



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD TIROSIN
CINASA DEL RECEPTOR PARA EL FACTOR DE
CRECIMIENTO EPIDÈRMICO (EGFR) EN LAS
CÈLULAS DE CARCINOMA DE CÈRVIX CALO 1
INBL**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÒLOGO

P R E S E N T A:

JOSE RICARDO BUSTOS RODRIGUEZ



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. ISABEL SOTO CRUZ**

**FES ZARAGOZA, CD. MEXICO, 22 DE JUNIO
DEL 2016**



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.





| | |
|---------------------------------|----|
| ÍNDICE | |
| INTRODUCCIÓN..... | 5 |
| MARCO TEÓRICO..... | 6 |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 36 |
| ANTECEDENTES..... | 37 |
| JUSTIFICACIÓN..... | 37 |
| HIPÓTESIS..... | 38 |
| OBJETIVO GENERAL..... | 38 |
| OBJETIVO PARTICULAR. | 38 |
| METODOLOGÍA..... | 39 |
| RESULTADOS..... | 43 |
| DISCUSIÓN..... | 52 |
| CONCLUSIONES..... | 57 |
| PERSPECTIVAS..... | 58 |
| APÉNDICE..... | 59 |
| REFERENCIAS..... | 63 |



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

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



Agradecimientos

Quiero agradecer primero a mi padre Saturnino por todo el apoyo y enseñanzas brindadas a lo largo de mi vida, a mi madre Marielena por su cariño y apoyo incondicional.

A mis hermanas Abril y Xochi por su apoyo, cariño y sus consejos que me ayudaron muchas veces a cursar mis estudios profesionales.

A mis tíos y primos por ser parte de mi enorme familia y en especial a mi tía Araceli por cuidarme siempre y preocuparse por mí.

A mis amigos de toda la vida Juan y Alejandro que más que amigos son mis hermanos perdidos.

A mis amigos de la carrera con los que compartí muchos momentos agradables y concluí esta carrera. Pero en especial a mis amigos Juan, Miguel y Rubí. Los mejores amigos que un Biólogo puede pedir.

A mi asesora, Doctora Isabel Soto Cruz que me agunto todo este tiempo y fue una gran guía en el desarrollo de este proyecto.

A mis sinodales por apoyar y aprobar mi proyecto de tesis.

Al Doctor Arturo Valle Mendiola por que sin él no sabría ninguna técnica molecular y además de un gran guía, fue un buen amigo.

A una personita amarilla que trabajo conmigo y además se convirtió en una persona muy importante, me enseñó que los grandes amigos llegan de la nada.

A todo el laboratorio 9 de la planta baja de la UMIEZ en donde aprendí muchísimas cosas. En especial a mi camarada que le gusta el área de estudios forenses como a mí.



ABREVIATURAS

EGFR - Epidermal Growth Factor Receptor

EGF - Epidermal Growth Factor

TGF - Transforming Growth Factor

HPV - Human Papiloma Virus

SDS - Dodecil Sulfato de Sodio

PAGE - Polyacrylamide gel Electrophoresis

TGF - Transforming Growth Factor



1: INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial. Esto es resultado de la interacción de factores genéticos y externos. El cáncer de cuello uterino es una alteración celular que se origina en el epitelio del cérvix y se manifiesta por medio de lesiones precursoras de lenta y progresiva evolución. En la actualidad, el estudio de los mecanismos de activación en las células ha ayudado a entender el desarrollo de algunos tipos de cáncer. El receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es uno de los más estudiados, El EGFR está relacionado con la diferenciación celular, la motilidad, y la regulación de la proliferación celular. Nuestro grupo de trabajo demostró, que el EGFR presente en las líneas celulares CALO e INBL al ser estimuladas con EGF no se fosforila. Por lo que el objetivo de este trabajo fue determinar la actividad de cinasa de tirosina del receptor mediante un ensayo de cinasa *in vitro*. Con este ensayo se midió la actividad de cinasa del EGFR presente en las líneas celulares CALO e INBL así como en las líneas HeLa y Caski. Las líneas celulares se estimularon con EGF durante 5 minutos y se midió su actividad. Los resultados del ensayo de cinasa muestran que el receptor tiene actividad enzimática, las líneas celulares mostraron una actividad consistente, principalmente en las líneas celulares HeLa y CALO, por lo que se concluyó que el EGFR tiene actividad catalítica *in vitro*. Es probable que la actividad catalítica no se detecte en los ensayos de fosforilación por que el EGFR es inhibido por una proteína reguladora en el citoplasma.



2: MARCO TEÒRICO

El cáncer constituye un grupo de enfermedades que han afectado a los seres humanos desde tiempos ancestrales. Existen registros de cáncer de hueso en momias egipcias del año 1600 A.C., por ejemplo, el caso más antiguo de cáncer de mama data del año 1500 A.C., reportado en manuscritos; incluso, se tiene registro del tratamiento paliativo que se proporcionaba y de la falta de cura ante la enfermedad. El nombre de “cáncer” lo recibe de Hipócrates (460–370 a.C.), por la palabra griega *karkinos* que significa cangrejo **(1)**.

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial. Esto es resultado de la interacción de factores genéticos y externos (físicos, químicos y biológicos) que producen la degeneración de las células con lo que se originan lesiones precancerosas y finalmente tumores malignos. Dichos tumores suelen estar localizados al inicio de la enfermedad pero pueden diseminarse a otros órganos (metástasis). El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo; La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que en 2012 hubo unos 14 millones de nuevos casos y 8,2 millones de muertes relacionadas con el cáncer **(2)**.

En 2011, la Organización Panamericana de la Salud (OPS), reportó que de 2007 a 2009 en América Latina, la tasa de mortalidad estandarizada a consecuencia de cáncer maligno fue de 110.7 muertes por cada 100 mil habitantes. Las tasas más altas en la región se localizan en Uruguay (168.4 por cada 100 mil habitantes), Cuba (143.3) y Perú (136.6); México tiene la tasa más baja en Latinoamérica



(75.4) como resultado de los esfuerzos que se han llevado a cabo en materia de prevención, atención oportuna y sensibilización **(3)**.

En México, durante 2011 el total de egresos hospitalarios por tumores, 55.6% fueron por tumores malignos; en la población infantil y juvenil (menores de 20 años), la proporción de egresos hospitalarios por neoplasias malignas en relación con los tumores en general es más alta que en la población adulta (70.6 y 53.2%, respectivamente) **(4)**.

Cáncer de cérvix

El cáncer de cuello uterino es una alteración celular que se origina en el epitelio del cérvix y se manifiesta mediante lesiones precursoras de lenta y progresiva evolución, las cuales evolucionan a cáncer *in situ* o a cáncer invasor en el cual las células malignas traspasan la membrana basal.

El cáncer cervicouterino (CaCu) ocupa el tercer lugar en tasas de incidencia a nivel mundial, con un estimado de 528,000 nuevos casos en 2012 (tasa de mortalidad global de 15 por 100,000 mujeres). Más del 85% de la carga global ocurre en países en desarrollo, donde representan 13% de los cánceres femeninos **(5)**.

Cáncer de cérvix en México

En el caso de México, durante el periodo de 1976 al 2006, se presentaron 102,544 muertes por CaCu. En la década de los años 80, el Programa Nacional de Prevención y Control de CaCu enfrentó enormes desafíos. Las tendencias



nacionales indicaban un aumento de la mortalidad por CaCu en todas las edades, menos del 15% de la población femenina elegible había tenido alguna vez una citología vaginal, y la cobertura fue baja en las zonas subdesarrolladas y pobres. También hubo una ausencia de control epidemiológico y de medidas de control de calidad para la toma y el diagnóstico de las muestras de citología cervical. A principios de la década de los años 90, una evaluación de la calidad de las citologías cervicales en México informó que más del 60% carecía de células endocervicales, moco y/o células de metaplasia. Además, algunos centros de tamizaje de citología cervical informaron más del 50% de resultados falsos negativos **(6)**.

El cáncer cervicouterino (CaCu), es un problema de salud pública, que pese a ser un modelo de prevención del cáncer, es la segunda causa de cáncer más común en México. Constituye el 15 % del total de nuevos casos de cáncer y el 12% del total de muertes de mujeres por cáncer en 2012 **(4)**. Desafortunadamente, afecta a mujeres con desventaja económica, social y cultural y por ende, es mucho más común en países en vías de desarrollo donde ocurre el 85% de los casos, en contraste, en países desarrollados ocurre únicamente 3.6% de nuevos casos **(7)**.

Virus del papiloma humano.

Casi todos (99,8%) los casos de cáncer de cuello uterino se deben a la infección con virus de papiloma humano (VPH). El enlace entre el CaCu y el VPH fue demostrado a principios de los años 80's por el doctor Harald zur Hausen **(9)**. La



principal característica del virus del papiloma humano es la producción de verrugas genitales o papilomas de este virus. Existen más de 150 variaciones, pero sólo 15 son responsables de la mayoría de los casos de cáncer cervicouterino, vagina, pene, vulva, ano y orofaríngeo **(8,9)**.

Este virus morfológicamente se divide en tres regiones: la región larga de control, LCR, que no contiene marco de lectura alguno; la región que corresponde a las proteínas tempranas (E1 a E8) y la región que corresponde a las proteínas tardías (L1 y L2). Estas regiones codifican distintas proteínas para el anclaje y supervivencia del virus. En la tabla 1 se muestran las proteínas más importantes y su función.

Tabla 1: Proteínas que intervienen en la replicación y anclaje del VPH modificado de (9-13)

| | |
|-----------|---|
| L1 | Anclaje de virus y replicación viral |
| L2 | Anclaje de virus y replicación viral |
| E1 | Función ATPasa y helicasa |
| E2 | Transcripción y regulación de ADN viral amplificación viral. |
| E4 | Al unirse a proteínas E2 y E1 |
| E5 | Desregulación de factores de crecimiento |
| E6 | Degradación p53 |
| E7 | Inhibición de pRB |
| E8 | Mantiene el estado del epitelio infectado |

En la figura 1 se puede observar la manera en que el VPH infecta las células y se duplica, así como la invasión hacia el exterior mediante células neoplásicas (14).

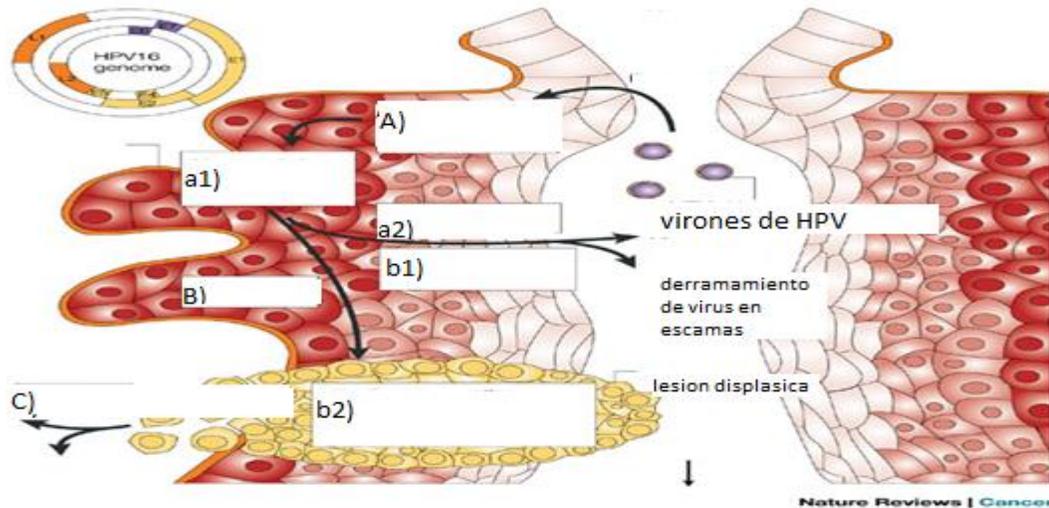


Figura 1: Replicación del VPH; a) entran los viriones de VPH infectando los queratinocitos basales y suprabasales; a1) la replicación vírica y expresión de los genes tempranos; a2) movimientos distales de células infectadas; b) la linealización del DNA vírico; b1) expresión de genes tardíos y formación de capsido; b2) la integración viral en el genoma del hospedero para cargar una producción descontrolada de oncoproteínas virales y la transformación del hospedero; c) invasión neoplásica. Modificado de (14)

Proteínas con actividad catalítica de cinasa

Importancia

La familia de proteínas cinasas humanas se compone de más de 500 miembros por lo que es una de las familias más grandes de genes.

Estas enzimas catalizan la siguiente reacción:





Con base en la naturaleza del grupo OH fosforilado, estas proteínas se clasifican como proteínas-quinasas de serina/treonina (385 miembros), proteínas cinasas de tirosina (90 miembros), y proteínas parecidas a tirosina-quinasa (43 miembros). Por otro lado, hay 106 pseudogenes proteína quinasa. De las 90 proteínas tirosina cinasas, 58 son receptoras y 32 son cinasas no receptoras **(15)**.

Las proteínas cinasas juegan un papel regulador predominante en casi todos los aspectos de la biología celular. Por ejemplo, regulan la apoptosis, progresión del ciclo celular, la reorganización del citoesqueleto, la diferenciación, el desarrollo, la respuesta inmune, la función del sistema nervioso, y la transcripción. Por otra parte, la desregulación de las proteínas cinasas produce una gran variedad de enfermedades incluyendo cáncer, diabetes, enfermedades autoinmunes, cardiovasculares, inflamatorias, y trastornos nerviosos. Un considerable esfuerzo se ha dedicado a determinar las funciones fisiológicas y patológicas de los receptores con actividad de quinasa en las vías de transducción de señales durante los últimos 30 años **(16,17)**.

Las proteínas tirosina-quinasas de la familia HER/ErbB, que incluyen el receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR), se encuentran entre las familias de señalización celular más estudiadas. **(18)** El EGFR es una proteína de membrana de 170 kDa altamente glicosilada, que consiste en una única cadena polipeptídica de 1186 aminoácidos **(15, 19,20)**.



Familia HER estructura y función

Familia de receptores EGFR

El análisis de genotecas de cDNAs utilizando una sonda para EGFR llevó a la identificación de una familia de proteínas estrictamente relacionadas con el EGFR. Esta familia consiste de 4 proteínas: EGFR (también conocida como ErbB1/HER1), ErbB2/HER2/NEU, ErbB3/HER3 y ErbB4/HER4 **(22-24)**.

Los cuatro miembros de la familia de EGFR muestran homología extracelular, relacionadas con el EGFR en 44, 36 y 48%, respectivamente; mientras que la homología para el dominio de tirosina cinasa es de 82, 59 y 79%. El grado de homología en el dominio C-terminal regulador es relativamente bajo, siendo de 33, 24 y 28%, respectivamente **(24)**.

