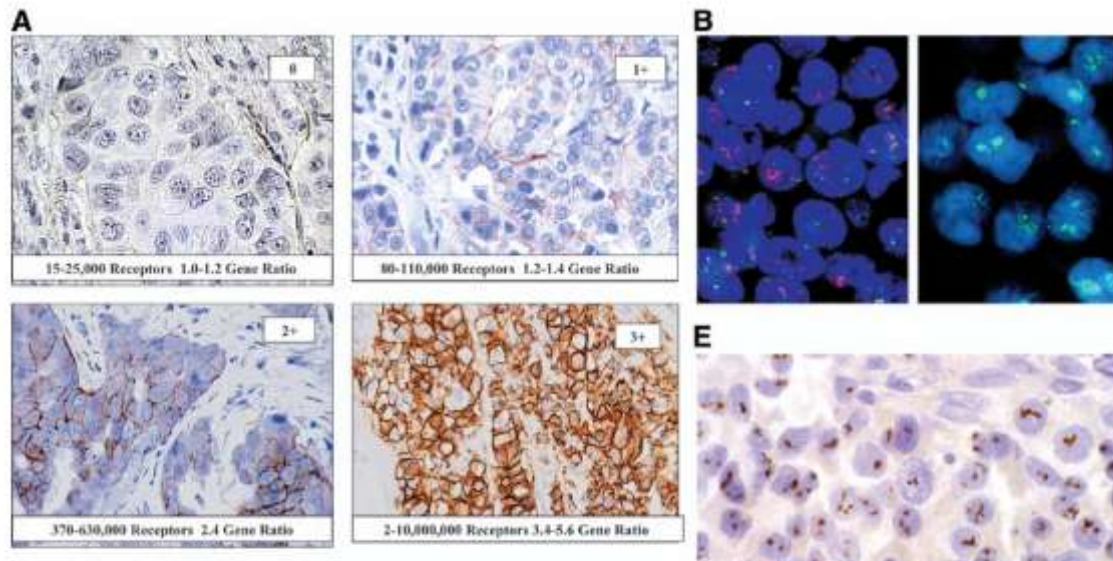


Figura 4. Pruebas diagnósticas de Her 2. (A): Inmunohistoquímica(IHC). Este panel muestra cuatro categorías que incluyen 0y 1 (negativos), 2 (intermedio) y 3 (positivos) usando las guías de ASCO y CAP (American Society of Clinical Oncology–College of American Pathologists guidelines for HER-2 IHC scoring). (B): Fluorescence in situ hybridization (FISH). Este panel no muestra amplificación de HER2 en la fotografía de la izquierda y amplificación positiva del lado derecho.

En la clasificación original del cáncer de mama molecular usando microarreglos de DNA densos basados en la cuantificación relativa de RNA mensajero, los tumores positivos para HER 2 caen dentro de múltiples clases incluyendo los grupos luminales, pero no las categorías normales o triples negativos. El gen de HER 2 es típicamente amplificado como parte de un amplicon que incluye múltiples genes adyacentes¹⁸ (Figura 5).

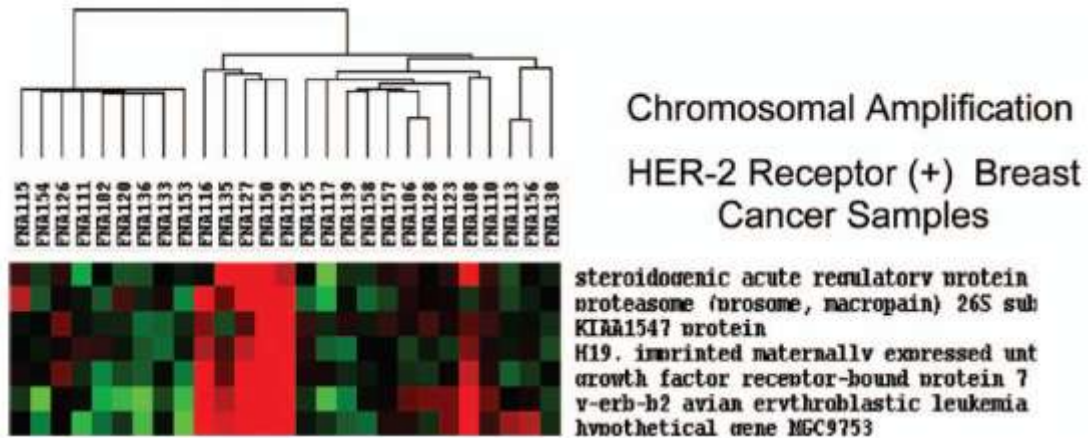


Figura 5. Microarreglos de DNA. En esta imagen, se muestra el incremento de mRNA de Her2 en un caso positivo de cáncer de mama (Millennium Pharmaceuticals, Inc., Cambridge, MA).

Por lo anterior, HER 2 se convirtió en un posible blanco terapéutico atractivo. Su inhibición con el trastuzumab, fue el primer agente biológico aprobado para el tratamiento del cáncer de mama diseñado en contra del dominio extracelular de HER2. En varios estudios la amplificación o sobreexpresión de HER 2 ha mostrado ser un marcador independiente de respuesta al tratamiento con trastuzumab. En el contexto adyuvante, 5 estudios aleatorios han mostrado que la adición del trastuzumab a la quimioterapia reduce la tasa de recurrencia en un 50% y mejora la supervivencia global¹⁹⁻²³ (**figura 6**). Esto también se ha documentado en el contexto metastásico²⁴.

BENEFICIO DEL TRASTUZUMAB (SG)!

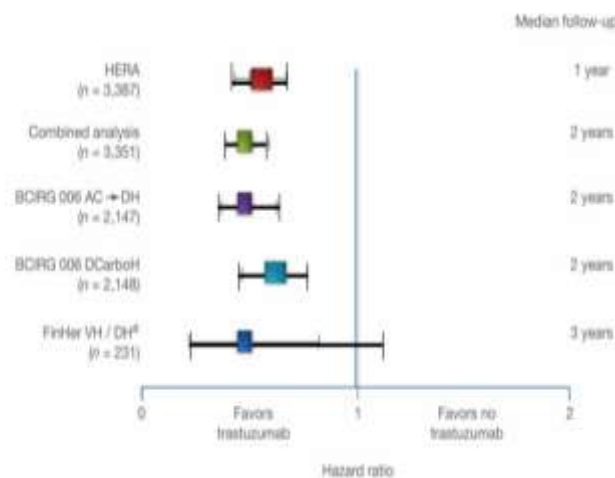


Figura 6. Beneficio del trastuzumab en sobrevida global (Oncologist 2006).

La actividad del trastuzumab provee la prueba del principio que la inhibición de HER 2 es un objetivo válido para la terapia con drogas nuevas. Potencialmente, la señalización mediada por Her 2 puede ser bloqueada por 1 o más sitios a lo largo de la vía de señalización, tales son los anticuerpos que se unen al dominio extracelular (trastuzumab), o bloqueando el paso de dimerización de HER2 (pertuzumab), por la inhibición de la cinasa con las moléculas pequeñas (lapatinib) (**figura 7**). El lapatinib compite con el ATP en su sitio de unión en el asa de activación de cinasas blanco y ha mostrado su actividad en múltiples ensayos clínicos²⁵. Debido a lo anterior la terapia anti-Her 2 se ha vuelto parte del tratamiento estándar para las pacientes que sobreexpresan este gen.



Figura 7. Muestra algunos de los fármacos anti HER que se encuentran en ensayos clínicos.

Bibliografía.

1. Schechter AL, Stern DF, Vaidyanathan L et al. The neu oncogene: An erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature* 1984;312: 513–516.
2. Ross JS, Fletcher JA, Bloom KJ et al. Targeted therapy in breast cancer: The HER-2/neu gene and protein. *Mol Cell Proteomics* 2004;3:379 –398.
3. Yarden Y, Sliwkowski MX: Untangling the ErbB signaling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:127-137, 2001.
4. Park JW, Neve RM, Szollosi J, et al: Unraveling the biologic and clinical complexities of HER2. *Clin Breast Cancer* 8:392-401, 2008.
5. Pinkas-Kramarski R, Soussan L, Waterman H, et al: Diversification of Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions. *EMBO J* 15:2452-2467, 1996.
6. Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM, et al: ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J* 16:1647-1655, 1997.
7. Hellyer NJ, Cheng K, Koland JG: ErbB3 (HER3) interaction with the p85 regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase. *Biochem J* 333:757- 763, 1998.
8. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the Her2-Neu oncogene. *Science* 1987;235:177-82.
9. Batifora H, Gaffey M, Esteban M, Mehta P, Bailey A, et al. Immunohistochemical assay of Neu/erbB-2 oncogene product in paraffin embedded tissues in early breast cancer. Retrospective follow up study of 245 stage I and II cases. *Mod Pathol* 1991;4:466-74.
10. Muss HB, et al. CerbB-2 expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer. *N Engl J Med* 1994;330:1260-6.
11. Moasser MM. The oncogene HER2: Its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene* 2007;26: 6469–6487.

12. Jeffrey s. Ross, Elzbieta a. Slodkowska, W. Fraser Symmans, Lajos Puztai, peter M. Ravdin, Gabriel N. Hortobagyi. The HER-2 Receptor and Breast Cancer: Ten Years of Targeted Anti-HER-2 Therapy and Personalized Medicine. *The Oncologist* 2009;14:320-368.
13. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989;244:707-12.
14. Pegram M, Slamon D. Biological rationale for HER2/neu (c-erbB2) as a target for monoclonal antibody therapy. *Semin Oncol* 2000;27(5 Suppl 9):13-9.
15. McGuire WL, et al. Role of steroid hormone receptors as prognostic factors in primary breast cancer. *Natl Cancer Inst Monogr* 1986;1:19-23.
16. Ligibel JA, Winer EP. Trastuzumab/chemotherapy combinations in metastatic breast cancer. *Semin Oncol* 2002;29(3 Suppl 11):38-43.
17. Jacobs TJ, Gown AM, Yaziji H, Barnes Schini SJ. Comparison of *in situ* hybridization for Her2-Neu and immunohistochemistry for the evaluation of Her2-Neu in breast cancer. *J Clin Oncol* 1999;17:1974-8.
18. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000;406:747-752.
19. Romond EH, Perez EA, Bryant J, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER-2-positive . *N Engl J Med* 2005;353(16):1673.
20. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER-2-positive . *N Engl J Med* 2005;353(16):1659.
21. Joensuu H, Kellokumpu-Lehtinen PL, Bono P, et al. Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab for . *N Engl J Med* 2006;354(8):809.
22. Slamon D, Eirmann W, Robert N, et al. Phase III trial comparing AC-T with AC-TH and with TCH in the adjuvant treatment of HER2 positive early patients: second interim efficacy analysis. *Res Treat* 2006;100(Suppl 1) (abst 52).
23. Smith I, Procter M, Gelber RD, et al. 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive : a randomised controlled trial. *Lancet* 2007;369(9555):29.
24. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001;344:783-792.
25. Vivek Roy, Edith A. Perez. Beyond trastuzumab: small molecule tyrosine kinase inhibitors in HER 2 positive breast cancer. *The Oncologist* 2009;14:1061-1069.