Estructura del receptor

Con base en el análisis de cDNAs y la estructura primaria de aminoácidos de EGFR, Ulrich *et al.* 1984, plantearon la hipótesis de que el receptor consistía en un dominio extracelular, un solo segmento transmembrana hidrofóbico, y un dominio intracelular con actividad de cinasa **(25)**. Esta hipótesis ha resistido la prueba del tiempo y fundamentalmente se aplica a todos los receptores con actividad de cinasa. La familia ErbB de proteínas cinasas consta de un dominio extracelular que se divide en cuatro partes: los dominios I y III, son segmentos ricos en leucina que participan en la unión del ligando, y los dominios II y IV, que contienen numerosos residuos de cisteína que participan en la formación de enlaces

disulfuro. El dominio II participa en la formación de homo y heterodímeros con miembros de la familia ErbB. El dominio extracelular es seguido por un segmento transmembranal de 19-25 residuos de aminoácidos y una porción intracelular de 550 aminoácidos que contiene: 1) un segmento juxtamembrana; 2) un dominio de cinasa, y 3) una cola carboxilo terminal (Figura 2). Aún cuando los cuatro miembros de la familia comparten en general la misma estructura, cada uno de ellos posee en su estructura algunas particularidades muy específicas que son de suma importancia en la complementariedad de los dímeros así como la selectividad en la activación específica de las vías de señalización (26,27).

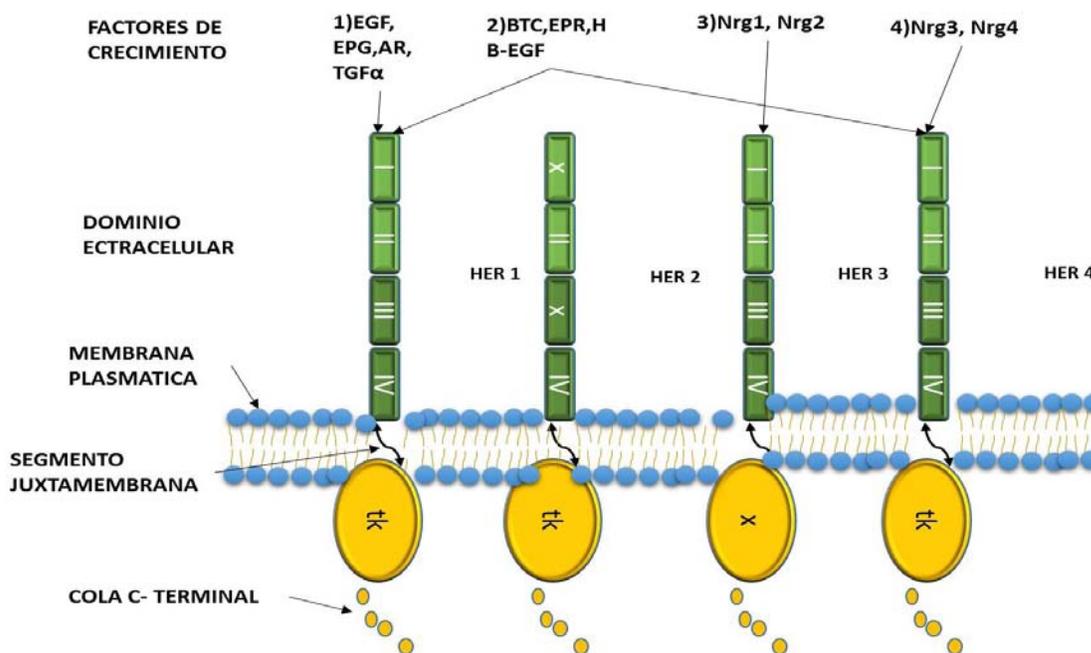


Figura 2: Estructura de los miembros de la familia EGFR HER1, HER2, HER3 y HER4 los cuales tienen similitud en su estructura lo que permite que algunos miembros compartan ligandos con excepción de HER 2 la cual no tiene ligando ya que su estructura extracelular es diferente. HER 3 tiene actividad de cinasa reducida en comparación con EGFR.

Ligandos que se unen a los receptores: EGF (factor de crecimiento epidérmico), EPG (epigen), AR (ampiregulina), TGF α (factor transformante de crecimiento α), BTC (betaceluina), EPR (epiregulina), HB-EGF (unión a heparina factor de crecimiento epidérmico) y las neregulinas Nrg/Neu.



Existen evidencias sólidas que demuestran que la formación de heterodímeros entre dos diferentes miembros de la familia incrementa la diversidad de reconocimiento de ligandos **(28)**. La formación de heterodímeros conlleva a un incremento en la capacidad de reclutar dentro del dominio citoplasmático, diversas moléculas asociadas al reconocimiento de fosfotirosinas por medio de proteínas que presentan dominios SH2 o dominios PTB, incrementando con esto el repertorio de las vías de señalización que pueden ser activadas por un receptor determinado. Los miembros de la familia de receptores ErbB se expresan en diferentes tejidos, jugando un papel preponderante en la proliferación celular y diferenciación. Los receptores son activados al unirse a su ligando natural, lo que lleva a la homo o heterodimerización, seguida de una transfosforilación de algunas tirosinas, en particular, en el dominio catalítico lo que activa una serie de señales en cascada río abajo mediante el reclutamiento de proteínas-sustrato específicas en su dominio citosólico **(28-30)**.

Ligandos de EGFR

En la tabla 2 se muestran los ligandos que se unen a cada uno de los receptores monoméricos. Estos son: EGF factor de crecimiento epidérmico, EPG epigen, AR ampiregulina, TGF α factor transformante de crecimiento α , BTC betaceluina, EPR epiregulina, HB-EGF unión a heparina factor de crecimiento epidérmico y las neregulinas Nrg/Neu. El término neuregulina se refiere al gen neu y es sinónimo de herregulina. Los siete factores de crecimiento se unen a EGFR / HER1, ninguno se une a ErbB2 / HER2, Nrg 1-2 se unen a ErbB3 / HER3 y siete ligandos



se unen a ErbB4 / HER4. (Fig. 2) El receptor ErbB3 / HER3 tiene actividad cinasa reducida. Al igual que todos los receptores con actividad tirosina cinasa, las funciones de la familia ErbB como dímeros u oligómeros es superior. Hay una isoforma principal de ErbB1 / HER1, dos isoformas de larga duración de ErbB2 / HER2 que difieren ligeramente debido al corte y empalme alternativo del ARNm, y dos isoformas de larga duración de ErbB3 / HER3, uno de los cuales no tiene los residuos 1-59. Hay dos versiones diferentes yuxtamembrana extracelular (JMA y JMB), y hay dos versiones diferentes de la cola carboxilo terminal (CTA y CTB) del receptor ErbB4 / HER4. Así, hay cuatro isoformas de larga duración de proteínas transmembranal ErbB4 / HER4 que se producen por empalme alternativo del ARNm: JMaCTa, JMaCTb, JMbCTa y JMbCTb **(31)**.

Los cuatro miembros de la familia ErbB son capaces de formar 28 homo y heterodímeros. Con los 11 factores de crecimiento en la familia de tipo EGF y 28 posibles dímeros, hay 614 posibles combinaciones de receptores (Tabla 1). Incluyendo ambas isoformas de larga duración de ErbB2 y ambas isoformas de ErbB3 aumenta el número de posibles combinaciones aún más. No todos los ligandos se expresan cerca de las células que poseen los receptores de la familia ErbB de manera que se reduce el número de posibles combinaciones en una célula dada, pero todavía apreciable **(32)**. ErbB2 no se puede enlazar a cualquier factor de crecimiento, de modo que es poco probable la formación de homodímeros. Sin embargo, la sobre-expresión de ErbB2 no fisiológica conduce a la formación de un homodímero funcional **(33)**.



ErbB2 es el compañero de dimerización preferido para todos los otros miembros de la familia ErbB **(34,35)**, los heterodímeros de ErbB2 con ErbB3 o ErbB 1 exhiben actividad de señalización robusta **(36)**.

Todos los ligandos de la familia de receptores ErbB se expresan como proteínas integrales de membrana **(37)**. Estos precursores de ligandos poseen un componente extracelular, un segmento transmembrana, y una pequeña porción intracelular. Los precursores del factor de crecimiento se producen en el segmento extracelular y son liberados por proteólisis por miembros de la familia ADAM (A disintegrin and metalloproteases) **(38)**.

| Dímeros | Ligandos | Combinaciones |
|---|--|---------------|
| ErbrbB1-EB1 | EGF, EPG, TGF α , HB-EGF, AR, BTC, EPR | 28 |
| ErbB1-ErbB2 | " | 7 |
| ErbB1-ErbB3 | EGF, EPG, TGF α , HB-EGF, AR, BTC, EPR, Nrg1, Nrg2 | 14 |
| ErbB1-ErbB4 (ErbB1-ErbB4JMa/CTa ErbB1-ErbB4JMa/CTb, ErbB1- ErbB4JMb/CTa, ErbB1- ErbB4JMb/CTb) | EGF, EPG, TGF α , HB-EGF, AR, BTC, EPR, Nrg1, Nrg2, Nrg3, Nrg4 | 49 |
| ErbB2-ErbB2 | No | No |
| ErbB2-ErbB3 | Nrg1, Nrg2 | 2 |
| ErbB3-ErbB3 | Nrg1, Nrg2 | 3 |
| ErbB2-ErbB4JMa/CTa , ErbB2- ErbB4JMa/CTb, ErbB2- ErbB4JMb/CTa ErbB2- ErbB4JMb/CTb. | BTC, HB-EGF, EPR, Nrg-1, Nrg-2, Nrg-3, Nrg-4 | 7 |
| ErbB3-ErbB4JMa/CTa , ErbB3- ErbB4JMa/CTb, ErbB3- ErbB4JMb/CTa, ErbB3- ErbB4JMb/CTb. | BTC, HB-EGF, EPR, Nrg-1, Nrg-2, Nrg-3, Nrg-4 | 14 |
| ErbB4JMa/CTa-ErbB4JMa/CTa, ErbB4JMa/CTa-ErbB4JMa/CTb, ErbB4JMa/CTa-ErbB4JMb/CTa ErbB4JMa/CTa-ErbB4JMb/CTb ErbB4JMb/CTa-ErbB4JMa/CTb | BTC, HB-EGF, EPR, Nrg-1, Nrg-2, Nrg-3, Nrg-4 | 28 |



| | | |
|---|--|--|
| ErbB4JMb/CTa–ErbB4JMb/CTa ErbB4JMb/CTa–ErbB4JMb/CTb ErbB4JMa/CTb–ErbB4JMa/CTb ErbB4JMa/CTb–ErbB4JMb/CTb ErbB4JMb/CTb–ErbB4JMb/CTb | | |
|---|--|--|

Tabla 2: Ligandos y dímeros que forman las combinaciones de los miembros de la familia EGFR.

Con respecto a su ligando cada dímero que se muestra presenta un numero definido de combinaciones llegando hasta 614 posibilidades. Modificado (17)

Los dominios de unión a ligando

La unión de factores de crecimiento a ErbB 1/ 3/4 promueve la dimerización de los receptores monoméricos y aumenta la actividad tirosina cinasa de los dominios intracelulares de ErbB1 / 2/4 **(39)**.

Los receptores de ErbB1 / 3/4 emplean un mecanismo de dimerización mediada por el receptor. El ligando bivalente, EGF o TGF, hace contacto en dos sitios distintos en los dominios I y III dentro de una molécula receptora individual. La estructura cristalina de rayos X del segmento extracelular de EGFR revela que el dominio rico en leucina I se asemeja, al dominio III y que el dominio rico en cisteína II se asemeja al dominio IV. El dominio III de EGFR tiene forma de β hélice de seis giros a la derecha en forma de cilindro que se corona en cada extremo por una α hélice y un enlace disulfuro. El dominio I tiene una estructura similar. Los dominios II y IV, en cambio, forman pliegues extendidos similares a barras a los que ocurren en láminas nucleares fibrosos que participan en la formación de lámina nuclear en el interior de la envoltura nuclear **(40-44)**.



La unión al ligando promueve un cambio conformacional grande en el segmento extracelular que abre los dominios extracelulares de los receptores y elimina un brazo de dimerización β -bucle-horquilla a partir de un enchufe en el dominio IV. Antes de que se una el ligando, el brazo está completamente enterrado en el dominio IV, que estabiliza una conformación del receptor cerrado o conexión que restringe su movimiento de modo que la unión del ligando y dimerización induce autoinhibición. La unión del ligando rompe la correa de sujeción intramolecular y permite que el brazo de dimerización se una con el dominio II de una segunda molécula de receptor unido al ligando **(44)**.

El EGF humano, es un factor de crecimiento de 53 residuos de amino ácidos, contiene tres enlaces disulfuro que dividen la molécula en tres bucles: el bucle A (Cys6-Cys20), el bucle B (Cys14-Cys31), y el bucle C (Cys-Cys 42 33). El bucle B forma una lámina β anti paralela de dos hebras. El bucle B interactúa con residuos en el dominio I y el bucle A y C e interactúan con residuos en el dominio III. Teniendo en cuenta que la estequiometría del dímero EGFR es 2: 2 (2 EGF: 2EGFR) **(45,46)**.

La estructura de ErbB3 y ErbB4 asemeja a la de ErbB1. ErbB3 y ErbB4 poseen una estructura anclado y cerrado con un contacto de dominio II / IV similar a la observada en ErbB1. En contraste, ErbB2 existe en una conformación extendida y abierta y el brazo de dimerización está expuesto y no enterrado. Al no tener ligando, ErbB 2 está listo para la dimerización con otros miembros de la familia ErbB **(47)**.

Cho y Leahy analizaron los residuos en el brazo de dimerización y sus contactos en el dominio IV de la familia ErbB. ErbB1 / 3/4 contienen Gly 588/582/586 en la región de contacto de dominio IV mientras que ErbB2 contiene una prolina en la posición 612. Además, ErbB1 / 3/4 contienen His590 / His584 / Asn588 en la región de contacto de dominio IV mientras que ErbB2 contiene una fenilalanina en la posición 614. Estos cambios pueden ser responsables de la incapacidad del dominio IV de ErbB2 para aceptar el brazo de dimerización para formar la estructura cerrada y anclada **(48)**.

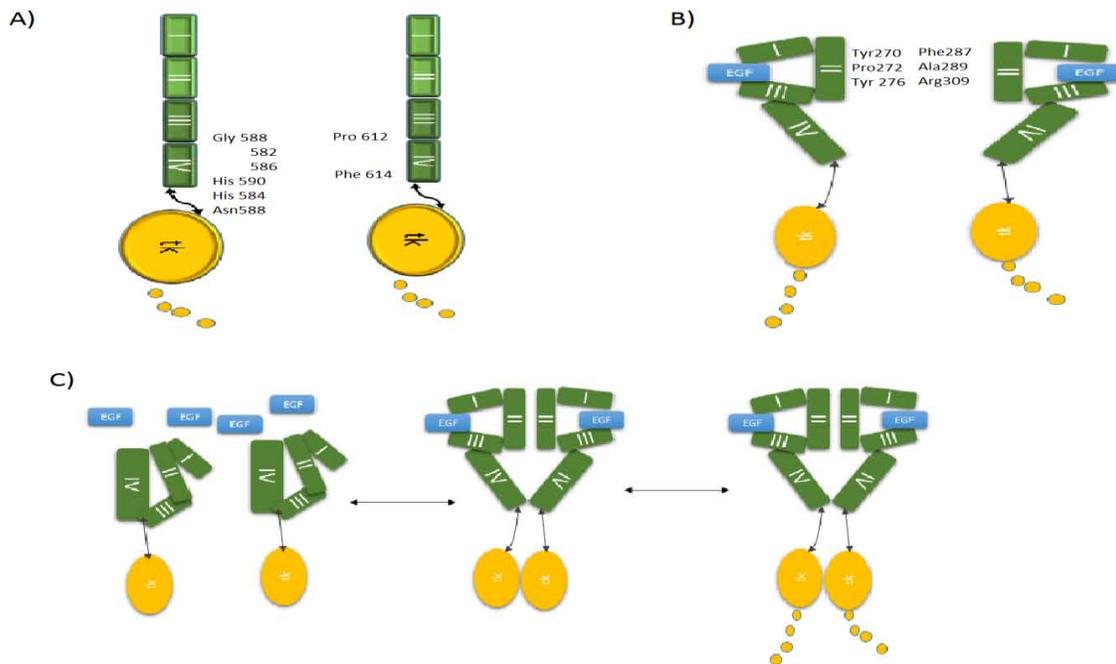


Figura 3 A: Activación del receptor EGFR al unirse con su ligando y las diferencias de los miembros de la familia HER 1,3,4 con el HER 2, estos difieren entre sí por eso el HER 2 no puede mantener una estructura inactiva.

B) Unión de dímeros las Tyr270, Pro272, Tyr275 en el receptor A interactúan con Phe 287, Ala 289, Tyr 299, y Arg309 del receptor B; los contactos recíprocos de receptor B interactúan con el receptor A del homodímero EGFR.

C) Formación de dímeros en la familia HER



Para el homodímero EGFR, el cual consiste en una receptor A y un receptor B *Ogiso y colaboradores 2002* mostraron que los residuos Tyr270, Pro272, Tyr275 en el receptor A interactúan con Phe 287, Ala 289, Tyr 299, y Arg309 del receptor B; los contactos recíprocos de receptor B interactúan con el receptor A del homodímero EGFR. En consecuencia, es probable que un mecanismo similar que implica un brazo de dimerización es responsable tanto de homo y heterodimerización de la familia de receptores ErbB **(40)**.

Macdonald-Obermann et al. 2013, analizaron la interacción de EGFR, ErbB2, ErbB3 mediante el ensayo de luciferasa. La luciferasa de luciérnaga se puede dividir en fragmentos amino-terminal y carboxilo terminal, los cuales no muestran actividad de la enzima sola, pero que forman un complejo funcional de la enzima cuando se unen. Se fusionan estos fragmentos de la luciferasa a la C-terminal de los tres receptores y se expresa en forma estable en células CHO. Encontraron que (NRG-1 beta, que se une a ErbB3), conduce al siguiente orden de unión de receptor/ estabilidad: ErbB2/ErbB3 > EGFR/ErbB3 > ErbB3/ErbB3. El EGF induce la formación de homodímeros de EGFR en la exclusión de la formación de heterodímeros EGFR / ErbB3 cuando ambos están presentes en la célula. El EGF, que se une a EGFR, conduce al siguiente orden de unión de receptor y la estabilidad: EGFR/EGFR \approx EGFR/ErbB2 >> EGFR/ErbB3. Además, existe evidencia de la formación de pre-dímeros de EGFR/ErbB2, EGFR/ErbB3, y ErbB2/ErbB3 que existen en la membrana plasmática antes de la adición del factor de crecimiento **(49)**.



Dominio catalítico de cinasa de tirosina

El dominio de cinasa de tirosina presente en la familia de receptores ErbB/EGFR presenta una estructura bilobulada; los residuos 685-769 comprenden el lóbulo amino terminal de la cinasa y los residuos 773-953 componen el lóbulo carboxilo terminal. El lóbulo más pequeño tiene un arreglo de láminas β en anti paralelo, con regiones ricas en glicina y el asa de unión a ATP está comprendida entre los residuos 695-700. La estructura del lóbulo mayor (carboxilo terminal) es predominantemente en forma de β -hélice, este lóbulo es el responsable de la unión del péptido o proteína sustrato. Al igual que en otras proteínas cinasas, el sitio catalítico se encuentra en la hendidura formada por los dos lóbulos; la secuencia compuesta por Leu-Val-Ile (955-957) del lóbulo carboxilo terminal juega un papel importante en la dimerización de receptor independiente de unión a ligando, esta secuencia interactúa con el lóbulo mayor del dominio cinasa **(50)**. Se han detectado doce subdominios con residuos de aminoácidos conservados que constituyen el “centro” o sitio catalítico de las proteínas cinasas, de ellos, el motivo compuesto por los aminoácidos Lys/Asp/Asp participa de manera importante en las propiedades catalíticas del receptor de EGF **(51,52)**. La Lys-721 del EGFR representa un residuo invariable en la familia de receptores ErbB/EGFR, que tiende a formar enlaces con los fosfatos β y γ del ATP, conjuntamente el Asp-813 es la base catalítica que orienta el grupo tirosil del sustrato proteína en un estado catalítico que posiblemente extraiga un protón de la tirosina facilitando así el ataque nucleofílico del átomo del fosforo- γ del complejo Mg-ATP. El residuo Asp-831 es el primer residuo del asa de activación correspondiendo al lóbulo grande, 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 residuos HRDLAARN para HER1 (His 811- Asn 818), para HER2 (His 822- Asn829) y en HER4 (His 816-Asn 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 **(53,54)**. Bajo condiciones fisiológicas el ligando se une a su receptor formando homodímeros o heterodímeros con el o los receptores que a su vez permiten la activación del dominio citoplasmático y su correspondiente subregión con actividad tirosina cinasa. **(55,56)** La dimerización resulta en una autofosforilación o una transfosforilación de los residuos de tirosina en el segmento C terminal, que sirve como sitios de unión a moléculas de señalización que contengan dominios SH2 y PTB. La activación de los dominios de unión al ligando en la familia ErbB, induce cambios conformacionales en el dominio citoplasmático **(30,50, 55)**. La transferencia del fosfato γ del ATP a los residuos de tirosina blanco incluyen la participación de varias asas que comprenden el dominio catalítico de tirosina cinasa y su correcta conformación, por ejemplo, para HER2 los residuos 844-850 comprometen el asa de activación C-loop, que es crucial para la transferencia de grupo fosfato. La β C-hélice formada por los residuos 761-775 y el asa de unión a nucleótido o N-loop, los residuos 727-732, son responsables de la coordinación ATP y el sustrato de tirosina blanco **(56-58)**. El asa de activación A-loop comprende los residuos 863-884, que regula la activación de la cinasa, la cual cambia su conformación de manera extendida

sobreponiéndose a la C-loop y permitiendo el acceso del sustrato blanco en el asa catalítica C-loop (**53,55,59**).

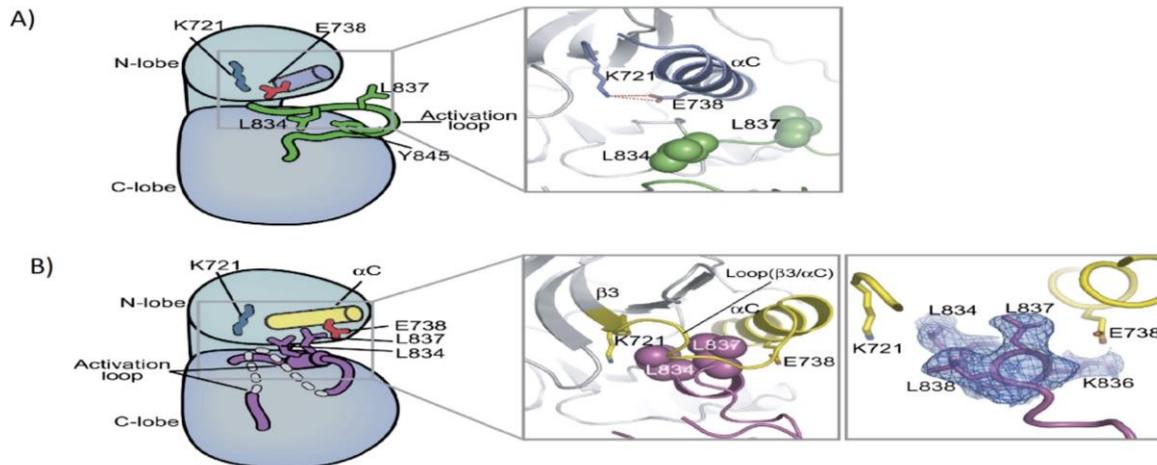


Figura 4 A: El sitio catalítico del dominio cinasa de EGFR en la conformación activa. Leu834 y L837 son de superficie expuesta y el par de iones Lys721 / Glu738 está intacta en esta conformación.

B) La conformación inactiva. Leu834 y L837 paquete contra la C hélice α , impidiendo la formación del par iónico Lys721 / Glu738. El panel derecho muestra la densidad de electrones en torno a los residuos 834-838 para el mutante dominio cinasa V924R. Modificado 17

Señalización EGFR

Las redes de señalización ErbB / HER se componen de varios módulos que están interconectados y superpuestos (fig 4). Estos incluyen la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K)/Akt (PKB), las MAPK cinasas, y fosfolipasa C γ (PLC γ). La vía PI3K/Akt juega un papel importante en la mediación de la supervivencia celular y la vía Ras/ERK1/2 y PLC γ participa en la proliferación celular. Estos y otros módulos de señalización ErbB participan en la angiogénesis, la adhesión celular, la motilidad celular, el desarrollo, y la organogénesis. (**59-61**)

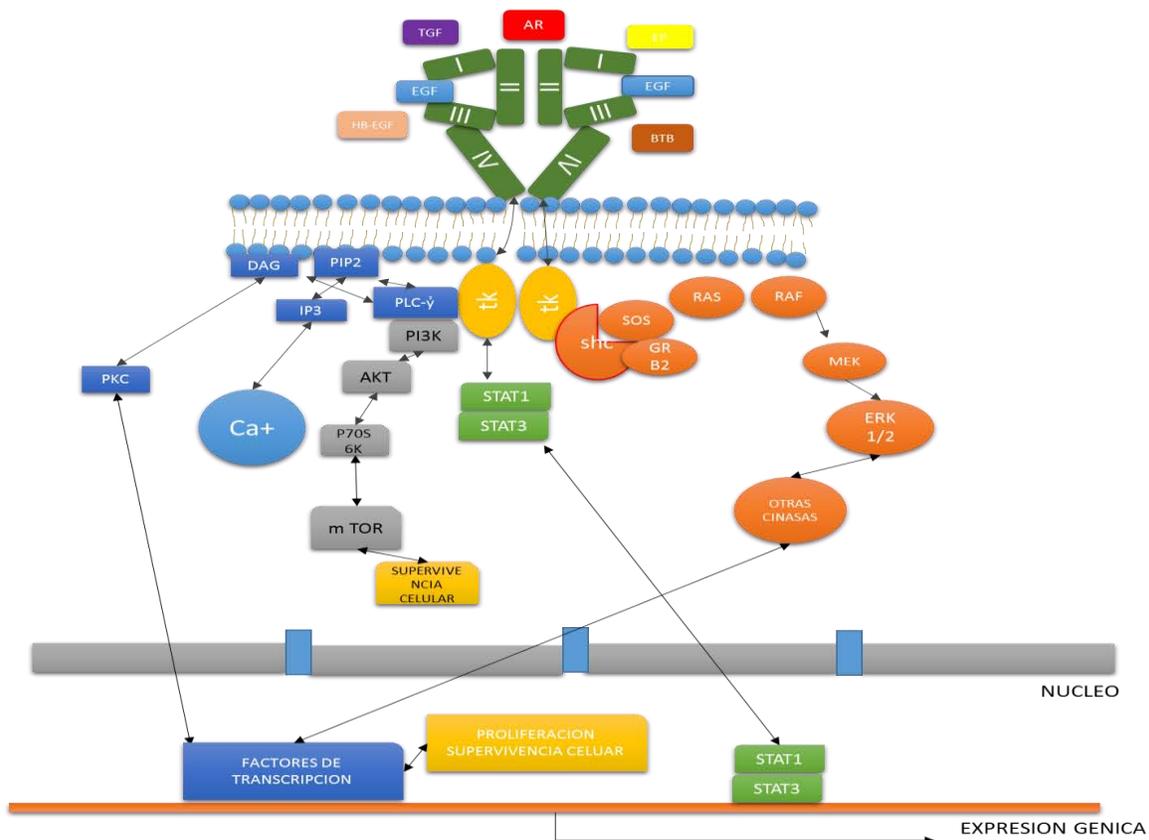


Figura 5: Vías de señalización del EGFR

EGFR en el cáncer

La desregulación de cualquier miembro de la familia EGFR/ErbB se encuentra asociada a procesos transformantes que pueden llegar a promover el desarrollo de diversos tipos de cáncer. Todos los miembros de la familia EGFR/ErbB tienen el potencial para estimular la cascada de señalización Raf-MEK-ERK, además de otras moléculas particulares como la fosfolipasa C que se une a fosfotirosinas en ErbB1 mediando la formación de diacilglicerol e inositol 1, 4,5-trifosfato, que son segundos mensajeros (62). La unión específica de la subunidad reguladora de la



fosfatidilinositol-3 cinasa (PI3K) a fosfotirosinas en los receptores ErbB3 y ErbB4 conlleva a la activación de la enzima; la activación del fosfatidilinositol 3-fosfato activa a su vez a la proteína cinasa B o AKT **(58, 63)**. La importancia de esta familia de receptores subyace en su capacidad de formación de dímeros capaces de activar de manera sustancial la vía de las MAPK y la vía de supervivencia PI3K/AKT **(62, 63, 51)**.

La complejidad de la vía de señalización de EGFR y su importancia en crecimiento celular y la supervivencia pone de relieve el rol que tienen las alteraciones de EGFR en el desarrollo y mantenimiento de algunas condiciones patológicas como el cáncer. El descubrimiento de las perturbaciones en las vías de señalización de EGFR que pueden contribuir a la transformación maligna fue reconocida a inicios de la década de los 80's en estudios que demostraron que EGFR es el homólogo celular del oncogen del virus de eritoblastosis aviar-B v-erbB, que codifica una proteína trunca, estrechamente relacionada con el receptor para EGF, reteniendo el dominio transmembranal y el dominio involucrado en la estimulación de la proliferación celular **(64)**. Las anomalías en las funciones de EGFR están asociadas con todas las características clave del desarrollo y crecimiento del cáncer incluyendo la proliferación celular autónoma, la invasión, la angiogénesis y el potencial metastásico **(65, 66)**.