El papel de la fosforilación de proteínas.

La fosforilación de proteínas en residuos de tirosina juega un papel importante en diferentes vías de señalización que regulan diversas funciones celulares, las cuales incluyen proliferación, diferenciación, supervivencia, apoptosis y motilidad. El nivel de fosforilación es controlado por dos tipos de enzimas que catalizan reacciones opuestas¹. La alteración del balance normal entre la actividad de las PTK y las PTPs resulta en una fosforilación aberrante de residuos de tirosina, la cual ha sido ligada a la etiología de varias enfermedades humanas, incluyendo el cáncer²⁻⁵.

Familia de proteínas fosfatasas de tirosina.

Las PTPs constituyen una gran familia estructuralmente diversa, altamente regulada y que pueden tener efectos estimulatorios o inhibitorios⁶. En el genoma humano se han identificado un total de 107 PTPs⁷, las cuales están divididas en receptores y no receptores⁸ como se muestra en la (**figura 8**).

El dominio catalítico de las PTPs contiene aproximadamente 280 aminoácidos y presentan un residuo de cisteína conservado que es requerido para la actividad catalítica. La defosforilación de los sustratos ocurre a través de un mecanismo de 2 pasos que consiste en la formación de un intermediario que se forma a través de un enlace covalente de fosfato-PTP que subsecuentemente se hidroliza. La defosforilación por las PTPs ocurre con un alto grado de especificidad⁶.

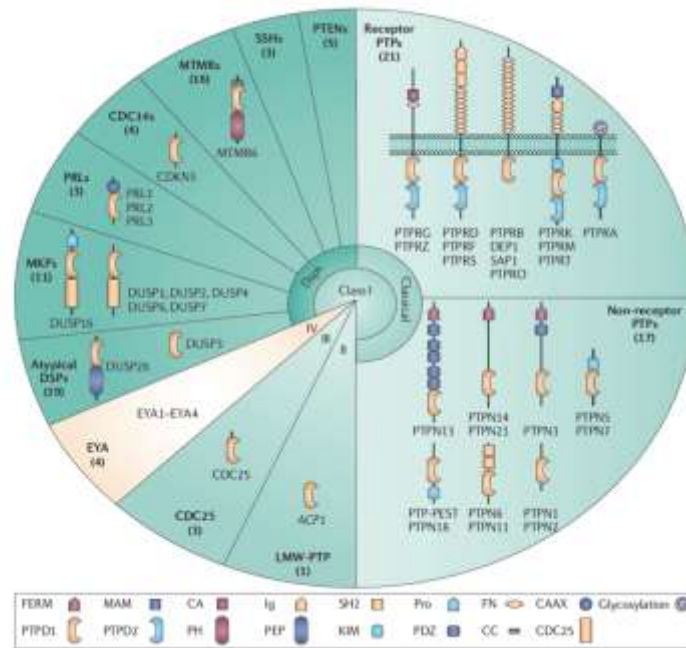


Figura 8. La superfamilia de las PTPs y el cáncer humano. La figura muestra algunas de los 107 miembros de la superfamilia de las PTPs divididos en cuatro clases sobre la base de secuencia de aminoácidos del dominio catalítico. Solo son mostradas las PTPs que han sido descritas en neoplasias malignas humanas. Las clases de PTPs están definidas sobre las bases de una firma del dominio catalítico, (H/V)C(X)R(S/T), en los cuales los residuos de cisteína y arginina son invariables y esenciales para la actividad enzimática de las clases I, II, III (verde). Por otro lado, los miembros de la clase IV (crema) usan un diferente mecanismo en el cual el ácido aspártico es un elemento clave para la catálisis.

La función principal de las PTPs es revertir la acción de fosforilación de las PTKs. Algunos de los miembros de la familia de las PTPs son productos de genes supresores tumorales^{1,6}. El ejemplo clásico es PTEN, que fue la primer PTP que se demostró ser un gen supresor tumoral. Se han reportado mutaciones que inactivan la actividad de fosfatasa de PTEN en varias tipos de neoplasias, las cuales incluyen cerebro, mama y próstata⁹. Además, las PTPs pueden potenciar acciones de las PTKs^{1,6}. Este modo de sinergia aumenta las señales mitogénicas conduciendo a transformación y proliferación celular¹⁰ como se muestra en la (figura 9).

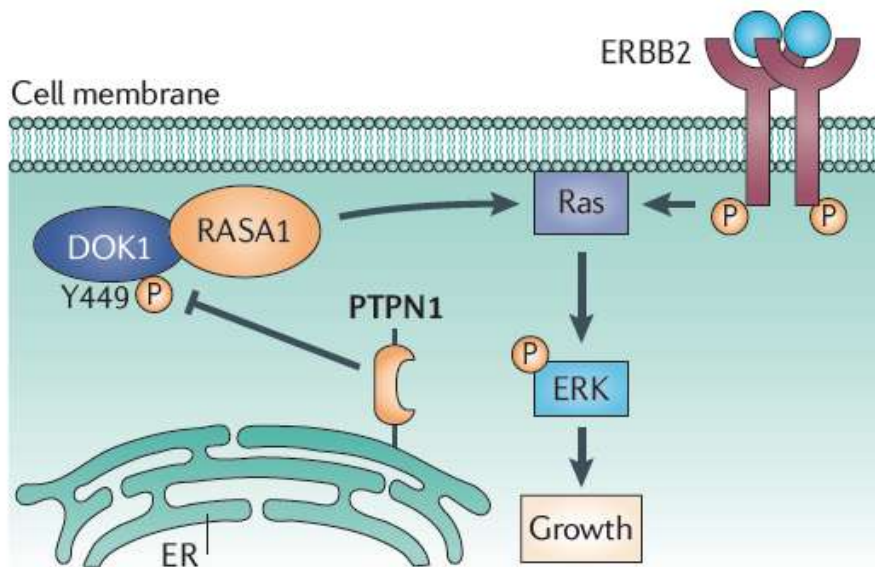


Figura 9. Mecanismos de función oncogénica de las PTPs en cáncer. La PTP tipo no receptor 1 (PTPN1 también conocida como PTP1B) defosforila Y 449 de el docking protein 1 (DOK 1 o también conocido como p62DOK), el cual previene la inhibición de la actividad de Ras conduciendo a una disminución de la apoptosis e incremento de la proliferación a través de vía de señalización de MAPK en células de cáncer de mama¹⁰.

Debido a lo anterior, parece ser que las vías celulares reguladas por la fosforilación y defosforilación de los residuos de tirosina pueden ofrecer un gran recurso de terapia blanco para el desarrollo de nuevos y mejores tratamientos¹¹. El desarrollo de moléculas pequeñas que actúan como inhibidores que bloquean la actividad de un estrecho espectro de PTKs han tenido un impacto significativo en el tratamiento de algunas neoplasias con menor toxicidad de los agentes quimioterapéuticos^{12,13}. Dado el papel crítico de las PTPs en la señalización celular y el hecho que alteraciones en su regulación también contribuyan a la patogénesis del cáncer, los fármacos inhibidores de las PTPs podrían tener un valor terapéutico importante^{4,6}.

La PTP1B y la TC-PTP son las primeras PTPs identificadas, son del tipo no receptor. Inicialmente se pensó que tenían propiedades anti-oncogénicas a través de regulación

negativa de la actividad oncogénica las PTKs¹⁴. Sin embargo, datos recientes han demostrado que estas fosfatasas se encuentran involucradas en la regulación positiva de vías de señalización en cáncer⁶. La PTP1B es un regulador positivo de la señalización de Ras, lo cual fue demostrado en fibroblastos de ratones deficientes de PTP1B (PTP1B -/-)¹⁵. Además, la PTP1B esta sobreexpresada en varios canceres en asociación con expresión de oncoproteínas¹⁶⁻¹⁸. La sobreexpresión de TC-PTP sola o con PTP1B también ha sido observada en carcinoma de células escamosas¹⁸. Algunos estudios recientes han mostrado que PTP1B participa en la vía de Her 2 en la iniciación de la tumorigénesis en cáncer de mama^{10,19,20}. La inhibición de la expresión de PTP1B fue asociada con la disminución de la fosforilación de ERK, sugiriendo que participa en esta vía de señalización en la tumorigénesis de mama^{10,19,20}.

PTP1B.

La PTP1B fue purificada de la placenta humana y tiene un peso de 50kD, contiene un dominio catalítico de 37kD²¹ hacia su extremo N-terminal (residuos 1-300) seguido de una región reguladora de cerca de 80-100 residuos y un dominio de localización en la membrana (residuos 400-435) que ancla la enzima a la cara citoplasmática del retículo endoplasmico^{22,23}. La enzima es expresada abundantemente y tiene una robusta actividad catalítica que, bajo muchas circunstancias, es estrechamente controlada. Además, de su localización en la superficie del retículo endoplásmico, que puede restringir su acceso a los sustratos, existen otros cuatro mecanismos, que operan en tándem para regular la actividad de PTP1B y son la oxidación, fosforilación, sumoilación y proteólisis (**figura 10**)²⁴.