Aberraciones en la señalización de EGFR pueden iniciarse por varios eventos tales como el aumento de la producción de ligandos, aumento de los niveles de proteína EGFR, mutaciones de EGFR dando lugar a variantes constitutivamente



activos, deficiencias en la regulación a la baja de EGFR e intercomunicación con sistemas de receptores heterólogos (Fig. 4) **(23)**. Niveles altos en la expresión de EGFR son características comunes de un fenotipo maligno en algunos tumores sólidos en humanos **(67,68)**. De hecho, EGFR es ampliamente expresado por muchos tipos celulares incluyendo linajes epiteliales y mesenquimales, con niveles usualmente entre 40,000 a 100,000 receptores por célula. En muchos casos los niveles de receptores en células malignas se encuentra muy elevado, por ejemplo, se han reportado alrededor de 2 millones de receptores por célula en carcinoma de mama **(68)**.

La señalización aberrante de EGFR debido a una regulación defectuosa a la baja del receptor también se ha relacionado con transformación celular neoplásica. La regulación del EGFR es un mecanismo por el cual la señalización se atenúa y se internaliza para la degradación posterior del receptor activado **(69,70)**.

El dominio citosólico de EGFR desempeña un papel importante en la atenuación de la señal del receptor. La capacidad de este EGFR mutante para escapar a la regulación a la baja sugiere que es debido a la falta de c-Cbl vinculante **(71)**. La c-Cbl es una ubiquitina ligasa que juega un papel central en la regulación a la baja de EGFR **(72-74)**. c-Cbl se une específicamente a sitios fosforilados en el dominio intracelular del EGFR y dirige la degradación lisosomal del receptor activado por ubiquitina **(75-78)**. Por lo que, los mutantes de EGFR que carecen de c-Cbl. provocar señales mitogénicas más fuerte que el EGFR de tipo silvestre **(78)**.



La expresión de EGFR puede dar como resultado el incremento de algunos mecanismos como la producción de los ligandos, el incremento en la transcripción del gen EGFR, la amplificación del gen EGFR y mutaciones que resultan en la activación constitutiva de la actividad de tirosina cinasa. EGFR está expresado frecuentemente en tumores escamosos de cabeza y cuello, cáncer colorrectal, mama, próstata, vejiga y ovario **(79-81)**. En el caso de cáncer de cabeza y cuello, la expresión de EGFR se observa en al menos el 80% de los tumores, y se correlaciona con una reducción en las tasas de supervivencia de los pacientes **(82)**. Varios estudios han demostrado que la expresión de EGFR se correlaciona con poca supervivencia libre de enfermedad y, en general, mal pronóstico, también hay mayor riesgo de recurrencia de la enfermedad, en un estadio tumoral avanzado existe un mayor riesgo de metástasis **(83)**. La gran expresión de los ligandos del EGFR en combinación con una mayor expresión del receptor mismo puede facilitar el desarrollo de una vía de crecimiento autócrino o paracrino que contribuyen en el desarrollo de la carcinogénesis. De hecho, la co-expresión de EGFR y TGF se correlaciona tanto con un mal pronóstico como con el desarrollo de varios tipos de cánceres humanos **(83)**.

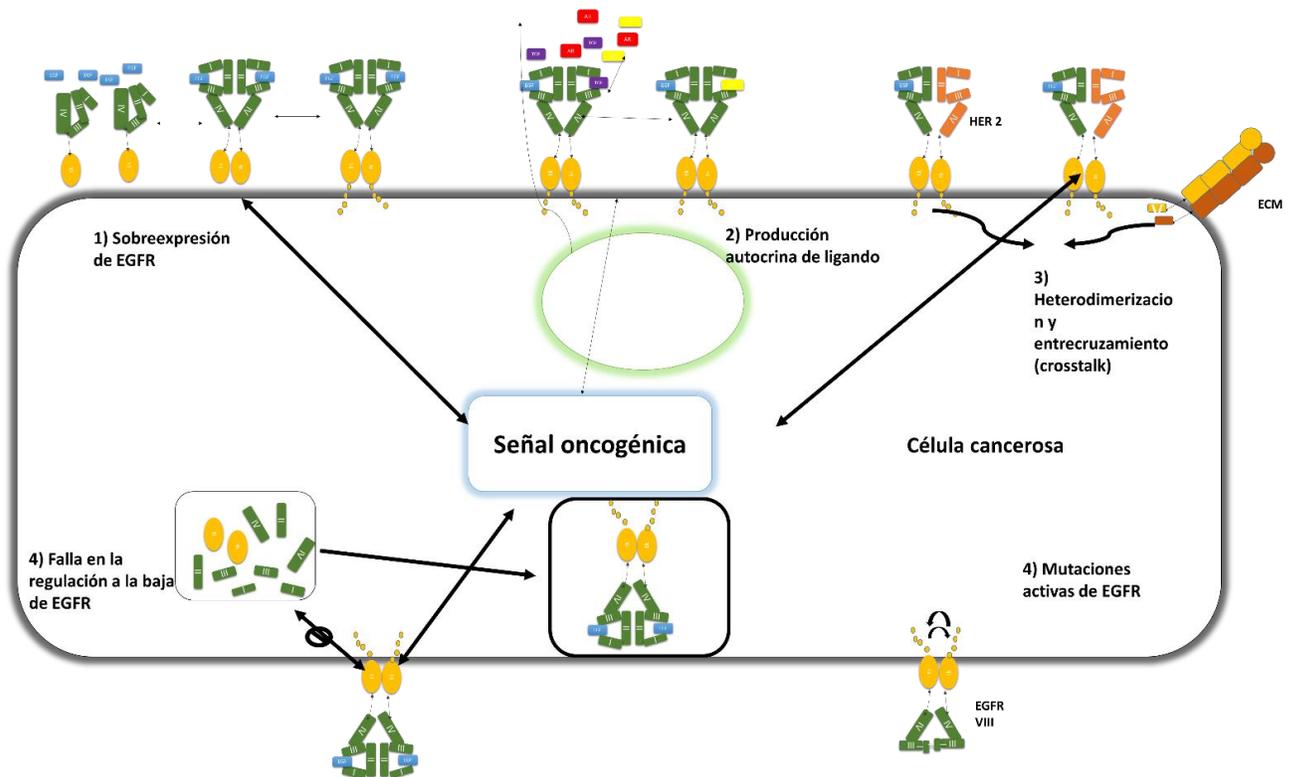


Figura 6: La desregulación de EGFR y puede llevar a una malignización. Estos pueden ser 1) sobreexpresión de la proteína EGFR; 2) Producción autocrina de ligandos, 3) la heterodimerización entre miembros de la familia EGFR y entrecruzamiento con otras vías de señalización; 4) mutaciones activas de EGFR las cuales pueden dar una señal muy fuerte; 5) falla en la regulación a la baja del receptor ya sea por una mutación activa o por fallas en los sistemas de internalización como los CBL.

Sin embargo, EGFR también puede inducir de manera independiente la presencia de los ligandos y este evento, conocido como la transactivación del receptor, tiene importantes implicaciones para el desarrollo del cáncer. El EGF se produce como precursor en las membranas y es a menudo cortado por proteasas de la superficie celular, que generan ligandos solubles. Esta división, conocida como desprendimiento del ectodominio, se produce por la intervención de algunas proteasas como las metaloproteinasas de matriz (MMP) y disintegrinas/metaloproteasas (ADAM) y parece ser particularmente relevante en la formación y



progresión del cáncer, ya que probablemente podría sufrir una estimulación constitutiva del receptor y sus vías intermedias, al igual que la señalización MAPK **(84, 85, 37, 38)**.

Algunas de estas proteasas son activadas por otros receptores de superficie celular llamadas receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), cuya activación por los agonistas específicos permite la transactivación de EGFR en células transformadas. En los tumores primarios de mama, la actividad de EGFR se correlaciona con niveles elevados de proteasas ADAM67 y en el cáncer de próstata con expresión alterada de GPCRs y sus ligandos que inducen el desarrollo del cáncer. Algunos agonistas de GPCR son capaces de transactivar no sólo EGFR, sino también otros receptores ErbB tanto en células normales y cancerosas. En el cáncer de próstata, a menudo se ha mostrado una activación de EGFR crónica y la expresión desregulada de GPCRs y sus ligandos se han relacionado con el desarrollo de tumores **(86-89)**.

La transactivación de ErbB implica también otras moléculas fisiológicas, como el estradiol (E2). De hecho, la liberación de E2 es estimulada por la activación de MMP2 y MMP9 y parece correlacionarse con la liberación de HB-EGF70; algunos antiestrógenos como el tamoxifeno, son capaces de transactivar tanto EGFR y ErbB2, y un efecto acompañado de una reducción de la actividad antiproliferativa del fármaco en células que sobre-expresan ErbB2-en cáncer de mama. La amplificación del gen que induce sobre-expresión de EGFR es una característica frecuente en muchos cánceres humanos, a menudo acompañados de otras



reorganizaciones estructurales que causan deleciones en el dominio extracelular del receptor, la más frecuente es la variante de tipo III del EGFR humano (EGFRvIII). A este receptor mutado le faltan los exones 1-7, que codifican para una parte del brazo de dimerización y se caracteriza porque conduce a la activación constitutiva de su dominio TK (tirosina cinasa) y es una alteración genética de EGFR frecuente en algunos tipos de cáncer, como glioblastomas malignos. Estos tumores a menudo presentan múltiples reordenamientos en el gen EGFR, tales como mutaciones puntuales y las mutaciones de inserción **(90-93)**.

La expresión de EGFR se correlaciona con un mal pronóstico y una peor evolución clínica de un gran número de enfermedades malignas, incluyendo CPNM (cáncer de pulmón no microcítico), cáncer de vejiga, cáncer de mama y de cabeza y cuello. La expresión de EGFR ha sido a menudo evaluada como un factor pronóstico independiente. La revisión de 200 estudios que incluyeron más de 20,000 pacientes, con el objetivo de determinar el valor pronóstico de la expresión de EGFR reveló el aumento de la reducción de las tasas de supervivencia de recurrencia libre o global, y un fuerte valor pronóstico de cáncer de colon, en ovario, vejiga, cáncer cervical y del esófago, así como moderada en cáncer de colon, en mama, cáncer gástrico y los tumores de endometrio, y débiles solo son para el NSCLC (células de carcinoma de pulmón) **(94-95)**. Además, el aumento del contenido de los receptores a menudo se asocia con un aumento de la producción de ligandos específicos de activación, como el TGF, por las mismas células tumorales, lo que lleva a la activación de los receptores a través de una vía de estimulación autocrina **(95,68)**. Recientemente se ha destacado la importancia



de mutaciones y deleciones del dominio cinasa EGFR, en los tumores derivados de pacientes con CPNM. La secuenciación del gen de EGFR reveló una fuerte correlación entre la presencia de mutaciones somáticas en el dominio cinasa del gen y la respuesta a la pequeña molécula EGFR-TKIs (inhibidores de tirosina cinasa de EGFR), mientras que las mutaciones del dominio extracelular, se encuentran comúnmente en los tumores cerebrales malignos. La activación de las mutaciones más frecuentes identificadas son las deleciones de los aminoácidos 746-750 en el exón 19, la sustitución de leucina por arginina en el codón 858 (L858R) y leucina por glutamato en el codón 861 (L861Q) en el exón 21, y la sustitución de glicina por cisteína en el codón 719 (G719C) en el exón 1977. Por el contrario, algunas mutaciones son capaces de inducir resistencia a TKIs (inhibidores de tirosina cinasa) como el cambio de la treonina por metionina, que son mutaciones puntuales (T790M o T766M) en el exón 20 **(96-98)**. El papel exacto de las mutaciones de EGFR en la carcinogénesis es un tema interesante de investigación. La mayor parte de estas mutaciones tienen un origen somático esto debido a la cantidad de mutaciones que puede tener un tejido con respecto al demás epitelio como en el cáncer de pulmón **(99)**. De hecho, en las células tumorales con EGFR mutante activan las vías de supervivencia PDK/Akt y STAT preferentemente, y el tratamiento de estas células con un TKI induce la apoptosis. Una de las funciones más interesantes de EGFR en la progresión tumoral es su participación en la angiogénesis a través de la regulación positiva del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y metaloproteinasas (MMP). En las células de cáncer humano, la vía del EGFR autócrina controla parcialmente la producción



de varios factores de crecimiento pro-angiogénicos, incluyendo VEGF81 y el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) **(100)**. Una vez activado EGFR induce una sobre regulación de VEGF *in vitro* en células de diferentes cánceres, incluyendo CRC, el cáncer de próstata, el glioma humano **(101)**.

En el cáncer humano, el equilibrio entre la muerte celular y la supervivencia a menudo se altera y las células cancerosas son capaces de sobrevivir en condiciones que normalmente inducen la muerte celular por apoptosis. El EGFR desempeña un papel relevante en la prevención de la apoptosis, uno de los mecanismos del desarrollo del cáncer. De hecho, el EGFR es eficaz en el bloqueo de la apoptosis inducida por receptores de muerte como la familia del receptor de factor de necrosis tumoral (TNF), que incluyen su receptor (TNFR), FAS, receptor de muerte 4 (DR4) y 5 (DR5) **(102)**. Los ligandos naturales de estos receptores son TNF, FAS ligando (FasL) y relacionada con el TNF, el ligando inductor de apoptosis (TRAIL). EGFR activado también puede afectar la apoptosis mediante la vía de regulación, a través de RAS/ERK, la expresión de las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP), tales como c-FLIP capaces de inhibir específicamente la función de la caspasa-8, mediante la reducción de la inactivación del receptor de la apoptosis inducida **(102-104)**. La estimulación de EGFR también es capaz de afectar la expresión del receptor de muerte y ligando FASL y el camino a través de la inhibición del factor de transcripción Forkhead o receptores de muerte DR-5 y DR4 a través de la inhibición de p53. Esto se traduce en reducción de la inactivación del receptor mediada por la apoptosis. Uno de los grupos más caracterizados de las proteínas que regulan la apoptosis es la familia Bcl-2, que



incluye a dos grupos distintos de las proteínas, pro-apoptóticos y los miembros anti-apoptóticos, respectivamente. La señalización del EGFR a través de la estimulación de NFkB por la vía de señalización PI3K/Akt, puede alterar el equilibrio entre los dos grupos, hasta la regulación de las moléculas antiapoptóticas de la familia Bcl-2, tales como Bcl-2, Bcl-xL o Mcl- 189. Además, la activación de la transcripción NFkB parece ser mayor en algunas células cancerosas **(105-108)**. El punto crítico del cruce entre las vías de señalización del EGFR y la red de apoptosis se estratifica en múltiples niveles y finalmente regula e influye en el potencial apoptótico de la célula, lo que representa uno de los determinantes más importantes de la supervivencia de las células cancerosas. Además de las perturbaciones en la expresión de EGFR, mutaciones y la producción del ligando, las vías de señalización intracelulares posteriores están bajo el control de los receptores y son frecuentemente alteradas en las células tumorales. El aumento de la actividad del EGFR y la supervivencia celular mediada por Akt se han descrito en aproximadamente el 25% de los tumores sólidos como el de mama y mutaciones en el regulador negativo PTEN en glioblastomas **(109)**. Finalmente, la activación de EGFR se correlaciona con la desregulación de la activación constitutiva de las proteínas STAT, que posee propiedades oncogénicas como la capacidad de prevención de la apoptosis en varios tipos de cáncer humano **(110)**. Estas alteraciones del EGFR relacionadas con las vías de señalización a menudo se presentan simultáneamente en la célula cancerosa, asegurando la supervivencia sostenida, metástasis y resistencia a cualquiera de las terapias convencionales o específicas.



Ensayos de cinasa

Al activarse el EGFR por unión del ligando éste se dimeriza, se transfosforila y fosforila a diversas proteínas blanco, por lo que medir la actividad cinasa en enzimas como esta es importante para determinar la activación de este tipo de moléculas.

Tradicionalmente, los ensayos de cinasa se realizan utilizando isótopos radiactivos y recuento de centelleo para medir la incorporación de $\gamma\text{-P}^{32}$ en un sustrato. Estos métodos son relativamente insensibles, ya que no son adecuados para la detección de cambios discretos en la actividad enzimática, y están limitados por la degradación del péptido inducida por la radiación y la corta vida media de $\gamma\text{-P}^{32}$. Además, la exposición a los isótopos radiactivos plantea un riesgo para la salud, y por lo tanto, el uso de un ensayo de cinasa no radiactivo es preferible. Existen ensayos de cinasa no radiactivos que visualizan los desplazamientos de la banda en geles no desnaturalizantes de poliacrilamida y el uso de anticuerpos monoclonales que indirectamente se cuantifican. También se puede visualizar usando análisis de la proteína mediante inmunoblot por inmunofluorescencia. Tales métodos están limitados por la disponibilidad de anticuerpos específicos para los residuos fosforilados bien caracterizados en una proteína de interés, numerosos pasos de incubación, y por el tiempo largo cuando múltiples sustratos están siendo examinados a la vez. Existen otros ensayos que se basan en el seguimiento de la formación de ADP, que es directamente proporcional a la actividad enzimática fosfotransferasa y se mide fluorométricamente. Estos kits de



enzima-acoplada proporcionan un ensayo rápido, simple, y homogéneo para medir las actividades de la cinasa. Es un método no radiactivo para detectar la cantidad de ADP que se produce a partir de la reacción enzimática. Sus características de alta sensibilidad y amplia tolerancia lo convierten en un sistema ideal para la determinación de la cinética de cinasa Michaelis-Menten y para la detección y la identificación de inhibidores de la cinasa **(111)**.



3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a que el cáncer cervicouterino sigue siendo un problema de salud pública en México, es importante entender los mecanismos de señalización que se activan en células de cáncer de cérvix, debido a que su desregulación y amplificación son mecanismos comunes en algunos tipos de cánceres.

Por tal motivo, lo que busca este proyecto es analizar la actividad catalítica de EGFR al ser activado con su ligando natural en líneas de cáncer cervicouterino CALO e INBL. Esto debido a que en trabajos previos encontramos que este receptor estaba presente pero no estaba activo., lo que nos llevó a pensar que el receptor estaba mutado o no era funcional.

Tal inactivación no es normal debido a que el EGFR es un receptor transmembranal que activa vías de señalización relacionados con motilidad, proliferación y diferenciación celular. El EGFR al activarse transfosforila residuos de tirosina (actividad tirosina cinasa) los cuales también pueden interactuar con proteínas con dominio SH2 y activar cascadas de señalización. La sobreexpresión de los miembros de la familia EGFR se ha relacionado con varios tipos de cáncer como: mama, pulmón y ovario. Por esta razón se han utilizado como blancos terapéuticos en el tratamiento de este tipo de tumores utilizando inhibidores de la actividad cinasa y anticuerpos dirigidos contra el receptor.



4. ANTECEDENTES

En 2003, Soto Cruz *et al.*, demostraron la presencia de HER2 en líneas de cáncer de cérvix CALO e INBL y su activación en tirosina para activar cascadas de señalización **(112)**.

En 2007, Soto *et al.*, demostraron que el EGFR estaba presente en células de cáncer de cérvix CALO e INBL, pero no estaba fosforilado **(113)**.

5. JUSTIFICACIÓN

Debido a la alta incidencia de cáncer de cérvix en México se han buscado varias alternativas para su tratamiento. La presencia de EGFR en tumores sólidos es común en varios tipos de cáncer lo que llevo a pensar que en las líneas de cáncer de cérvix CALO e INBL, el EGFR está presente y activo. Nuestro grupo de trabajo demostró que el EGFR está presente pero no se encuentra fosforilado, por lo que planteamos que carece de actividad catalítica debido a una alteración en el dominio de cinasa. Además, que esta proteína podría funcionar al formar dímeros con HER2, dando lugar a una transducción de señales más eficiente.



6. HIPÓTESIS

- Se ha demostrado que el EGFR en líneas celulares de cáncer de cérvix CALO e INBL no se encuentra fosforilado, por lo que la actividad catalítica de cinasa de tirosina del receptor será nula.

7. OBJETIVO

- Determinar la actividad catalítica de cinasa de tirosina del EGFR en células de carcinoma de cérvix CALO e INBL.

8. OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer las condiciones experimentales del ensayo de cinasa *in vitro*.
- Analizar la fosforilación en tirosina del EGFR en las células CALO e INBL.
- Determinar la actividad catalítica de cinasa de tirosina del EGFR en células CALO e INBL.



9. METODOLOGÍA

Cultivo celular

Se cultivaron las líneas celulares de carcinoma de cérvix: CALO (IIB HPV 18), INBL (IVB HPV18) (**114**), HeLa (HPV 18), CaSki (HPV 16) y THP-1 (monocitos) (**115**), las cuales fueron mantenidas en medios de cultivo RPMI 1640 (Microlab) adicionado con suero fetal bovino (Gibco) al 10% en una incubadora al 5% de CO₂, 37°C y humedad saturante.

Lisado celular

Se utilizaron 5.5×10^6 células (ensayo de cinasa *in vitro*) y 8.0×10^6 células (presencia de la proteína) de las líneas celulares CALO, INBL, HeLa, CasKi y THP-1, las cuales se estimularon con 2ng (1ng/ μ L) de EGF durante 5 minutos y células sin estímulo con EGF como control negativo.

Se retiró el sobrenadante, se lavó con PBS frío y después se lisaron las células con 500 μ L de buffer de lisis con inhibidores (leupeptina y pepstatina) despegando las células mecánicamente y colocando los lisados en tubos eppendorf de 1.5 ml. Las células se incubaron durante 15 min en hielo y se centrifugaron a una velocidad de 13000 rpm durante 15 minutos.

Inmunoprecipitación

Se colocaron 25 μ L de esferas de agarosa (Invitrogen) en tubos eppendorff de 1.5 ml y se lavaron 3 veces agregando 150 μ L de buffer de lisis en lapsos de 1 minuto a 13000 rpm. Al terminar los lavados, añadimos 1 μ L del anticuerpo anti-EGFR



(Santa Cruz Biotechnology) y se incubó por 1 hora en agitación a 4°C. Posteriormente, se adicióno el lisado celular y se incubo por 3 horas, a 4°C en agitación. Una vez transcurrido el tiempo, las esferas se lavaron y se agregaron 25µL de buffer de Laemmli y se hirvieron por 5 minutos.

Electroforesis SDS-PAGE y Western Blot

Las muestras se separaron en un gel SDS-PAGE al 10%. Se cargaron 25µL de las muestras y se corrieron en una cámara vertical de electroforesis (ATTO) con buffer de corrida durante 125 minutos a 90V.

Al concluir la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa en una cámara de transferencia semi-húmeda (Pharmacia Biotech) durante 1 hora con buffer de transferencia. Al terminar la transferencia las membranas se bloquearon toda la noche con albumina al 3% en TBS-Tween.

Inmunoblot

Las membranas se incubaron con los anticuerpos anti-fosfotirosina py99/py20 (1:500 de cada anticuerpo) en albumina al 3% durante 180 minutos. Al terminar se hicieron 3 lavados con TBS-Tween y 2 lavados con TBS, después se incubó con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con HRP (THERMO) durante 60 minutos. Las membranas se lavaron 5 veces con TBS y 2 con PBS, posteriormente se agregó 1mL de solución de quimioluminiscencia (Pierce) y se incubaron 5 minutos. Se visualizaron las proteínas utilizando películas fotográficas (Kodak).



Para analizar la presencia de otra proteína en la misma membrana, se eluyeron los anticuerpos con buffer de elución durante 1 hora a 80°C. Posteriormente, se lavó por 15 minutos, seguido por dos lavados de 5 minutos con TBS-Tween, 3 lavados con TBS solo y se bloqueó con albumina al 3% toda la noche. Después, la membrana se incubó con anticuerpos anti-EGFR durante 180 minutos, al terminar se lavan 3 veces durante 5 minutos con TBS-Tween y 2 veces con TBS solo. Al concluir los lavados, se incubó el anticuerpo secundario anti-ratón-HRP durante 60 minutos, pasado ese tiempo se lavó la membrana como ya señalo antes. Se utilizaron reactivos de quimioluminiscencia para visualizar las proteínas.

Ensayo de cinasa *in vitro*

Para el ensayo de cinasa *in vitro* se utilizó el kit comercial Universal Kinase Assay de la marca Abcam (Cambridge, UK.). El ensayo de cinasa *in vitro* consta de 3 reactivos que son el ADP assay buffer, el ADP sensor y el sensor buffer, de los cuales se agregaron 20 µL de ADP assay buffer, 20 µL de ADP sensor y 10 µL de sensor buffer, de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Después de inmunoprecipitar las proteínas con las esferas de agarosa acopladas al EGFR se lavaron 3 veces con buffer de lisis, 3 veces con PBS frío pH 7 y con TRIS más agua (apéndice). Posteriormente, en una placa oscura de fondo claro (Thermo) se colocaron las esferas y se agregaron los reactivos del kit, además de 1 µL de ATP (Sigma Aldrich) y 1µL del substrato para las cinasas (poli Glu- Tyr Sigma Aldrich). Se incubaron por media hora, transcurrido el tiempo se leyeron las muestras en un fluorómetro (Fluoroskan Ascent FL de THERMO) con una emisión



540 nm y una excitación 590 nm. Los resultados se analizaron en gráficas de barras y se hizo un análisis estadístico de t de Student.

10. RESULTADOS

Presencia del EGFR en las líneas celulares

Para determinar la presencia de la proteína EGFR en las líneas celulares CALO e INBL se llevó a cabo una inmunoprecipitación y las proteínas se analizaron mediante un inmunoblot, utilizando los anticuerpos anti-fosfotirosina y anti-HER1. Las líneas celulares se estimularon con EGF, durante 5, 10 y 15 minutos, además de un control sin el ligando. Esto con la finalidad de ver si aumentaba la fosforilación en tirosina del receptor. En la figura 7 se observa la presencia de la proteína EGFR que no está fosforilada.

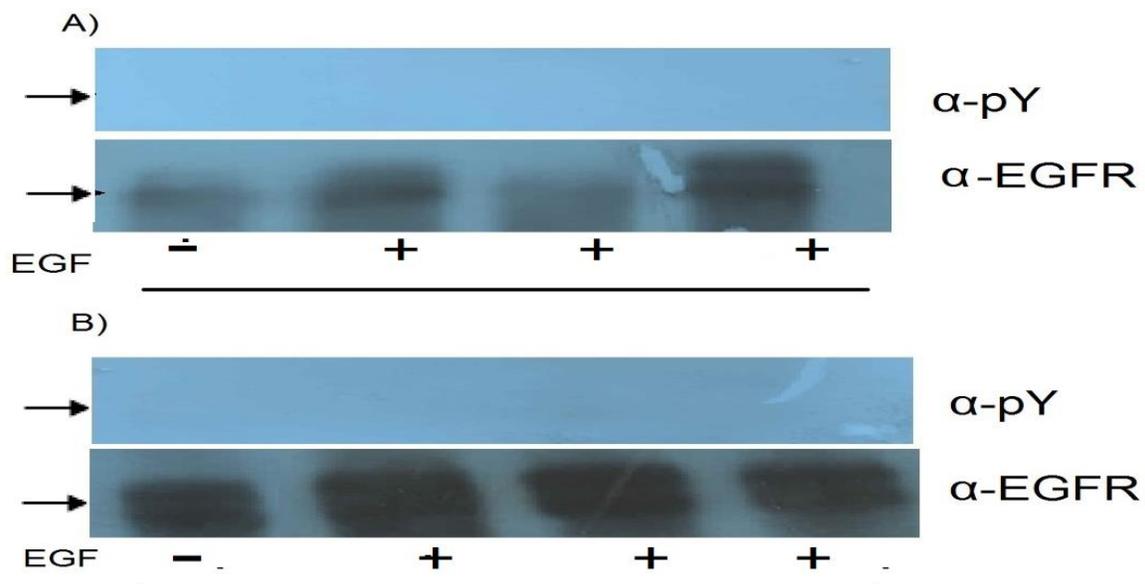


Figura 7: Efecto sobre la fosforilación de EGFR. El receptor para EGF se fosforila en respuesta a su ligando EGF en las líneas de cáncer de cérvix A) CALO e B) INBL. Las células fueron estimuladas con EGF durante 5, 10 y 15 minutos, y se lisaron. Las proteínas, se inmunoprecipitaron, se separaron en un gel SDS-PAGE 10% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Los revelados se hicieron con anticuerpo anti-fosfotirosina y con el anticuerpo secundario conjugado con HRP. El revelado se realizó mediante quimioluminiscencia. Después se hizo una elución acida y se reveló con los anticuerpos anti-EGFR/HER1 y se detectaron las proteínas mediante quimioluminiscencia.

Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado (113), el receptor está presente pero no se fosforila en tirosina en respuesta a su ligando natural. Aún en lapsos de tiempos más grandes, no pudimos observar un aumento en la fosforilación.

Presencia de la proteína y fosforilación

Al observar la ausencia de fosforilación en el receptor EGFR presente en las líneas celulares CALO e INBL, se utilizó como control la línea celular HeLa, que pertenece al linaje epidérmico de cáncer de cérvix HPV 18 y en la cual se ha reportado la presencia del receptor activo. En la figura 8 se observa la fosforilación del receptor EGFR en la línea celular HeLa, pero no se observa fosforilación del EGFR en las células CALO e INBL. Además, se muestra el radio de fosforilación para el receptor en las células HeLa. Se observa la escasa fosforilación en las líneas celulares CALO e INBL comparada con HeLa.