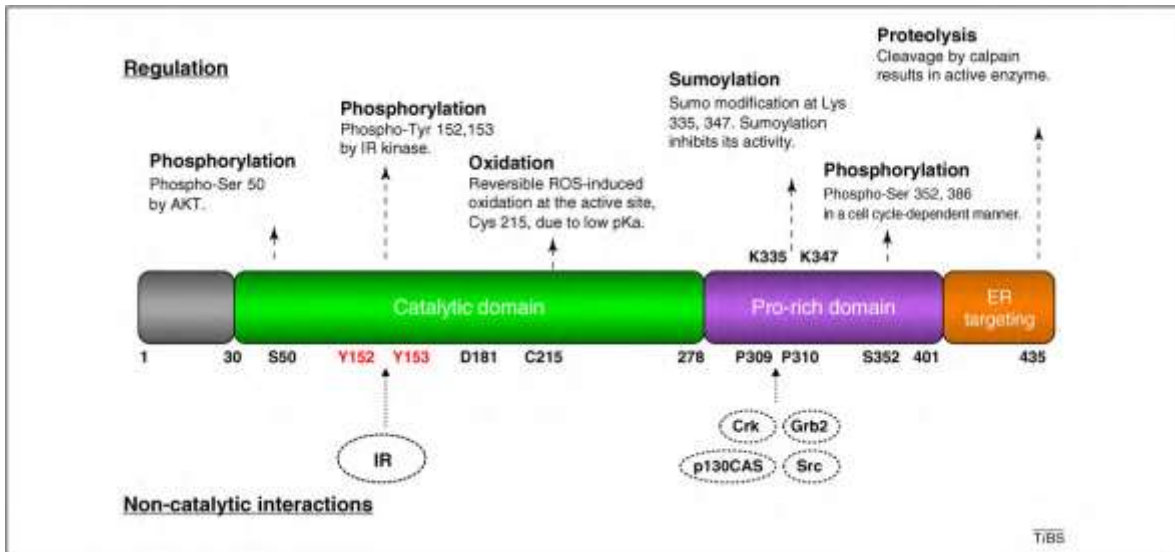


Figura 10. Dominios estructurales y regulación de PTP1B. Representación esquemática. La PTP1B humana en su longitud completa está compuesta por un dominio catalítico N-terminal (en verde) y un dominio C-terminal cuyo objetivo es el retículo endoplásmico (en naranja) y a un lado dos dominios ricos en prolina (PRD: 278-401 AA; en morado) de los cuales al menos 1 es crucial para las interacciones proteína-proteína. La PTP1B es regulada por la fosforilación en los sitios Y152 y Y153, fosforilación en serina en los sitios indicados, además de la oxidación del sitio activo de Cys215, sumoilación en su sitio PRD y proteólisis por calpaina.

PTP1B juega un papel clave en la señalización de vías metabólicas y es un blanco terapéutico prometedor para la diabetes mellitus 2 y la obesidad. Esta proteína participa en la regulación negativa en la señalización de la insulina y la leptina. La delección del gen de *ptpn1* en ratones causa hipersensibilidad a la insulina y está asociada con un incremento marcado de la fosforilación de tirosina del receptor de insulina y sus blancos²⁶⁻²⁸. La PTP1B también puede inhibir la señalización de otros RTKs tales como los receptores de PDGF y HGF²⁹⁻³². Mientras que la sobreexpresión de PTP1B en fibroblastos inhibe la transformación por oncogenes que incrementan la fosforilación de tirosinas incluyendo ErbB2, Src, Bcr-Abl, Crk, y Ras³³⁻³⁵. También es requerida para la activación de las GTPasas de RAC y RAS (enzimas asociadas con incremento de proliferación y motilidad)¹⁵. Además, también parece activar a Src mediante defosforilación del sitio

inhibitorio (Y527) localizado hacia el extremo carboxilo terminal de la cinasa³⁶⁻³⁸. La PTP1B se encuentra localizada dentro del mapa genético en el cromosoma 20 en la región q13.1-q13.2^{39,40}. La ganancia o amplificación de la región del cromosoma 20q13 también ha sido observada en varios cánceres⁴¹⁻⁴⁴ y está asociada con pobre pronóstico en cáncer de mama⁴⁵ (**Figura 11**).

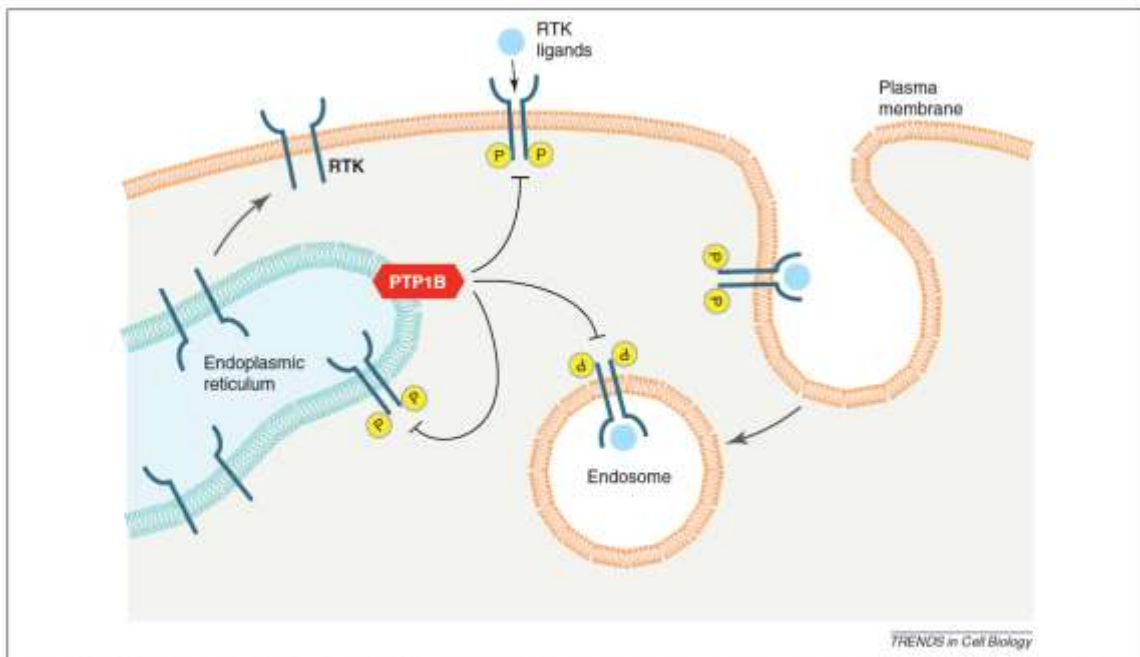


Figura 11.- Sitios de regulación de los receptores de tirosina cinasa (RTK) por PTP1B y su ubicación en la célula. Cuando en la superficie de la célula los RTKs se fosforilan en sus dominios intracelulares por la activación de sus ligandos específicos, la PTP1B defosforila los RTKs activados en sitios de contacto entre el retículo endoplásmico y la membrana plasmática o muy cerca del retículo endoplásmico cuando se internalizan los RTKs.

El modelo murino de PTP1B ^{-/-} resiste la transformación por el oncogén ErbB2 y la sobreexpresión transgénica de PTP1B en células mamarias es oncogénica^{10,19}. Además de activar a Src también inactiva a p62^{Dok}⁴⁶, que constituyen dos vías que promueven crecimiento y son reguladas positivamente por PTP1B. En resumen, podemos decir que

PTP1B tiene una función como regulador negativo de la señalización de leptina e insulina y que al parecer muestra propiedades que favorecen la tumorigénesis en ciertos tumores en especial cáncer de mama HER 2 aunque su rol exacto se desconoce. Sin embargo, estas características duales la convierten en un blanco atractivo para el tratamiento de la obesidad, diabetes y cáncer de mama. En la **figura 12** se describe la implicación de PTP 1B en las vías de señalización implicadas en el metabolismo y cáncer²⁴.

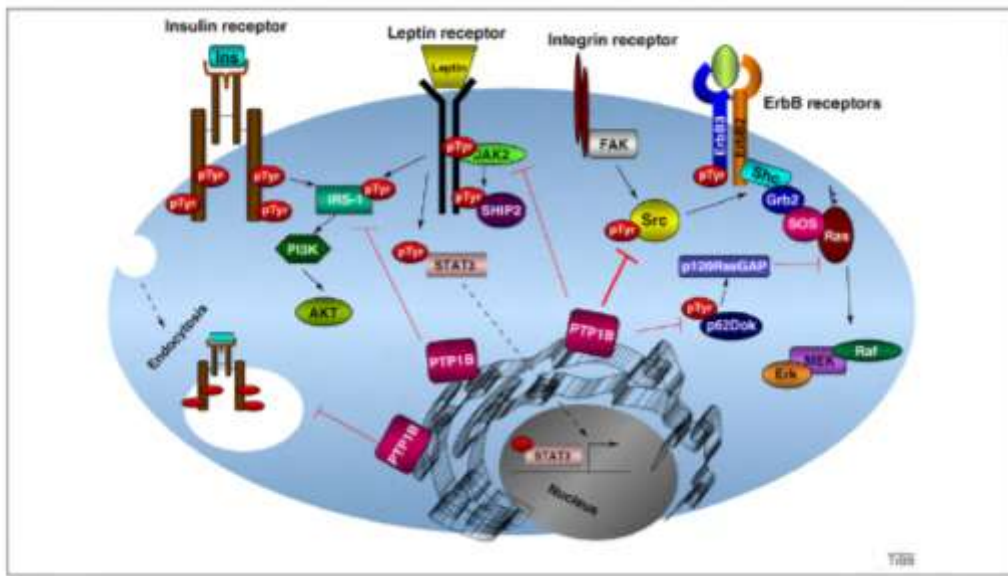


Figura 12. Señalización metabólica y oncogénica de PTP1B. La fosfatasa PTP1B (línea rosa oscuro) ejerce un rol negativo en las vías de señalización de la insulina y la leptina, y un efecto positivo sobre la tumorigénesis inducida por HER2 en cáncer de mama (modelos preclínicos). La PTP1B atenúa la señalización de la insulina seguida por endocitosis del receptor y la defosforilación de IRS-1. También inhibe la transcripción mediada por JAK2-STAT 3. Con respecto al papel oncogénico la PTP1B defosforila a p62^{DOK} el cual inhibe a p^{120Ras Gap} aumentando así la proliferación por la de Ras-MAPK. También defosforila a Y529 de Src conduciendo a la subsecuente activación de pequeñas GTPasas tales como Ras y Rac.

Bibliografía.

1. Zhong-Xing Jiang and Zhong-Yin Zhang. Targeting PTPs with small inhibitors in cancer treatment. *Cancer Metastases Rev.* 2008 June; 27(2): 263-272.
2. Hunter T. The Phosphorylation of proteins on tyrosine: its role in cell growth and disease. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci* 1998; 353:583-605.
3. Zhang Z-Y. Protein tyrosine Phosphatases: prospects for therapeutics. *Curr. Opin. Chem. Biol* 2001; 5:416-423.
4. Arena S, Benvenuti S, Bardelli A. Genetic analysis of the kinome and phosphatome in cancer. *Cell. Mol. Life Sci* 2005; 62: 2092-2099.
5. Ventura JJ, Nebreda AR. Protein kinases and phosphatases as therapeutic targets in cancer. *Clin. Transl. Oncol* 2006;8:153-160.
6. Arne Ostman, Carrina Hellberg and Frank D. Bohmer. Protein-tyrosine phosphatases and cancer. *Nature Rev.* 2006; 6: 307-320.
7. Alonso, A. Et al. Protein tyrosine Phosphatases in the human genome. *Cell* 2004; 117: 699-711.
8. Andersen, J. N. et al. Structural and evolutionary relationships among protein tyrosine phosphatase domains. *Mol. Cell. Biol.* 2001; 21: 7117-7136.
9. Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI et al. PTEN , a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human, brain, breast and prostate cancer. *Science* 1997;275:1943-1947.
10. Julien, S. G. et al. Protein tyrosine phosphatase 1B deficiency or inhibition delays ErbB2-induced mammary tumorigenesis and protects from lung metastasis. *Nature Genet.* 39, 338–46 (2007).
11. Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signaling. *Nature* 2001; 411:355-365.
12. Druker BJ. Imatinib as a paradigm of targeted therapies. *Adv. Cancer Res* 2004;91:1-30.
13. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl. J. Med* 2004; 350:2129-2139.
14. N.K. Tonks, Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7 (2006) 833–846.
15. N. Dube, A. Cheng, M.L. Tremblay, The role of protein tyrosine phosphatase 1B in Ras signaling, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004) 1834–1839.
16. J.R. Wiener, J.A. Hurteau, B.J. Kerns, R.S. Whitaker, M.R. Conaway, A. Berchuck, R.C. Bast Jr., Overexpression of the tyrosine phosphatase PTP1B is associated with human ovarian carcinomas, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 170 (1994) 1177–1183.
17. J.R. Wiener, B.J. Kerns, E.L. Harvey, M.R. Conaway, J.D. Iglehart, A. Berchuck, R.C. Bast Jr., Overexpression of the protein tyrosine phosphatase PTP1B in human breast cancer: association with p185c-erbB-2 protein expression, *J. Natl. Cancer Inst.* 86 (1994) 372–378.
18. L.B. Nanney, M.K. Davidson, R.E. Gates, M. Kano, L.E. King Jr., Altered distribution and expression of protein tyrosine phosphatases in normal human skin as compared to squamous cell carcinomas, *J. Cutan. Pathol.* 24 (1997) 521–532.

19. M. Bentires-Alj, B.G. Neel, Protein-tyrosine phosphatase 1B is required for HER2/Neu-induced breast cancer, *Cancer Res.* 67 (2007) 2420–2424.
20. L.E. Arias-Romero, S. Saha, O. Villamar-Cruz, S.C. Yip, S.P. Ethier, Z.Y. Zhang, J.Chernoff, Activation of Src by protein tyrosine phosphatase 1B is required for ErbB2 transformation of human breast epithelial cells, *Cancer Res.* 69 (2009) 4582–4588.
21. Tonks NK, Diltz CD, Fischer EH. Purification of the major protein tyrosine phosphatases of human placenta. *J. Biol. Chem.* 1988; 263: 6722-6730.
22. Frangioni, J.V. et al. (1992) The nontransmembrane tyrosine phosphatase PTP-1B localizes to the endoplasmic reticulum via its amino acid C-terminal sequence. *Cell* 68, 545–560.
23. Woodford-Thomas, T.A. et al. (1992) Expression of a protein tyrosine phosphatase in normal and v-src-transformed mouse 3T3 fibroblasts. *J. Cell Biol.* 117, 401–414.
24. Yip SC, Saha S, Chernoff J. 15. PTP1B: a double agent in metabolism and oncogenesis. *Trends Biochem Sci.* 2010 Aug;35(8):442-9. Epub 2010 Apr 8. Review.
25. Matthew Stuble, Michell Tremblay In control at the ER:PTP1B and the down-regulation of RTKs by dephosphorylation and endocytosis. *Trends in Cell Biology* xx(2010)1–8. Article in press.
26. Bourdeau A, Dube N, Tremblay ML. Cytoplasmic protein tyrosine phosphatases, regulation and function: the roles of PTP1B and TC-PTP. *Curr Opin Cell Biol* 2005;17:203–9.
27. Elchebly M, Payette P, Michaliszyn E, et al. Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science* 1999; 283:1544–8.
28. Klamann LD, Boss O, Peroni, OD, et al. Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B deficient mice. *Mol Cell Biol* 2000;20:5479–89.
29. Liu F, Chernoff J. PTP1B associates with and is tyrosine phosphorylated by epidermal growth factor receptor in cultured cells. *Biochem J* 1997;327:139–45.
30. Haj FG, Markova B, Klamann LD, Bohmer FD, Neel BG. Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatase-1B. *J Biol Chem* 2003;278: 739–44.
31. Lammers R, Bossenmaier B, Cool DE, et al. Differential activities of protein tyrosine phosphatases in intact cells. *J Biol Chem* 1993;268:22456–62.
32. Kakazu A, Sharma G, Bazan HE. Association of protein tyrosine phosphatases (PTPs)-1B with c-Met receptor and modulation of corneal epithelial wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:2927–35.
33. Brown-Shimer S, Johnson KA, Hill DE, Bruskin AM. Effect of protein tyrosine phosphatase 1B expression on transformation by the human neu oncogene. *Cancer Res* 1992;52:478–82.
34. LaMontagne KRJ, Hannon G, Tonks NK. Protein,tyrosine phosphatase PTP1B suppresses p210 bcr-ablinduced transformation of rat-1 fibroblasts and promotes differentiation of K562 cells. *Proc Natl Acad Sci U SA* 1998;95:14094–9.
35. Liu F, Chernoff J. Suppression of oncogene-mediated transformation of rat 3Y1 fibroblasts by protein tyrosine phosphatase 1B requires a functional SH3-ligand. *Mol Cell Biol* 1998;18:250–9.

36. Bjorge JD, Pang A, Fujita DJ. Identification of protein tyrosine phosphatase 1B as the major tyrosine phosphatase activity capable of dephosphorylating and activating c-Src in several human breast cancer cell lines. *J Biol Chem* 2000;275:41439–46.
37. Anderie I, Schulz I, Schmid A. Direct interaction between ER membrane-bound PTP1B and its plasma membrane-anchored targets. *Cell Signal* 2007;19:582–92.
38. Liang F, Lee SY, Liang J, Lawrence DS, Zhang ZY. The role of protein-tyrosine phosphatase 1B in integrin signaling. *J Biol Chem* 2005;280:24857–63.
39. S. Brown-Shimer, KA, Johnson, JB. Lawrence, C Johnson, A Bruskin, NR Green, DE, Hill. Molecular cloning and chromosome mapping of the human gene encoding protein phosphotyrosyl phosphatase 1B, *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 87 (1990) 5148-5152.
40. P.A. Forsell, Y Boie, J Montalibet, S Collins, BP. Kennedy. Genomic characterization of the human and mouse protein tyrosine phosphatase-1B genes, *Gene* 260(2000) 145-153.
41. D.J. Schaid. The complex genetic epidemiology of prostate cancer. *Hum Mol Genet* 13 (Spec No 1) 2004 R103-R121.
42. T. Nishizaki, S. Ozaki, K Harada, H Arai. Investigation of genetic alterations associated with the grade of astrocytic tumor by comparative genomic hybridization, *Genes Chromosomes Cancer* 21 (1998) 340-346.
43. T. Furukawa, M. Sunamura, A. Horii, Molecular mechanisms of pancreatic carcinogenesis, *Cancer Sci*, 97 (2006) 1-7.
44. T. Nishinamura, Total number of genome alterations in sporadic gastrointestinal cancer inferred from pooled analyses in the literature. *Tumor Biol.* 29 (2008) 343-350.
45. MM. Tanner, M. Tirkkonen, A. Kallioniemi, J. Isola, et al. Independent amplification and frequent co-amplification of three nonsyntenic regions on the long arm of chromosome 20 in human breast cancer. *Cancer Res.* 56 (1996) 3441-3445.
46. Tonks NK, Muthuswamy SK. A brake becomes an accelerator: PTP1B-a new therapeutic target for breast cancer. *Cancer Cell* 2007;11:214–6.

Planteamiento del problema

- PTP1B se ha asociado a la progresión y metástasis en líneas celulares de cáncer de mama y modelos murinos.
- Es relevante conocer los mecanismos por los cuales esta molécula ejerce su efecto en Her2/Neu en células de cáncer de mama.

Justificación

- Debido a que el cáncer de mama es una enfermedad con gran prevalencia a nivel mundial, el entendimiento de las bases moleculares de esta enfermedad es de gran relevancia para el desarrollo de nuevos marcadores pronósticos y de predicción, así como nuevos tratamientos.
- Se han cumplido 30 años de la investigación de la regulación de la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina. En estas 3 décadas se encuentra poco explorado el papel de las PTPs. Por lo cual, su estudio puede ser de un gran potencial en la clínica (pronóstico o terapéutico).

Objetivo general

Evaluar el efecto de PTP1B en la modulación de la expresión de Her2 en líneas celulares y cultivos primarios de cáncer de glándula mamaria.

Objetivos específicos

- Sobre-expresar la PTP1B en su forma silvestre y la mutante D181A.
- Evaluar si la sobreexpresión de PTP1B modula la expresión de Her 2 en líneas celulares y cultivos de cáncer de glándula mamaria.
- Evaluar cómo afecta la sobreexpresión de PTP1B la señalización de Her2/Neu en células de cáncer de mama.

Hipótesis.

- PTP 1B modula la expresión de Her2 y/o algunos de sus elementos de señalización río abajo, como c-Src y MAPKs, en células tumorales de glándula mamaria lo cual puede contribuir a una mayor agresividad de las células de este tipo de tumor.

Material y Métodos.

Cultivo de células de cancer de glandula mamaria.

Cultivo de células de cancer de glandula mamaria. El cultivo celular MBCD5-B3, MBCDF fue generado a partir de explantes derivados de una biopsia obtenida a partir de una mastectomia radical (Protocolo aprobado por el comité de etica del Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutricion Salvador Zubiran referencia 159). Brevemente el tejido fue cortado en trozos pequeños y sembrados como explantes en RPMI-1640 suplementado al 10% de suero fetal bovino. Las celulas se dejaron crecer hasta que llenaron el plato de cultivo. Estas células fueron tripsinizadas y mantenidas como cualquier otra linea celular . La inmortalización se asumio despues de mantenerse en crecimiento continuo in vitro por mas de dos meses.