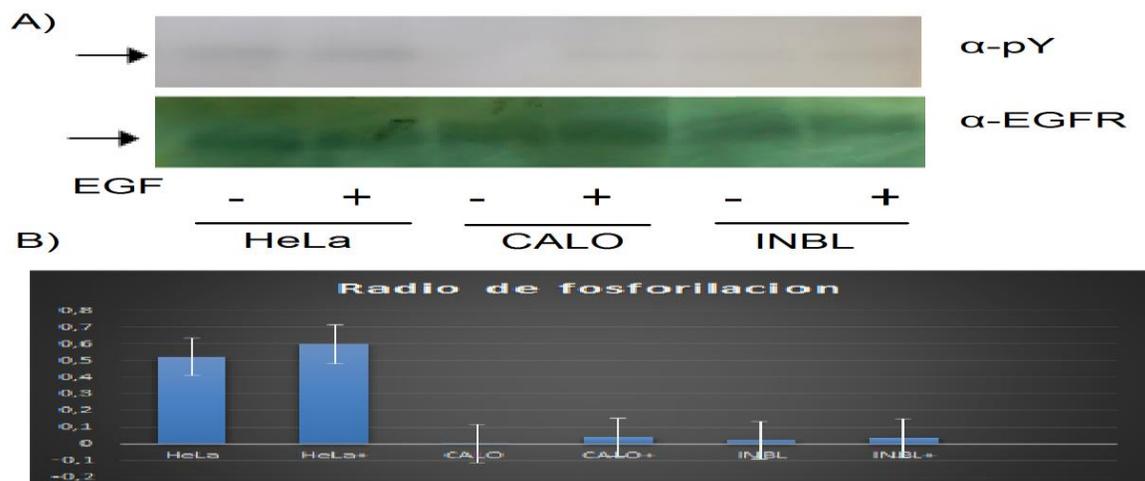


Figura 8 A): El EGF induce fosforilación en tirosina en la línea de cáncer de cérvix HeLa. Las líneas celulares CALO, HeLa e INBL fueron estimuladas con EGF durante 5, 10 y 15 minutos. Las células se lisaron y se separaron en un gel SDS-PAGE 10%, después se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Los revelados se hicieron con anticuerpos anti-fosfotirosina y el anticuerpo secundario conjugado con HRP. Las proteínas se visualizaron mediante quimioluminiscencia. Después se hizo una elución ácida y la membrana se incubó con los anticuerpos anti-EGFR y se detectaron las proteínas mediante quimioluminiscencia.

B) Radio de fosforilación de las líneas CALO, INBL y HeLa.



Estandarización del ensayo de cinasa *in vitro*

El ensayo de cinasa *in vitro* se llevó a cabo de acuerdo a las condiciones señaladas por el fabricante. Sin embargo, para la reacción se necesitaban dos reactivos que son limitantes para el proceso, el sustrato y el ATP. Decidimos usar como sustrato el péptido poly-Glu-Tyr (Sigma Aldrich), ya que se ha reportado que funciona bien como sustrato de cinasas, y ATP.

Los reactivos empleados para la reacción de cinasa *in vitro* son: ADP assay buffer, ADP sensor, sensor buffer, sustrato Poly-Glu-Tyr y ATP.

Las concentraciones y el sustrato se usaron de acuerdo a lo citado en la literatura en que se utilizó el kit de cinasa con el Poly-Glu-Tyr como aceptor de fosfatos. **(116-119)**. Los resultados para los primeros ensayos mostraron valores muy altos para la reacción de cinasa *in vitro*, por lo que tuvimos que ajustar las concentraciones de los reactivos para reducir la inespecificidad.

Las líneas celulares empleadas para la estandarización del ensayo de cinasa *in vitro* fueron: CALO, INBL, HeLa, CasKi, THP-1.

Para estandarizar y medir óptimamente la actividad de cinasa del EGFR se usó un control de agua, un control con esferas de agarosa y un control con los reactivos del kit. El valor obtenido para la mezcla de los reactivos del kit de cinasa *in vitro* en el fluorómetro, se le resto al resultado final de las absorbancias, esto para determinar la cantidad de fluorescencia emitida por los reactivos sin las proteínas y así asegurarnos que se estaba midiendo la actividad de la enzima.



Se realizaron varios ensayos para determinar la concentración óptima del sustrato Poly-Glu-Tyr y del ATP para optimizar el sistema, ya que los valores iniciales indicaban que el sistema estaba saturado y no mostraba la actividad catalítica real.

Con respecto al ATP, usamos distintas concentraciones, diferentes a 1mM que se recomienda en el kit. Utilizamos 0.1mM, 0.01mM y 0.001mM pero determinamos que la concentración óptima para el ensayo era 1mM, por lo que ya no se cambió en el resto de los ensayos. También utilizamos diferentes volúmenes para reducir el volumen total del ensayo. Probamos 1 μ L, 0.5 μ L, 0.1 μ L, sin que hubiera cambio aparente en el resultado final, por lo que utilizamos 1 μ L.

El tiempo adecuado de incubación fue de 30 minutos.

Los volúmenes determinados como óptimos para el ensayo de cinasa *in vitro* se muestran en la tabla 3; el tiempo de incubación fue de 30 minutos.

**Tabla 3: Reactivos del ensayo de cinasa *in vitro***

| | |
|---|---------------------------|
| Kit de cinasa <i>in vitro</i> ADP assay buffer | 20 μ L |
| ADP sensor | 20 μ L |
| Sensor buffer | 10 μ L |
| Poly-Glu-Tyr (Sigma Aldrich) (concentración inicial 1mg/mL) (116-119) | 100 μ g/mL(1 μ L) |
| ATP (Sigma Aldrich) (concentración 1mM) | 1 μ L |
| Volumen total de la reacción cinasa (μ L) | 52 μ L |

En la figura 9 se muestran los resultados del ensayo estandarizado, en el cual se mide la actividad catalítica de una manera muy eficiente.

En la figura 9, panel A, se muestra la actividad del EGFR en las líneas celulares CALO, HELA, INBL, CASKI y THP-1. Se puede observar que las líneas celulares CALO y HELA tienen una mayor actividad enzimática que las demás líneas, llegando a duplicar (CALO) o quintuplicar (HELA) su actividad catalítica, al ser estimuladas con EGF. Es importante señalar que el EGFR presente en estas líneas celulares tiene actividad catalítica, incluyendo la línea celular THP-1. Esta es una línea celular de origen mieloide que aparentemente no expresa EGFR, por lo que utilizo para comparar con las células de origen epitelial, que si lo presentan. Sin embargo, los resultados muestran que el EGFR está presente en las células

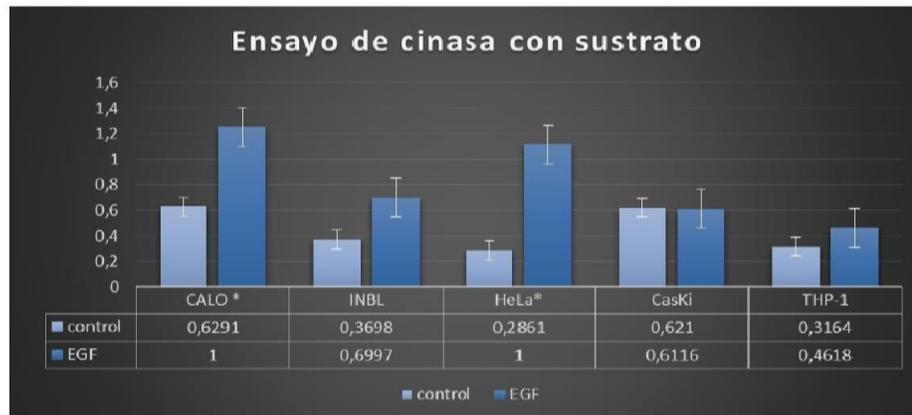


THP-1 y tiene actividad catalítica. Esto concuerda con algunos reportes que indican que esta línea celular expresa EGFR.

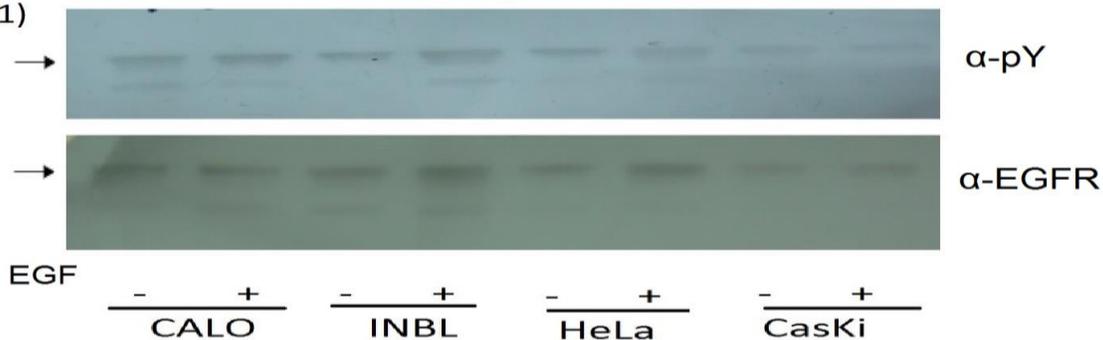
Las proteínas inmunoprecipitadas que se utilizaron en el ensayo de cinasa *in vitro* se separaron mediante SDS-PAGE 10% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Mediante inmunoblot determinamos la presencia del receptor. Esto se hizo con la finalidad de mostrar la presencia de las proteínas y para determinar si al ser sometidas al ensayo de cinasa *in vitro* se fosforilaban.

En el inmunoblot (figura 9, panel B1) observamos que el EGFR presente en todas las líneas celulares está fosforilado en tirosina, lo cual implica actividad catalítica de cinasa de tirosina. Se determinó el radio de fosforilación (programa Win Image Studio), las densitometrías muestran que el receptor utilizado en el ensayo de cinasa tiene actividad catalítica, pero solo en condiciones *in vitro* (figura 9, panel B2). El radio de fosforilación de EGFR para las líneas INBL y HeLa es semejante y aumenta con el estímulo de EGF. El radio de fosforilación de EGFR presente en las líneas CasKi y THP-1 es muy similar, aunque es menor que el resto de las líneas celulares.

A)



B1)



B2)



Figura 9 A: Ensayo de cinasa con sustrato PolyGluTyr. Las líneas celulares CALO, INBL, HELA, CASKI THP-1 fueron estimuladas con 2ng de EGF. Se lisaron con buffer de lisis durante 30 minutos, el lisado se adiciono a las esferas de agarosa con anticuerpo anti- EGFR y se incubaron por 3 horas. Se lavaron 5 veces con buffer de lisis, PBS frio y Tris. Posteriormente se realizó el ensayo de cinasa *in vitro*; después de 30 minutos de reacción se leyeron las muestras en un fluorómetro a una excitación de 540nm y una emisión de 590nm.

B:1) Western blot de las líneas celulares CALO, INBL, HELA, CASKI y THP-1, las cuales se utilizaron después del ensayo de cinasa *in vitro*. Las líneas celulares fueron estimuladas con EGF durante 5, 10 y 15 minutos. Las células se lisaron y se separaron en un gel SDS-PAGE 10%, después se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Los revelados se hicieron con anticuerpo primario anti-py99, anti-py20 y el anticuerpo secundario conjugado con HRP. El revelado se realizó mediante quimioluminiscencia. Después se hizo una elución acida y se revelo con los anticuerpos anti-EGFR /HER1 y se detectaron las proteínas mediante quimioluminiscencia. **B2)** Radio de fosforilación de todas las líneas celulares.



Ensayo de cinasa *in vitro* sin sustrato

Para evaluar la capacidad de autofosforilación del receptor se llevó a cabo un ensayo de cinasa *in vitro* sin sustrato Poly-Glu-Tyr.

Los resultados muestran que, aunque baja, se presenta una actividad medible en todas las líneas celulares. Se puede observar que la actividad catalítica del receptor aumenta con el estímulo de EGF, y tal como se observó en los ensayos con sustrato, el EGFR muestra una actividad catalítica más alta en las líneas HeLa y CALO (Figura 10 A).

Al no haber sustrato presente, la actividad catalítica registrada indica la capacidad de autofosforilación del receptor. Esta capacidad de autofosforilación se observa en todas las líneas celulares, se observa un aumento en la fosforilación en tirosina en las líneas CALO, CasKi y HeLa. En las líneas INBL y THP-1, el EGFR tiene actividad catalítica y se autofosforila, pero no aumenta en respuesta a la unión del ligando. Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente con la prueba t de Student y se concluyó que los resultados obtenidos para CALO y para HeLa tienen una diferencia significativa en comparación con las demás líneas celulares (Figura 10 A).

Al terminar el ensayo de cinasa, las proteínas fueron separadas mediante SDS PAGE, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y posteriormente se detectaron las proteínas fosforiladas, así como a la molécula HER 1 sin fosforilar. Los resultados muestran que, aunque las proteínas están presentes, no se detecta la fosforilación en tirosina en el inmunoblot (figura 10 B). Esta autofosforilación del

receptor representa la actividad basal del mismo, es probable que el nivel de detección del inmunoblot sea menor que el del ensayo de cinasa, por lo que no es posible visualizar a la proteína fosforilada, tal y como se observó en el ensayo de cinasa con sustrato.

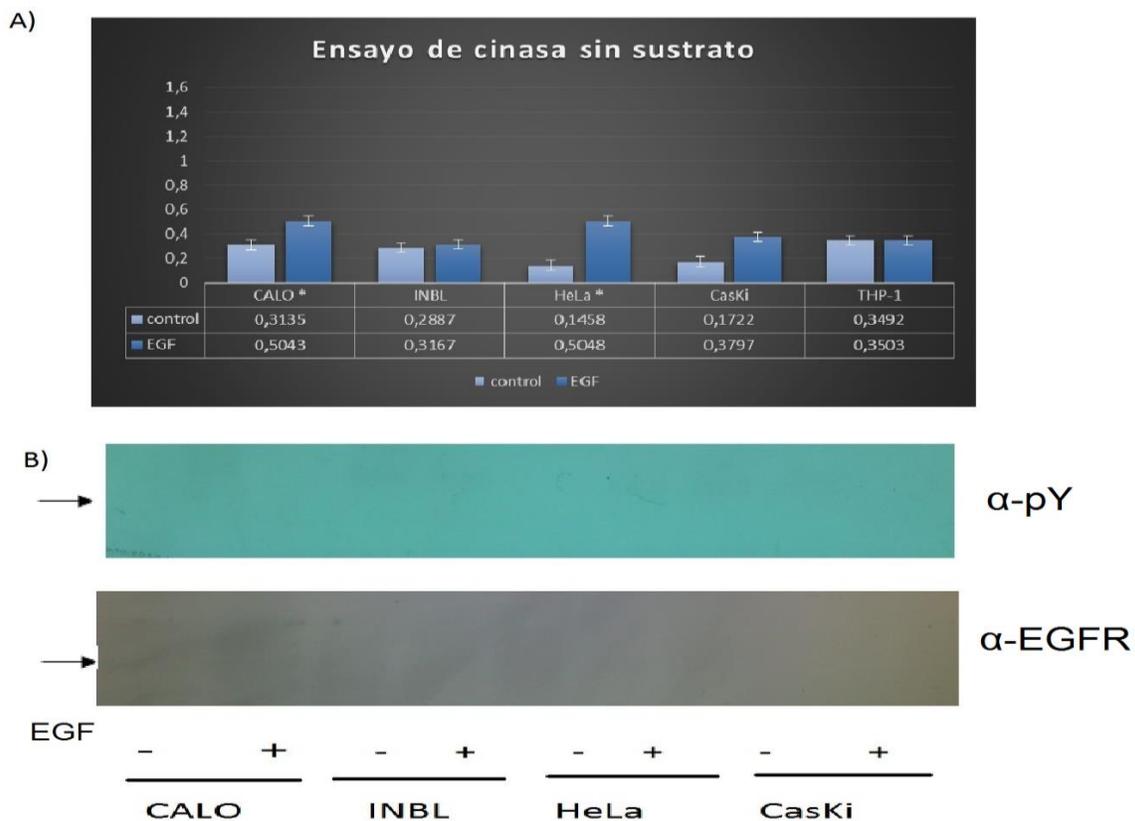


Figura 10 A: Ensayo de cinasa sin sustrato PolyGluTyr. Las líneas celulares CALO, INBL, HELA, CASKI THP-1 fueron estimuladas con 2ng de EGF. Se lisaron con buffer de lisis durante 30 minutos el lisado se adiciono a las esferas de agarosa adicionadas con anticuerpo anti- EGFR y se incubaron por 3 horas. Se incubaron y después de varios lavados con buffer de lisis, PBS frio y Tris. Posteriormente se realizó el cinasa in vitro y después de 30 minutos de reacción se leyeron las muestras en un fluorometro a una excitación de 540nm y una emisión de 590nm.

B: Autofosforilacion de HER1 en las líneas celulares CALO, INBL, HELA, CASKI Y THP-1 las cuales se utilizaron después del ensayo de cinasa in vitro. Las líneas celulares fueron estimuladas con EGF durante 5 10 y15 minutos. Las células se lisaron y se separaron en un gel SDS, después se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Los revelados se hicieron con anticuerpo primario Anti-py99 y Anti-py20 y el Anti mouse y el revelado se realizó mediante quimioluminiscencia. Después se hizo una elución acida y se revelo contra los anticuerpos Anti-EGFR y se detectaron las proteínas mediante quimioluminiscencia.



11. DISCUSIÓN

Los miembros de la familia EGFR son conocidos por desencadenar varias señales río abajo cuando se unen a un ligando y se dimerizan. Estas señales al desregularse pueden llevar a la formación de tumores sólidos **(17)**. Se sabe que los miembros de esta familia al formar heterodímeros dan una señal más fuerte y constante **(45,46)**. El miembro que forma los dímeros más fuertes y con señalización más prolongada es HER2. Los dímeros formados con HER1/HER2 y HER2/HER3, han sido reportados por nuestro grupo de trabajo **(113,119)**. HER 2 se sobre expresa en varios tipos de tumores sólidos, es más común en cáncer de mama, aunque también ha sido encontrado en otros tipos de cáncer **(124)**. Por lo que buscar la asociación de este receptor con otros receptores de la misma familia en tumores epiteliales, como el carcinoma de cérvix, ayudaría a encontrar una manera de contrarrestar la proliferación descontrolada con el entendimiento de las vías de señalización activadas por HER1.

Nuestro grupo de trabajo se ha dado a la tarea de investigar la actividad de HER 2 y ha encontrado que está presente y desencadena diversas vías de señalización. Al estar presente HER 2, analizamos su interacción con los otros miembros de la familia ErbB, ya que éste no tiene ligando conocido y necesita la unión a otro receptor para generar una señal. Por lo que también se estableció la relación de este receptor con EGFR y se demostró que pueden interactuar entre ellos para formar dímeros. Al parecer forman un heterodímero que puede iniciar una señal



amplificada y podría participar en el desarrollo de las células de carcinoma de cérvix **(113)**.

Al analizar por separado a los receptores, encontramos que el EGFR/HER1 está presente pero no está fosforilado en las células de cáncer de cérvix, por lo que decidimos analizar si la proteína carecía de actividad catalítica de cinasa de tirosina.

En el presente trabajo reportamos que el EGFR presente en las líneas celulares CALO e INBL está activo en condiciones *in vitro*, y además éste presenta una actividad basal de autofosforilación demostrada en los ensayos de cinasa *in vitro* en los cuales no se utilizó el Poli-Glu-Tyr como sustrato. De esta manera, comprobamos que el receptor presente en las líneas celulares de cáncer de cérvix tiene actividad catalítica.

Debido a que el receptor tiene actividad catalítica *in vitro* pero no está fosforilado cuando se realiza un inmunoblot con proteínas de lisado celular, esto nos lleva a pensar que el EGFR presente en las líneas celulares CALO e INBL puede estar regulado de manera negativa por alguna molécula presente en el citoplasma.

En los ensayos de cinasa *in vitro* se llevó a cabo una inmunoprecipitación del receptor EGFR, utilizando anticuerpos específicos, y probablemente con los lavados intensos se podría estar removiendo la proteína que interactúa con el receptor para inhibir la actividad catalítica de cinasa.



Existen reportes de varias moléculas que pueden inhibir la actividad de EGFR mutado en el dominio catalítico de cinasa **(120)**, las cuales se unen al sitio catalítico para disminuir la actividad del receptor e inducir endocitosis por vía de las clatrin. Este es el mecanismo más común de inactivación de este receptor.

(120)

A partir de 2001 se descubrió una nueva familia de proteínas que regulan la actividad de la familia de EGFR de manera negativa conocidas como MIG6/RALT (del inglés mitogen gen-inducible/receptor-associated late transducer, gen 33). MIG6/RALT inhibe la autofosforilación de EGFR. La unión de MIG6-EGFR obstruye físicamente la formación del dímero asimétrico EGFR y suprime la actividad de HER1/HER2 mediante la estabilización de una conformación inactiva del receptor **(120,121, 122)**. La inhibición está mediada por la parte C-terminal de MIG6, la cual se une al dominio citoplasmático de EGFR mediante un péptido de 25 residuos que se une al receptor **(123-126)**. Por sí solo, este segmento es capaz de inhibir la formación de un dímero asimétrico. La valina en el lóbulo C, participa en la unión de MIG6 y el dominio catalítico **(124)**. También se ha demostrado la inhibición de la autofosforilación de EGFR mediada por la unión al ligando EGF, mediante la co-expresión del péptido nombrado MIG6 región 1. Este es un fragmento que produjo Zhan *et al.*, y el cual presentaba por sí solo, características de inhibición, pero no lo suficientemente fuertes como para inhibir cualquier cinasa mutada sobre-expresada, **(125)** por lo que al preparar segmentos más largos del mismo, pudieron inhibir incluso, mutantes altamente activos **(125)**. Una característica interesante de MIG6, es que se une con mayor afinidad al



EGFR activado que al receptor que no tenga ligando (**122, 124, 127**). Esto sugiere que MIG6 podría estar presente en el citoplasma e inhibir la autofosforilación del EGFR en las líneas celulares de cáncer de cérvix CALO e INBL. Esto explicaría que se detecte la presencia de la proteína, pero no se detecta la fosforilación de la misma, aunque si tiene actividad catalítica *in vitro*, como se demuestra en este trabajo. Si el MIG6 está presente e inhibe el dímero HER1/HER 2 podría indicar que estas líneas celulares tienen otro dímero o heterodímero funcional, como se demostró en el trabajo de Zerecero Carreón, en el cual se reporta la presencia de dímeros funcionales de HER2/ HER3 mediante microscopía confocal (**119**).

Esto se ve apoyado por el hecho que el EGFR presente en la línea celular HeLa si está fosforilado en tirosina. Además, el EGFR tiene mayor actividad catalítica que el EGFR de las otras líneas celulares en condiciones *in vitro*.

Esto puede deberse a que la línea celular HeLa tiene características diferentes y probablemente no se encuentra presente o no está activa la molécula inhibidora MIG6. Por tanto, puede interactuar río abajo con alguna proteína que supla la actividad del receptor, desencadenando cascadas de señalización de proliferación. Por lo que analizar la regulación de los receptores de la familia ErbB sería importante debido a la participación que éstas tienen en el desarrollo de diferentes tipos de cáncer.

Nuestro grupo de trabajo ha reportado que las líneas celulares CALO e INBL son muy diferentes, ya que presentan mutaciones en los exones 19 y 21 del dominio catalítico de cinasa (**128**), tanto en HER1 como HER2 así como la actividad



catalítica de cinasa mostrada en el presente trabajo. Esto se debe, en gran medida, al grado de transformación de las células, ya que provienen de diferentes estadios tumorales (**113**), por lo que es importante analizar las diferencias en las vías de señalización activadas por los receptores de la familia ErbB para entender la participación de cada uno de ellos en el desarrollo del cáncer de cérvix.



12. CONCLUSIONES

- El EGFR presente en las líneas de carcinoma de cérvix CALO e INBL presenta actividad catalítica.
- El EGFR tiene actividad de cinasa de tirosina, ya que presenta autofosforilación.
- La actividad catalítica del EGFR presente en las líneas celulares CALO y HeLa es mayor que la del EGFR presente en la línea INBL.
- El EGFR no presenta alteraciones en el dominio catalítico de cinasa de tirosina.



13. PERSPECTIVAS

1. Buscar mutaciones en los dominios intracelular y el dominio de unión al ligando.
2. Buscar mutaciones comunes en el receptor como el exón 19 y 21.
3. Buscar miembros inhibidores de la familia RALT/MIG6 que estén unidos al dominio intracelular del receptor.
4. Identificar miembros de la familia RALT/MIG6.



14. APÉNDICE

1) Verseno1L (pH 7.7):

- 0.2 gr de EDTA
- 3.04 gr
- Tris 8 gr NaCl
- .4 gr KCl

2) Buffer de lisis, volumen 50 mL con un inicial de 20 mL de agua:

- Tritón 500 μ L
- PMSF 500 μ L (0.1M)
- Ortovanadato de sodio (.1M) 50 μ L
- EDTA (.5M) 100 μ L
- Cloruro de sodio (5M) 1.5 mL
- Fluoruro de sodio (.5M) 3 mL
- Pirofosfato de sodio (1M) 1 mL
- Tris (1M) pH 7.5 500 μ L

3) Buffer de elución 500 ml:

- SDS 2.5 gr
- Glicina 3.75 gr

4) Buffer de corrida 5X 500 mL:

- SDS 5 gr



- Glicina 72 gr
- Tris 15 gr

5) PBS 1L pH (7.2- 7.4)

- NaCl 8 gr
- KCl 0.2 gr
- Na₂HPO₃ 0.4 gr
- KH₂PO₃ 2.88 gr

6) TBS y TBS TWEEN 1 L

- Tris 1M (pH7.5) 20 mL
- NaCl 5M 30 mL ajustar a 1L

7) TBS TWEEN 500 mL de TBS + 50 µL de TWEEN

8) Buffer de Laemli 10 ml

- Tris 1 molar pH 6.8 3.125 mL
- SDS 1 gr
- Azul de bromofenol 0.005 gr
- Glicerol 5 mL

9) Buffer de transferencia

- Tris 3.02 gr
- Glicina 14.4 gr



- SDS .5 gr
- Ajustar a 700mL, ajustar pH a 8.3completar a 800mL y adicionar 200mL de etanol

10) RPMI 1 L pH (6.9-7.0)

- RPMI 1640 10.34 gr
- 3.74 gr de bicarbonato de sodio suplementado con antibióticos (penicilina, estreptomicina y anfotericina B)

11) Gel separador

- 3.3mL de acrilamida
- 1.25mL de Tris 8.8
- 100 μ L de SDS 10%
- 500 μ L de persulfato de amonio 15%
- 4.8 mL de agua destilada
- 15 μ L de TEMED

12) Gel concentrador

- .625 mL de acrilamida
- 1.25mL de Tris pH 6.8
- 50 μ L de SDS 10%
- 250 μ L de persulfato de amonio 15%
- 2.8 mL de agua destilada



- 7.5 μ L de TEMED



15. REFERENCIAS

- 1) Akulapalli, S. History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. Journal of C Sci & The (2009), 1(2), 1-4.
- 2) Informe mundial sobre el cáncer 2014, IARC
- 3) Instituto Nacional del Cáncer (2011e). ¿Qué es el cáncer? Revisado el 10 de enero de 2012, de: <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/que-es>.
- 4) Organización Mundial de la Salud, Perfiles oncológicos de los países, 2014.
- 5) <http://www.who.int/reproductivehealth/publications/cancers/cervical-cancer-guide/en/>
- 6) Siegel R, Jiemin Ma, Zou Zhaochui. et al. Cancer statistics. 2014CA Cancer J Clin; 64:9-29.
- 7) LazcanoPonce E, Palacio-Mejia LS, Allen Leigh B, et al. Decreasing cervical cancer mortality in Mexico: effect of papanicolaou coverage, birthrate, and the importance of diagnostic validity of cytology. 2008. Cancer. Epidemiol Biomarkers Prev; 17 (10):2808-2817.
- 8) Torres Poveda K.J. A, Cruz Valdez A. B, y Madrid Marina V., epidemiología del cáncer cervicouterino, GAMO, sociedad mexicana de oncología, Elsevier, 2014, 10-20
- 9) López Saavedra, Lizano Soberón M, Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina, Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, subdirección de investigación básica, Cancerología 1 UNAM – INCan, 2006, 31-55.
- 10) Rincón L. O., Pareja L. R., Jaramillo S., Virus del papiloma humano respuesta inmune y cáncer cervical; una relación compleja, revista colombiana de obstetricia y ginecología, 2007, 203-206.
- 11) Haedicke J., Iftner T., Human papillomaviruses and cancer, Medical Virology, Division of Experimental Virology, University Hospital Tübingen, Germany, Elsevier, 2013, 108(3):397-402.
- 12) JAN m. m. Walboomers, Marcel V. Jacobs, M. M. Manos, Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide, Journal of pathology, 1999, 189(1):12-19.
- 13) Malik H., H. Khan F., Ahsan H., Human papillomavirus: current status and issues of vaccination, Department of Biochemistry, Arch Virol Faculty of Dentistry, New Delhi, India, 2013.
- 14) <http://carcinomacervico-uterino.wikispaces.com/HN>