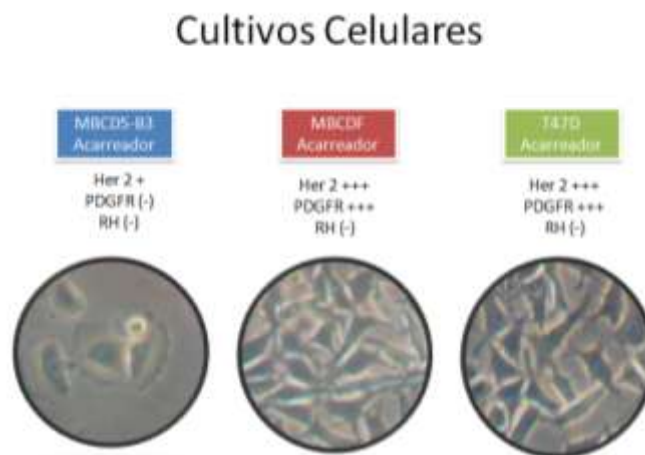


Figura 13. Cultivos celulares y el fenotipo de expresión de receptores.

Purificación de plásmidos.

Los plásmidos pcDNA4A, pcDNA4 myc-PTP1B wt y pcDNA4 myc-PTP1B D181A mediante el kit de purificación de plásmidos de la marca QIAGEN de acuerdo al protocolo indicado por el fabricante. Brevemente, 500ml de cultivo de bacteria se centrifugaron a 6000 rpm. Se retiro sobrenadante y se resuspendieron las células en 10 ml de buffer P1. Se adicionó 10 ml de buffer P2 y se agitó por inversión. Posteriormente, se pusieron 10 ml de buffer P3 y se incubó por 5 min a 4°C. Se realizó centrifugación (10000-13000 RPM) por 10 minutos. Se remueve el supernadante. Se equilibró con buffer QBT. El supernadante se coloca en el QIAGEN-tip 20 y permitir la entrada de la resina por flujo de gravedad. Se lava con buffer QC. Posteriormente se eluye el DNA con buffer QF. Se precipita el DNA con isopropanol se mezcla y se centrifuga inmediatamente a 10000 revoluciones por minuto por 30 minutos. Se decanta el supernadante. Se lavó el pellet de DNA con 1ml de etanol al 70% y se centrifugo a 10000 RPM por 10 minutos. Se decanta y se seca al aire libre por 5-10 minutos y se re-disolvió el DNA en un volumen de agua libre de RNAsas. Se realizó la determinación o cuantificación de la cantidad de DNA por medio del nanodrop.

Transfecciones.

Se transfectaron las células MBCDF, T47D, y MBCD5-B3 mediante el protocolo de lipofectamina plus reagent para la transfección de plásmidos y para la cotransfección se utilizó el protocolo de lipofectamina 2000. Primero se cultivaron placas de 6 posos con las líneas celulares MBCD5-B3, MBCDF y T47D. Una hora antes de la transfección se le cambia el medio a las células libre de antibiótico y suero fetal bovino. Se colocó 1µg de plásmido (DNA del vector vacío, PTP1B WT y PTP1B D181A) y 6 µl de reagent plus en

un tubo eppendorf. Posteriormente se diluyeron en medio libre de suero y antibióticos. Se dejó dicha mezcla durante 15 minutos incubando a temperatura ambiente. Después, se realizó una mezcla de 4 µl de lipofectamina en 96 µl de medio libre de antibióticos y se colocó en un tubo eppendorf. Posteriormente, se mezclaron gentilmente el contenido de ambos tubos y se incubó por 15 min a temperatura ambiente. Al finalizar se colocaron en cada plato de cultivo y se llevaron a una incubadora de CO₂ a 37°C por 24 hrs. Terminado este tiempo se le añadía medio de crecimiento al 10% (OPTI MEM) 2 ml. Para la co-transfección de plásmidos con el siRNA de Her 2 se realizó el protocolo con lipofectamina 2000 el cual es muy similar, la única diferencia es que no se utiliza plus reagent.

Ensayo de Western Blot.

Las células fueron sembradas en cajas de petri en medio RPMI-1640 libre de rojo fenol con 10% de suero fetal bovino. Se dejó que las células tuvieran una confluencia del 100% y posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS y se dejaban 24 hrs en medio de RPMI - 1640 libre de rojo fenol con 10% de suero fetal bovino. Posteriormente se lisaron en buffer de lisis que contiene 50 mM HEPES (pH 7.4), 1 mM EDTA, 250 mM NaCl, 1% de Nonidato P-40, 10 mM NaF, 1 mM vanadato de sodio y 1X mezcla de inhibidores de proteasa (Complete, EDTA free, Roche). Treinta microgramos de proteína fueron sometidos a una electroforesis en un gel de policramida desnaturizante y se transfirió a una membrana inmobilon-P PVDF (Millipore Corp Bedford, MA). La membrana se bloqueó 1 hr con leche 5% en PBS Tween. Posteriormente se incubó con los anticuerpos primarios anti-myc toda la noche a 4°C. Se incubó con el anticuerpo secundario de ratón por 45 min. La señal fue visualizada por quimioluminiscencia y se expuso a una película radiográfica (Kodak).

Resultados.

Sobreexpresión de PTP1B en líneas celulares y cultivos primarios de cáncer de mama.

En busca de definir cuál es la función biológica de PTP1B en células tumorales de cáncer de mama de cultivos primarios (MBCD5-B3 y MBCDF) y líneas comerciales (T47D) realizamos la transfección de plásmido pc-DNA4 vacío o el que contiene el cDNA de myc-PTP1B en su forma silvestre (WT) y mutante (D181A). Los resultados fueron evaluados mediante Western Blot usando un anticuerpo anti-myc. Se realizó una primera transfección el cultivo primario MBCDF para estandarizar la técnica (**Fig 1A**). Los resultados muestran que el carril transfectado con el vector vacío no hay expresión de myc-PTP1B, mientras que en los carriles donde se expresó PTP1B WT y la mutante D181A se incrementó en los niveles de myc-PTP1B (**Fig 1A**). Posteriormente se transfectaron las células MBCD5-B3, MBCDF y T47D (**Fig 1B**) donde se observó que PTP1B se transfecta en su forma WT y D181A en los tres cultivos de células de cáncer de mama, aunque se observó una mayor eficiencia de transfección en la línea celular T47D (**Fig 1B**). Una vez realizada la transfección de las diferentes líneas celulares, uno de los hallazgos fue que había cambios fenotípicos importantes en la morfología de las células con incremento en el tamaño de las células hasta diez veces su tamaño normal, cambios en el citoplasma con inclusiones citoplasmáticas, bordes irregulares, y un fenotipo celular similar al encontrado en las células que podrían estar en la fase de transición epitelio-mesénquima (EMT) (**Figura 1C**).

Efecto de la sobreexpresión de PTP1B en líneas celulares y cultivos primarios de cáncer de mama en la fosforilación de tirosinas global.

Para tratar de definir el efecto de PTP 1B en el proceso de fosforilación global y si este es específico o defosforila múltiples sustratos afectando el nivel de fosforilación total. Se realizó la transfección de plásmido pc-DNA4 vacío o el que contiene el cDNA de myc-PTP1B en su forma silvestre (WT) y mutante (D181A) en células tumorales primarias y línea celular establecida (MBCDF, MBCD5-B3 y T47D). Los resultados fueron evaluados mediante Western Blot. Se encontró que los carriles transfectados con el vector vacío, PTP1B WT y D181A, no mostraron cambios significativos entre ellos, lo que sugiere que el proceso de defosforilación de PTP1B es específico y no afecta de manera global el nivel de fosforilación (**Figura 1D**).

Efecto de la sobreexpresión de PTP1B sobre los niveles de pHer2/Her2 en células de cáncer de mama.

Para evaluar el efecto de la PTP1B sobre la expresión de Her 2 en células de cáncer de mama. Se realizaron transfecciones de las células MBCD5-B3, MBCDF y T47D de manera transitoria con PTP1B en su forma silvestre (WT) o mutante (D181A). Se evaluó la expresión de Her 2 total y fosforilado en el residuo Y877 mediante Western Blot. Los resultados mostraron que la transfección del vector vacío mostraba niveles basales de expresión de Her 2 de cada cultivo celular. Cabe hacer notar que en las células MBCD5-B3, Her 2 ya se encuentra fosforilado. En las células T47D no se pudo evaluar la forma fosforilada de Her 2 (**Figura 2A**). La sobreexpresión de PTP1B WT y D181A mostró un aumento en la expresión de la proteína Her 2 total y fosforilada.

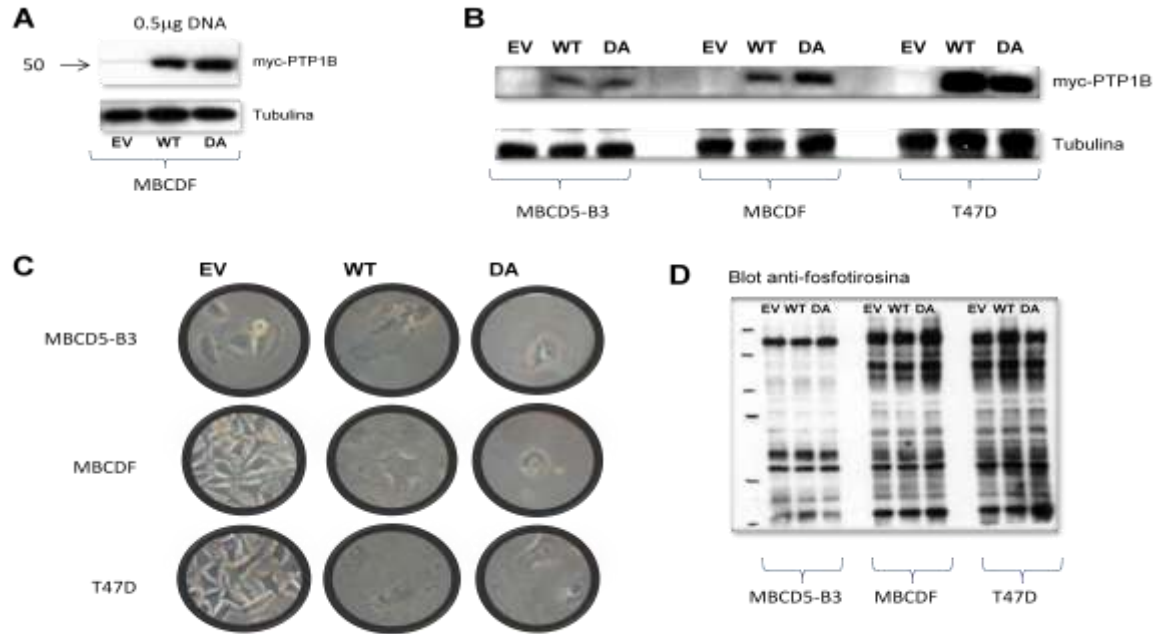


Figura 1A. Western Blot de la transfección transitoria y expresión de PTP1B WT y mutante (DA 181A) en un cultivo primario de cáncer de mama (MBCDF). **Figura 1B.** Western Blot de la transfección transitoria y expresión de PTP1 B WT y DA en cultivos primarios y línea celular de cáncer de mama (MBCD5-B3, MBCDF Y T47D). **Figura 1C.** En esta imagen representativa se ejemplifica el cambio de morfología de las células transfectadas transitoriamente con PTP 1B en su forma silvestre (WT) y mutante (DA 181A). **Figura 1D.** Western Blot anti-fosfotirosina de la transfección transitoria de pc-DNA4 vacío o con cDNA de PTP1 B en la forma WT y (D181A) en cultivos primarios y líneas celulares de cáncer de mama (MBCD5-B3, MBCDF Y T47D) el cual no muestra cambios significativos en el nivel de fosforilación total en ninguno de los tres carriles transfectados en las tres líneas celulares lo que sugiere que PTP1B actúa defosforilando sustratos específicos sin afectar el nivel de fosforilación global. EV: vector vacío, WT: PTP1B silvestre, DA: PTP1B mutante.

En la figura 2 observamos que la sobreexpresión de PTP1B WT y D181A se ve un incremento en los niveles de Her2 total y fosforilado. Con el propósito de determinar si este efecto es dependiente de la cantidad de PTP1B, se transfectaron concentraciones crecientes del plásmido pcDNA4 que contiene el cDNA de PTP1B WT (0.5, 1, 2µg). Los resultados mostraron que los cultivos transfectados con la forma silvestre de PTP1B con cantidades crecientes mostraron un aumento progresivo en la expresión de proteína total con presencia

de incremento de señal cuando son expuestos al anticuerpo contra Her 2 como se muestra en la **Figura 2B**.

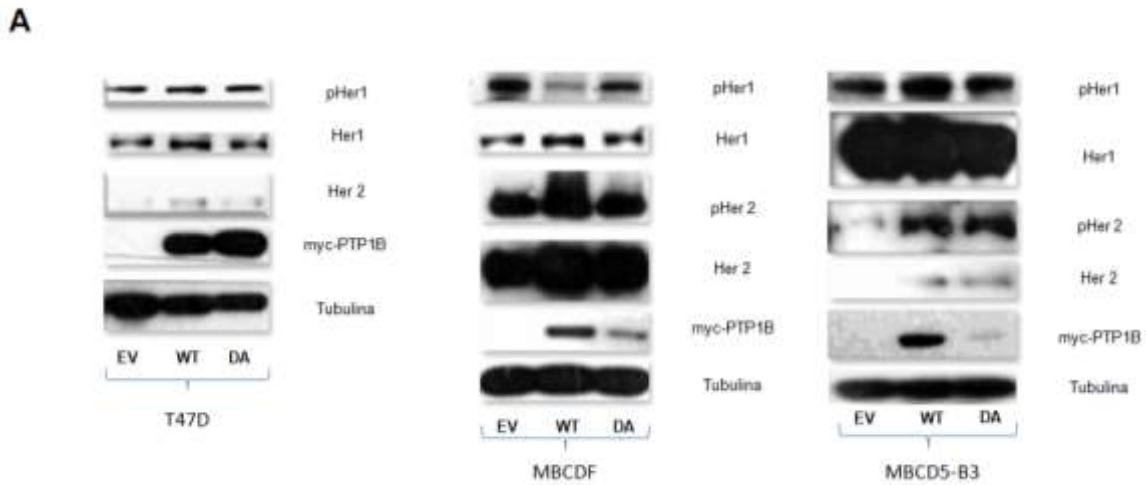


Figura 2A. Western Blot que muestra aumento en la cantidad total y forma fosforilada de Her 2 cuando se realiza transfección transitoria con la forma silvestre o mutante de PTP1B en cultivos primarios y líneas comerciales de cáncer de mama (MBCD5-B3, MBCDF Y T47D). EV: vector vacío, WT: PTP1B silvestre, DA: PTP1B mutante.

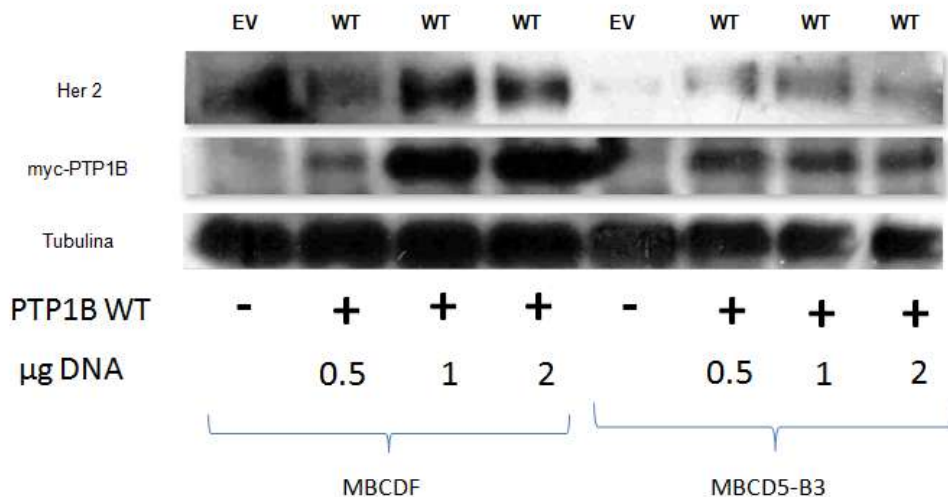
B

Figura 2B. Análisis de Western Blot que muestra aumento progresivo en la expresión de la forma total de Her 2 (recuadro y flechas en rojo) cuando se realiza transfección transitoria con cantidad creciente de cDNA de la forma silvestre PTP1B en cultivos primarios y líneas comerciales de cáncer de mama (MBCDF y T47D). EV: vector vacío, WT: PTP1B silvestre.

Efecto de la sobreexpresión de PTP1B en la señalización Rio debajo de Her 2 (MAPK y Akt).

La siguiente pregunta que surgió fue ver cuál es el efecto de PTP1B en las vías de señalización rio abajo de Her 2. Para contestar esta pregunta, se transfectaron células tumorales de cáncer de mama de cultivos primarios, MBCD5-B3 y MBCDF y la línea celular T47D con PTP1B WT y D181A.S e evaluó que ocurría con la expresión de MAPK y Akt en sus formas totales o fosforiladas. Los resultados no mostraron cambios en el nivel de expresión de MAPK o Akt total o las formas fosforiladas. Mientras que aquellos cultivos transfectados con la forma silvestre o mutante de PTP 1B se incrementó la expresión de las formas fosforiladas de MAPK y Akt así como en las formas totales (**Figura 3**). Además, se evaluó el efecto sobre c-Src, no observamos cambios a nivel de c-Src en su forma total o fosforilada Y527 y Y416 cuando eran transfectadas con PTP1B.

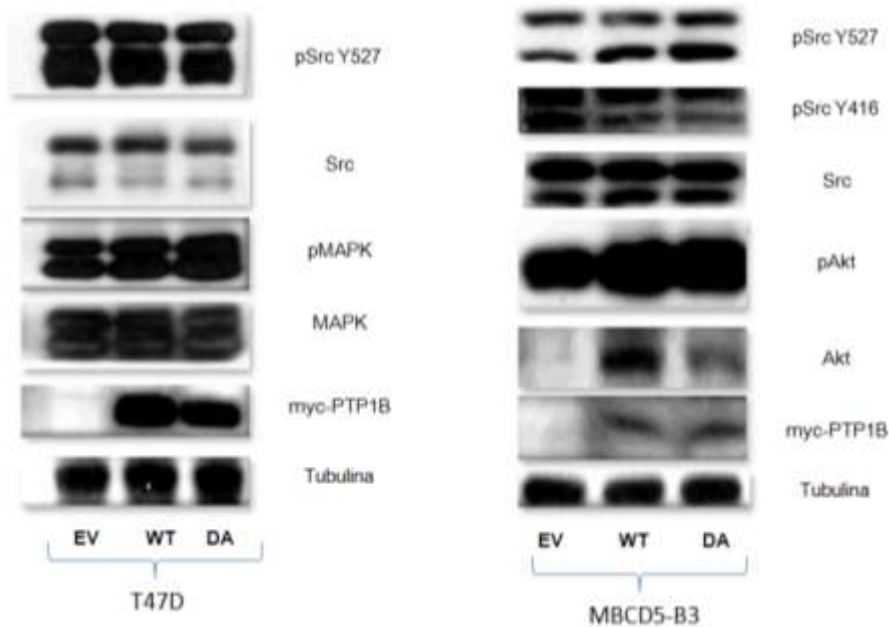


Figura 3. Análisis de Western Blot que muestra aumento en la expresión de algunas proteínas involucradas en las vías de señalización río abajo de Her 2 en su forma fosforilada (MAPK) y en su forma total (Akt) (recuadro y flechas en rojo) cuando se realiza transfección transitoria con la forma silvestre o mutante de PTP1B en cultivos primarios y líneas comerciales de cáncer de mama (MBCD5-B3 Y T47D). EV: vector vacío, WT: PTP1B silvestre, D181A: PTP1B mutante.

Efecto de la inhibición de Her 2 mediante siRNA sobre la expresión de Her 2 mediada por PTP1B.

Una vez que establecimos que PTP1B modula la expresión de Her 2, evaluamos si la inhibición de Her 2 mediante siRNAs afectaba los niveles de Her 2 inducidos por PTP1B. Se co-transfectó el cultivo primario MBCDF y la línea celular T47D con plásmido pc-DNA4 que contiene cDNA de PTP1B en su forma silvestre (WT) y siRNA contra Her 2. Se encontró que el vector vacío no mostraba cambios en el nivel de expresión de Her 2 total y aquellos cultivos transfectados con la forma silvestre de PTP1B mostraron un aumento en la expresión de proteína total de Her 2 como ya se había demostrado previamente aun en

presencia de cantidades crecientes de siRNA contra Her 2 sugiriendo que PTP1B modula la expresión de esta proteína (**Figura 4A y 4B**).

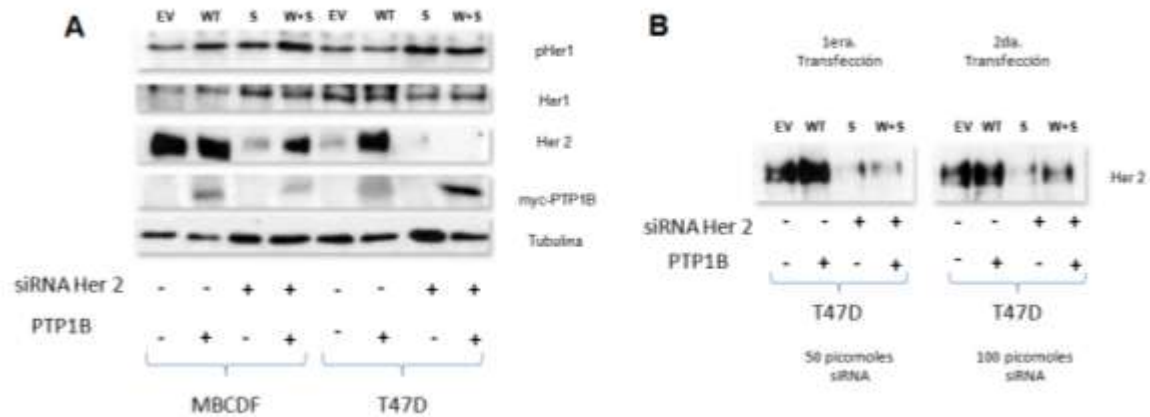


Figura 4A y B. Western Blot que muestra aumento en la expresión de la forma total de Her 2 cuando se realiza transfección transitoria con PTP1BWT en cultivos primarios y líneas celulares de cáncer de mama (MBCDF Y T47D) aun en presencia de cantidades crecientes de SiRNA contra Her 2 lo que sugiere que la expresión de Her 2 es modulada por PTP 1B. EV: vector vacío, WT: PTP1B silvestre, DA: PTP1B mutante, S: siRNA contra Her 2, W+S: Co-transfección PTP1B WT y siRNA contra Her2.

Posteriormente, ya que corroboramos que Her 2 es modulado por PTP1B con los experimentos previos continuamos la búsqueda de poder definir si el efecto de PTP1B sobre Her 2 en células tumorales de cáncer de mama de cultivos primarios (MBCDF) y líneas comerciales (T47D) era específico de esta fosfatasa. Se evaluó se TC-PTP una fosfatasa muy relacionada a PTP1B no daba el mismo efecto sobre la expresión de Her 2 en su forma total. Se realizó co-transfección con plásmido pc-DNA4 que contiene cDNA de PTP1B y otro que contiene cDNA de la proteína fosfatasa de células T (TC-PTP) en su forma silvestre (WT) y siRNA contra Her 2. Se encontró que el vector vacío no mostraba cambios en el nivel de expresión de Her 2 total y aquellos cultivos transfectados con la forma silvestre de PTP1B mostraron un aumento progresivo en la expresión de proteína

total de Her 2, esto aun en la presencia de siRNA contra Her 2. TC-PTP no ejerció ningún efecto sobre la expresión de Her2. Cuando se inhibió Her 2 con el siRNA, la sobreexpresión de TC-PTP no afectó los niveles de Her 2 sugiriendo que PTP1B modula de manera específica la expresión de esta proteína (**Figura 4C**).

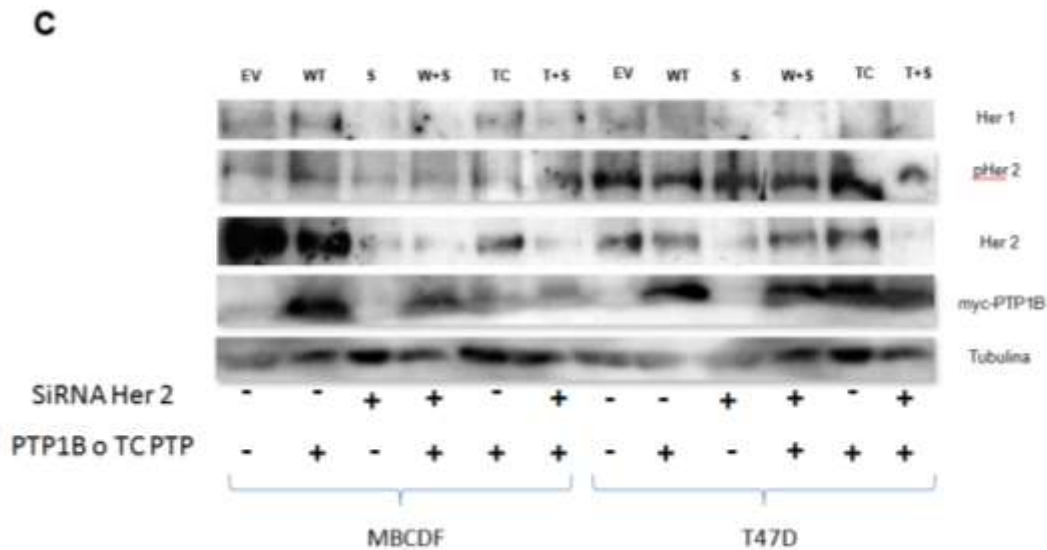


Figura 4C. Western Blot que muestra aumento en la expresión de la forma total de Her 2 cuando se realiza co-transfección de la forma silvestre PTP1B en cultivo primario y línea celular de cáncer de mama (MBCDF y T47D) aun en presencia de siRNA contra Her 2 lo que sugiere que la expresión de Her 2 es modulada por PTP1B de manera específica ya que. La TC-PTP no ejerció ningún efecto sobre la expresión de Her 2. EV: vector vacío, WT: PTP1B silvestre, DA: PTP1B mutante, S: siRNA contra Her 2, W+S: Co-transfección PTP1B WT y siRNA contra Her 2, TC: Fosfatasa TC-PTP, T+S: Co-transfección de Fosfatasa TC-PTP y siRNA contra Her 2.

Discusión y conclusiones.

La expresión y actividad de PTP1B ha sido asociada en la oncogénesis en diversos tipos celulares y tumores tales como cáncer esofágico, mama, ovario y colon. Sin embargo, el papel de esta fosfatasa en estos tumores no se ha esclarecido completamente, sin que quede claro si es una causa o una consecuencia de la enfermedad¹⁻⁷. Interesantemente, se sabe que la región del cromosoma 20q13, donde está situado el gen de PTP1B se encuentra amplificado en varios cánceres. Esto también ha sido observado en cáncer de mama donde se asocia un pobre pronóstico⁷⁻¹³. Otros estudios han demostrado que PTP1B activa a c-Src y a la vía de ras lo que sugiere un papel oncogénico¹⁷⁻¹⁹. Además, ensayos previos han demostrado que el modelo murino de *NDL2/PTP 1B* *-/-* resiste la transformación por el oncogén ErbB2 en cáncer de mama y protege de las metástasis pulmonares^{6,14}. Sin embargo, a pesar de esta información que relaciona a PTP1B y el cáncer de mama en específico el que sobreexpresa Her 2, en la actualidad se desconoce su papel exacto en la carcinogénesis o la progresión tumoral. Tratando de definir cuál es el papel de PTP1B en la regulación de Her2 en cáncer de mama sobreexpresamos PTP1B en líneas celulares y cultivos primarios de glándula mamaria con el plásmido pcDNA4 que contenía el cDNA de PTP1B en su forma silvestre o la mutante (D181A). Observamos que uno de los efectos más importantes de la sobreexpresión de PTP1B fue un aumento en la expresión de las formas total y fosforilada de Her 2, lo que corrobora los resultados de un estudio preclínico previo que reportó que los niveles de expresión de pHer2/Her 2 disminuían en el modelo murino de cáncer de mama *NDL2* con delección homóciga de PTP1B⁶. En nuestro trabajo nos dimos a la tarea de determinar la expresión de Her 2 es en verdad dependiente de la cantidad de PTP1B, lo que resulta una propuesta novedosa. Sorprendentemente,

encontramos que la expresión de Her 2 es dosis dependiente aunque el mecanismo por el cual lo realiza está aún por dilucidarse, lo anterior apoya la idea propuesta de que PTP1B que es capaz de modular la expresión de Her 2. Los cambios e el contenido celular de Her 2 podrían explicarse por varios mecanismos independientes: i) PTP1B podría efecto el control de la expresión génica, ii) alternativamente, la fosfatasa podría activar un regulación negativa en la vía de internalización y reciclaje de Her 2, que se sabe está controlada por la maquinaria de ubiquitinación mediada por c-Cbl²⁴, iii) otra posibilidad que la fosfatasa afecte la maquinaria de selección del endosoma ya que se han propuesto algunos efectores de esta vía como sustratos directos de PTP1B como lo es STAM2²³. Por lo anterior, es claro que se necesitan más estudios para tratar de contestar esta pregunta.

Otro de los hallazgos más relevantes es que estamos reportando es un aumento en algunas vías de señalización río abajo de Her 2, especialmente, un incremento en la fosforilación de las MAPKs y Akt lo que ocasionaría un fenotipo celular más agresivo con resistencia a la apoptosis, lo cual concuerda con lo reportado anteriormente en un ensayo, en donde el modelo murino *NDL2 / PTP1B* ^{-/-} demostró una disminución en la fosforilación de las MAPKs y AKT lo que ocasiona un incremento en la apoptosis y disminución de las metástasis pulmonares como efecto biológico⁶. Esto sugiere que PTP 1B podría participar como regulador positivo de la supervivencia vía p62Dok por medio de las MAPKs y la vía de Akt como lo mostraron estudios previos que documentaron que Her 2 aumenta la supervivencia a través de reducir los niveles de p27^{Kip} y aumentar los de ciclina D1^{6,15,16}. Otra consideración que debemos hacer es en relación a c-Src, el cual se ha vinculado a Her 2 y PTP1B en algunas líneas celulares de cáncer y otros cultivos de epitelio mamario inmortalizadas en donde esta vía se encuentra activa por medio de defosforilación de la

Y527 que es el sitio inhibitorio de c-Src^{17,19}. Sin embargo, aunque se ha demostrado que PTP1B defosforila a c-Src en la Y527, el papel de esta en la transformación mediada por Her2 no es completamente claro, ya que modelos murinos donde se sobreexpresa de manera transgénica gen *csk*, el cual codifica una proteína cinasa, que suprime la activación de c-Src no afecta la tumorigénesis mediada por Her 2³⁴, por lo que su papel todavía en la carcinogénesis o progresión tumoral deberá continuar en investigación.

Una vez que establecimos que PTP1B modula la expresión de Her 2 e incrementaba la expresión de algunas vías de señalización relacionadas, evaluamos si la inhibición de Her 2 mediante siRNAs afectaba los niveles de Her 2 inducidos por PTP1B. Sorprendentemente, encontramos que los niveles de Her 2 a pesar del silenciamiento con el siRNA en concentraciones crecientes eran restablecidos por la presencia de PTP1B y no por TC-PTP lo que nos sugiere que este efecto es específico de esta fosfatasa. Lo anterior, puede deberse a que PTP1B tiene sustratos específicos como lo publicado por un ensayo en fibroblastos de embriones de ratón PTP1B^{-/-} en donde observaron por medio de proteómica cuantitativa que PTP1B se asocia a un subgrupo de 18 proteínas entre ellas p120rasGap, p62Dok, ZO1 entre otras²⁵. Otros ensayos han documentado algunos sustratos en donde PTP1B actúa de manera altamente selectiva como lo son IRS-1, JAK 2, EGFR y PDGFR, etc²⁶⁻³³. Además, esto podría explicar porque no se observaron cambios significativos de los niveles totales de proteínas fosforiladas en residuos de tirosina.

Nuestros estudios demuestran que PTP1B modula específicamente los niveles de Her2 en líneas celulares y cultivos primarios de cáncer de mama. El hecho que PTP1B incremente Her2 es de gran relevancia, ya que este es considerado un factor de mal pronóstico. Por lo cual, la expresión de ambas proteínas puede ser considerado de mal pronóstico. En análisis

preliminar encontramos de 11 pacientes, 5 sobreexpresan PTP1B y una de ellas sobreexpresa Her2. Esta paciente el tumor progreso rápidamente, a pesar del tratamiento, generando metástasis pulmonares, hepáticas y ganglionar, lo que demuestra que la sobreexpresión de estas dos proteínas es de mal pronóstico (Datos no publicados donados por la doctora Karen Doddy). Dado el antecedente, que en la tumorigénesis dependiente de Her 2 en modelos murinos (MMTV-NeuNT), este proceso requiere a PTP1B para la progresión tumoral en lesiones premalignas que sobreexpresan este receptor¹⁴. Por todo lo anterior, se podría utilizar a PTP1B como una herramienta diagnóstica y pronóstica dentro del subgrupo de pacientes que sobreexpresa Her2. También se puede pensar en potencial uso de los inhibidores de PTP1B como mecanismo de quimio-prevención primaria o secundaria²⁰⁻²².

Bibliografía.

- 1) Warabi M, Nemoto T, Ohashi K, Kitagawa M, Hirokawa K. Expression of protein tyrosine phosphatases and its significance in esophageal cancer. *Exp Mol Pathol.* 2000;68:187–95.
- 2) Zhai YF, et al. Increased expression of specific protein tyrosine phosphatases in human breast epithelial cells neoplastically transformed by the neu oncogene. *Cancer Res.* 1993;53:2272–8.
- 3) Wiener JR, et al. Overexpression of the tyrosine phosphatase PTP1B is associated with human ovarian carcinomas. *Am J Obstet Gynecol.* 1994;170:1177–83.
- 4) J.R. Wiener, B.J. Kerns, E.L. Harvey, M.R. Conaway, J.D. Iglehart, A. Berchuck, R.C. Bast Jr., Overexpression of the protein tyrosine phosphatase PTP1B in human breast cancer: association with p185c-erbB-2 protein expression, *J. Natl. Cancer Inst.* 86 (1994) 372–378.
- 5) Zhu S, Bjorge JD, Fujita DJ. PTP1B contributes to the oncogenic properties of colon cancer cells through Src activation. *Cancer Res.* 2007;67:10129–37.
- 6) Julien SG, et al. Protein tyrosine phosphatase 1B deficiency or inhibition delays ErbB2-induced mammary tumorigenesis and protects from lung metastasis. *Nat Genet.* 2007;39:338–46.
- 7) Dube´ N, et al. Genetic ablation of protein tyrosine phosphatase 1B accelerates lymphomagenesis of p-53-null mice through the regulation of B-cell development. *Cancer Res.* 2005;65: 10088–95.
- 8) D.J. Schaid. The complex genetic epidemiology of prostate cancer. *Hum Mol Genet* 13 (Spec No 1) 2004 R103-R121.
- 9) T. Nishizaki, S. Ozaki, K Harada, H Arai. Investigation of genetic alterations associated with the grade of astrocytic tumor by comparative genomic hybridization, *Genes Chromosomes Cancer* 21 (1998) 340-346.
- 10) T. Furukawa, M. Sunamura, A. Horii, Molecular mechanisms of pancreatic carcinogenesis, *Cancer Sci*, 97 (2006) 1-7.
- 11) T. Nishinamura, Total number of genome alterations in sporadic gastrointestinal cancer inferred from pooled analyses in the literature. *Tumor Biol.* 29 (2008) 343-350.
- 12) MM. Tanner, M. Tirkkonen, A. Kallioniemi, J. Isola, et al. Independent amplification and frequent co-amplification of three nonsyntenic regions on the long arm of chromosome 20 in human breast cancer. *Cancer Res.* 56 (1996) 3441-3445.
- 13) Courjal F, Cuny M, Rodriguez C, *et al.* DNA amplifications at 20q13 and *MDM2* define distinct subsets of evolved breast and ovarian tumours. *Br J Cancer* 1996;74:1984–9.
- 14) M. Bentires-Alj, B.G. Neel, Protein-tyrosine phosphatase 1B is required for HER2/Neu-induced breast cancer, *Cancer Res.* 67 (2007) 2420–2424.
- 15) Lenferink, A.E., Busse, D., Flanagan, W.M., Yakes, F.M. & Arteaga, C.L. ErbB2/neu kinase modulates cellular p27(Kip1) and cyclin D1 through multiple signaling pathways. *Cancer Res.* 61, 6583–6591 (2001).

- 16) Landis, M.W., Pawlyk, B.S., Li, T., Sicinski, P. & Hinds, P.W. Cyclin D1-dependent kinase activity in murine development and mammary tumorigenesis. *Cancer Cell* 9, 13–22 (2006).
- 17) Borge JD, Pang A, Fujita DJ. Identification of protein-tyrosine phosphatase 1b as the major tyrosine phosphatase activity capable of dephosphorylating and activating c-src in several human breast cancer cell lines. *J Biol Chem* 2000;275: 41439–46.
- 18) Dube N, Cheng A, Tremblay ML. The role of protein tyrosine phosphatase 1b in ras signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:1834–9.
- 19) L.E. Arias-Romero, S. Saha, O. Villamar-Cruz, S.C. Yip, S.P. Ethier, Z.Y. Zhang, J.Chernoff, Activation of Src by protein tyrosine phosphatase 1B is required for ErbB2 transformation of human breast epithelial cells, *Cancer Res.* 69 (2009) 4582–4588.
- 20) Estudio. NCT 00365781 (Estudio fase I en Diabetes Mellitus).
- 21) Liu G. Technology evaluation: Isis-113715, Isis. *Curr Opin Mol Ther* 2004;6:331–6. *Estudio fase II en Diabetes.*
- 22) Geary RS, Bradley JD, Watanabe T, Kwon Y, Wedel M, van Lier JJ, Van Vliet AA. Lack of pharmacokinetic interaction for ISIS 113715, a 2'-O-methoxyethyl modified antisense oligonucleotide targeting protein tyrosine phosphatase 1B messenger RNA, with oral antidiabetic compounds metformin, glipizide or rosiglitazone. *Clin Pharmacokinet.* 2006;45(8):789-801.
- 23) Matthew Stuible, Jasmine v. Abella, Matthew Feldhammer, Misha Nossov, Veena Sangwan, Blagoy Blagoev, Morag Park, and Michel I. Temblay, Ptp1B targets the endosomal sorting machinery dephosphorylation of regulatory sites on the endosomal sorting complex required for transport component STAM2. *The Journal of biological chemistry* Vol. 285, NO. 31, pp. 23899–23907.
- 24) Xia Li, Liangliang Shen, Jing Zhang, Jin Su, Lan Shen, Xinpeng Liu, Hua Han, Wei Han, and Libo Yao.
- 25) Philipp Mertins, H. Christian Eberl, Jörg Renkawitz, Jesper V. Olsen, Michel L. Tremblay, Matthias Mann, Axel Ullrich, and Henrik Daub. Investigation of Protein-tyrosine Phosphatase 1B Function by Quantitative Proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics* 7:1763–1777, 2008.
- 26) Tiganis, T., and Bennett, A. M. (2007) Protein tyrosine phosphatase function: the substrate perspective. *Biochem. J.* 402, 1–15.
- 27) Lammers, R., Moller, N.P., and Ullrich, A. (1997) The transmembrane protein tyrosine phosphatase _ dephosphorylates the insulin receptor in intact cells. *FEBS Lett.* 404, 37–40.
- 28) Fuchs, M., Muller, T., Lerch, M. M., and Ullrich, A. (1996) Association of human protein-tyrosine phosphatase _ with members of the armadillo family. *J. Biol. Chem.* 271, 16712–16719.
- 29) Anders, L., Mertins, P., Lammich, S., Murgia, M., Hartmann, D., Saftig, P., Haass, C., and Ullrich, A. (2006) Furin-, ADAM 10-, and _ secretase mediated cleavage of a receptor tyrosine phosphatase and regulation of -catenin's transcriptional activity. *Mol. Cell. Biol.* 26, 3917–3934.
- 30) Kharitononkov, A., Chen, Z., Sures, I., Wang, H., Schilling, J., and Ullrich, A. (1997) A family of proteins that inhibit signalling through tyrosine kinase receptors. *Nature* 386, 181–186.

- 31) Lammers, R., Bossenmaier, B., Cool, D. E., Tonks, N. K., Schlessinger, J., Fischer, E. H., and Ullrich, A. (1993) Differential activities of protein tyrosine phosphatases in intact cells. *J. Biol. Chem.* 268, 22456–22462.
- 32) Dube, N., and Tremblay, M. L. (2005) Involvement of the small protein tyrosine phosphatases TC-PTP and PTP1B in signal transduction and diseases: from diabetes, obesity to cell cycle, and cancer. *Biochim Biophys. Acta* 1754, 108–117.
- 33) Fawaz G. Haj†, Boyka Markova§, Lori D. Klamant‡¶, Frank D. Bohmer§_, Benjamin G. Neel The Journal Of Biological Chemistry Vol. 278, No. 2, Issue Of January 10, Pp. 739–744, 2003.
- 34) Kaminski R, Zagozdzon R, Fu Y, et al. Role of SRC kinases in Neu-induced tumorigenesis: challenging the paradigm using Csk homologous kinase transgenic mice. *Cancer Res* 2006;66:5757–62.