- 15)Alonso A, Sasin J, Bottini N, Friedberg I, Friedberg I, Osterman A, et al. Proteintyrosine phosphatases in the human genome. *Cell* 2004;117:699–711
- 16)Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The proteinkinase complement of the human genome. *Science* 2002; 298:1912–1934.
- 17)Roskoski R. jr, The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer, Blue Ridge Institute for Medical Research, pharmacological research, Elsevier, 2014; 79:34-74.
- 18)Cohen S, The epidermal growth factor (EGF). *Cancer* 1983; 51:1787–1791.
- 19)Wain HM, Bruford EA, Lovering RC, Lush MJ, Wright MW, Povey S. Guidelines for human gene nomenclature. *Genomics* 2002; 79:464–470.
- 20)Maltais LJ, Blake JA, Chu T, Lutz CM, Eppig JT, Jackson I. Rules and guide lines for mouse gene, allele, and mutation nomenclature: a condensed version. *Genomics* 2002; 79:471–474
- 21)Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev* 2004; 4:361-370.
- 22)Jorissen RN, Walker F, Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signaling, *Experimental Cell Research*, 2003, 10; 284(1):31-53.
- 23)Zandi R, Bjerregaard Larsen A, Mechanisms for oncogenic activation of the epidermal growth factor receptor, *Cellular Signalling*, Elsevier, 2007,19(10) 2013-2023.
- 24)Zerecero Carreón O, Valle Mendiola A, Weiss Steider B, Soto-Cruz I, El receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y su relación con el cáncer, *Vertientes Revista Especializada en Ciencias de la Salud*, 2012, 15(1):15-25.
- 25)Ullrich A, Coussens L, Hayflick JS, Dull TJ, Gray A, Tam AW, Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature*, 1984, 309:418–425.
- 26)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.
- 27)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: 30-65.
- 28) Burgess A, EGFR family: Structure physiology signaling and therapeutics targets, *Growth Factors*, 2008; 26(5): 263 – 274.
- 29) 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.
- 30) Roskoski R, The ErbB/HER2 receptor protein-tyrosine kinases and cancer. *BBRC* 2004; 319:1-11.
- 31) Elenius K, Corfas G, Paul S, Choi CJ, Rio C, Plowman GD, et al. A novel juxtamembrane domain isoform of HER4/ErbB4. Isoform-specific tissue distribution and differential processing in response to phorbol ester. *J Biol Chem* 1997; 272:26761–26768.
- 32) 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.
- 33) Ghosh R, Narasanna A, Wang SE, Liu S, Chakrabarty A, Balko JM, et al. Trastuzumab has preferential activity against breast cancers driven by ERBB2 homodimers. *Cancer Res* 2011; 71:1871–1882.
- 34) Tzahar E, Waterman H, Chen X, Levkowitz G, Karunagaran D, Lavi S, Ahierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol Cell Biol* 1996; 16:5276–5287.
- 35) Graus Porta D, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J* 1997; 16:1647–1655.
- 36) Pinkas Kramarski R, Soussan L, Waterman H, Levkowitz G, Alroy I, Klapper L, Diversification of Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions. *EMBO J* 1996; 15:245267
- 37) Gullick WJ. The Type 1 growth factor receptors and their ligands considered as a complex system. *Endocr Relat Cancer* 2001; 8:75–82.
- 38) Blobel CP. ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6:32–43.
- 39) Schlessinger J. Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell* 2002; 110:669–672.



- 40) Ogiso H, Ishitani R, Nureki O, Fukai S, Yamanaka M, Kim JH, et al. Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell* 2002; 110:775–877.
- 41) Garrett TP, McKern NM, Lou M, Elleman TC, Adams TE, Lovrecz GO, et al. Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor. *Cell* 2002; 110:763–773.
- 42) Garrett TP, McKern NM, Lou M, Elleman TC, Adams TE, Lovrecz GO, The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors. *Mol Cell* 2003; 11:495–505
- 43) Ferguson KM, Berger MB, Mendrola JM, Cho HS, Leahy DJ, Lemmon MA. EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. *Mol Cell* 2003; 11:507–511
- 44) Burgess AW, Cho HS, Eigenbrot C, Ferguson KM, Garrett TP, Leahy DJ, et al. An open-and-shut case recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell* 2003; 12:541–552.
- 45) Lu HS, Chai JJ, Li M, Huang BR, He CH, Bi RC. Crystal structure of human epidermal growth factor and its dimerization. *J Biol Chem* 2001; 276:34913–34917
- 46) Domagala T, Konstantopoulos N, Smyth F, Jorissen RN, Fabri L, Geleick D, et al. Stoichiometry, kinetic and binding analysis of the interaction between epidermal growth factor (EGF) and the extracellular domain of the EGF receptor. *Growth Factors* 2000; 18:11–29.
- 47) Cho HS, Mason K, Ramyar KX, Stanley AM, Gabelli SB, Denney Jr DW, et al. Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature* 2003; 421:756–760.
- 48) Cho HS, Leahy DJ. Structure of the extracellular region of HER3 reveals an interdomain tether. *Science* 2002; 297:1330–1333.
- 49) Macdonald-Obermann JL, Adak S, Landgraf R, Piwnica-Worms D, Pike LJ. Dynamic analysis of the epidermal growth factor (EGF) receptor-ErbB2-ErbB3 protein network by luciferase fragment complementation imaging. *J Biol Chem* 2013; 288:30773–30784.
- 50) 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



- 51) Bryan T. Hennessy, Debra L. Smith, Prahlad T. Ram, Yiling Lu and Gordon B. Mills. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug. *Nature Drug Discover* 2005; 4: 988-1004.
- 52) Blume P, Hunter T. Oncogenic kinase signaling. *Nature* 2001; 411:355-3653
- 53) Yarden Y, Schlessinger. Self-phosphorylation of epidermal growth factor receptor: evidence for a model of intermolecular allosteric activation. *Biochemistry* 1987; 26:1437-1444.
- 54) 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. *Breast Cancer Res* 2000; 2:184-190
- 55) 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.
- 56) Cho HS, Mason K, Ramyar KX, Stanley AM, Gabelli SB, Denney Jr DW, Leahy DJ. Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature* 2003; 421:756-760.
- 57) Castiglioni 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.
- 58) 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.
- 59) Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signaling network. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2001; 2:127-137.
- 60) Yarden Y, Pines G. The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology. *Nat Rev Cancer* 2012; 12:553-63.
- 61) Seshacharyulu P, Ponnusamy MP, Haridas D, Jain M, Ganti AK, Batra SK. Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy. 2012. *Expert Opin Ther Targets*; 16:15-31.
- 62) Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2003; 103:211-225.
- 63) Karunagaran D, Azahar E, Beerli D, Chen X, Grass-Porta D, Ratzin B, Seger, Hynes E, Yarden. ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications in breast cancer. *EMBO J* 1996; 15(2):254-264.



- 64)Downward J, Yarden Y, Mayes E, Scrace G, Totty N, Stockwell P, et al. Close similarity of epidermal growth factor receptor and verb-B oncogene protein sequences. *Nature* 1984; 307: 521–527.
- 65)Herbst RS, Shin DM. Monoclonal antibodies to target epidermal growth factor receptor-positive tumors: A new paradigm for cancer therapy. *Cancer* 2002; 94:1593–1611.
- 66)Mendelsohn, J. The epidermal growth factor receptor as a target for cancer therapy. *Endocr Rel Cancer* 2001; 8:3–9.
- 67)Nicholson RI, Gee JM, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer* 2001; 37(Suppl. 4):S9–S15.
- 68)Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. 1995. *Crit Rev Oncol Hematol*; 19:183–232.
- 69)K. Shtiegman, Y. Yarden, Semin. The role of ubiquitylation in signaling by growth factors: implications to cancer. 2003 *Cancer Biol.* 13: 29-33.
- 70)Lipkowitz S., The role of the ubiquitination–proteasome pathway in breast cancer: Ubiquitin mediated degradation of growth factor receptors in the pathogenesis and treatment of cancer. *Breast Cancer Res.* 5 (2003) 8-10.
- 71)Wells A., Welsh J.B., C.S. Lazar, H.S. Wiley, G.N. Gill, M.G. Rosenfeld, Ligand-induced transformation by a noninternalizing epidermal growth factor receptor. *Science* 247 (1990) 962-963.
- 72)Joazeiro C.A., Wing S.S., Huang H., Levenson J.D., Hunter T., Y.C. Liu, The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase. 1999. *Science* 286 309-310.
- 73). Levkowitz G, Waterman H, Zamir E, Kam Z, Oved S, Langdon WY, Beguinot L, Geiger B, Yarden Yc-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor. *Genes Dev* 12(23): 3663-3674
- 74)Levkowitz G., Waterman H., Ettenberg S.A., M. Katz, Tsygankov A.Y., Alroy I., S. Lavi, K. Iwai, Y. Reiss, A. Ciechanover, S. Lipkowitz, Y. Yarden, Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1. 1999. *Mol. Cell* 4 1029-1040.
- 75)Haglund K., Sigismund S, Polo S., Szymkiewicz I., Di Fiore P.P., Dikic I., Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. 2003. *Nat. Cell Biol.* 5 (5) 461-466.



- 76) Mosesson Y., Shtiegman K., Katz M., Zwang Y., Vereb G., Szollosi J., Yarden Y., Endocytosis of receptor tyrosine kinases is driven by monoubiquitylation, not polyubiquitylation. 2003. *J. Biol. Chem.* 278 (24) 21323-21124.
- 77) Waterman H., Katz M., Rubin C., Shtiegman K., Lavi S., Elson A., Jovin T., Yarden Y., A mutant EGF-receptor defective in ubiquitination and endocytosis unveils a role for Grb2 in negative signaling. 2002. *EMBO J.* 21 (3) 303-313.
- 78) Peschard P., Park M., Escape from Cbl-mediated downregulation: a recurrent theme for oncogenic deregulation of receptor tyrosine kinases. 2003. *Cancer Cell* 3 (6) 519-522.
- 79) Thien C.B., Langdon W.Y., Oncogene EGF receptor binding and transformation by v-cbl is ablated by the introduction of a loss-of-function mutation from the *Caenorhabditis elegans* sli-1 gene. 1997. *14* (18) 2239-2241.
- 80) Ennis B.W., Lippman ME, Dickson RB. The EGF receptor system as a target for antitumor therapy. *Cancer Invest* 1991; 9:553–562.
- 81) Mendelsohn J, Baselga J. Epidermal growth factor receptor targeting in cancer. *Semin. Oncol* 2006; 33:369–385.
- 82) Ford AC, Grandis JR. Targeting epidermal growth factor receptor in head and neck cancer. *Head Neck* 2003; 25:67–73.
- 83) Scaltriti M, Baselga J. The epidermal growth factor receptor pathway: A model for targeted therapy. *Clin Cancer Res* 2006; 12:5268–5272.
- 84) Harris RC, Chung E, Coffey RJ. EGF receptor ligands. *Exp. Cell Res* 2003; 284:2–13.
- 85) Luttrell LM, Daaka Y, Lefkowitz RJ. Regulation of tyrosine kinase cascades by G-protein-coupled receptors. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11:177–183.
- 86) Prenzel N, Zwick e, Daub H, Leserer M, Abraham R, Wallasch C, Ullrich A. EGF receptor transactivation by G-protein coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of pro HB-EGF. *Nature*, 1999; 402:884–888.
- 87) Borrell Pages M, Rojo F, Albanell J, Baselga J, Arribas J. TACE is required for the activation of the EGFR by TGF-alpha in tumors. *EMBO J* 2003; 22:1114–1124.
- 88) Scher HI, Sarkis A, Reuter V, Cohen D, Netto G, Petrylak D, et al. Changing pattern of expression of the epidermal growth factor receptor and transforming growth factor a in the progression of prostatic neoplasms. *Clin Cancer Res* 1995; 1:545–550.



- 89) Daaka Y, G proteins in cancer: The prostate cancer paradigm. *Sci STKE* 2004; (216):re2.
- 90) Razandi M, Pedram A, Park ST, Levin ER., Proximal events in signaling by plasma membrane estrogen receptors. *J Biol Chem* 2003; 278:2701–2712.
- 91) Shou J, Massarweh S, Osborne CK, Wakeling AE, Ali S, Weiss H, et al. Mechanisms of tamoxifen resistance: Increased estrogen receptor- HER2/neu cross-talk in ER/HER2- positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96:926–935.
- 92) Ohgaki H. Genetic pathways to glioblastoma. *Neuropathology* 2005; 25:17.
- 93) Ekstrand AJ, Sugawa N, James CD, Collins VP. (1992). Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- and/or C-terminal tails. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:4309–4313.
- 94) Rubin Grandis J, Melhem MF, Gooding WE, Da R, Holst VA, Wagener MM, et al. Levels of TGF- α and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90:824–832.
- 95) Nicholson RI, Gee JM, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer* 2001; 37(Suppl. 4):S9–S15.
- 96) Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan B W, 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.
- 97) Paez JG, Janne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, et al. EGFR mutations in lung cancer: Correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004; 304:1497–1500.
- 98) Blencke S, Ullrich A, Daub H. Mutation of threonine 766 in the epidermal growth factor receptor reveals a hotspot for resistance formation against selective tyrosine kinase inhibitors. *J Biol Chem* 2003; 278:15435–15440.
- 99) Tang X, Shigematsu H, Bekele BN, Roth JA, Minna JD, Hong WK, et al. EGFR tyrosine kinase domain mutations are detected in histologically normal respiratory epithelium in lung cancer patients. *Cancer Res* 2005; 65:7568–7572.
- 100) Ocharoenrat P, Rhys-Evans P, Modjtahedi H, Eccles SA. Vascular endothelial growth factor family members are differentially



- regulated by c-erbB signaling in head and neck squamous carcinoma cells. *Clin Exp Metastasis* 2000; 18:155–161.
- 101) Ravindranath N, Wion D, Brachet P, Djakiew D. Epidermal growth factor modulates the expression of vascular endothelial growth factor in the human prostate. *J Androl* 2001; 22:432–443.
- 102) Gibson EM, Henson ES, Haney N, Villanueva J, Gibson SB. Epidermal growth factor protects epithelial-derived cells from tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand induced apoptosis by inhibiting cytochrome c release. *Cancer Res* 2002; 62:488–496.
- 103) Gibson S, Tu S, Oyer R, Anderson SM, Johnson GL. Epidermal growth factor protects epithelial cells against Fas-induced apoptosis. Requirement for Akt activation. *J Biol Chem* 1999; 274:17418-17612.
- 104) Liu Z, Li H, Derouet M, Filmus J, Lacasse EC, Korneluk RG, et al. Ras Oncogene triggers up-regulation of cIAP2 and XIAP in intestinal epithelial cells: Epidermal growth factor receptor dependent and independent mechanisms of ras-induced transformation. *J Biol Chem* 2005; 280:37383–37392.
- 105) Benoit V, Chariot A, Delacroix L, Deregowski V, Jacobs N, Merville MP, Bours V. Caspase-8-dependent HER-2 cleavage in response to tumor necrosis factor alpha stimulation is counteracted by nuclear factor kappa B through c-FLIP-L expression. *Cancer Res* 2004; 64:2684-2691.
- 106) Liu X, Yue P, Khuri FR, Sun SY. p53 upregulates death receptor 4 expression through an intronic p53 binding site. *Cancer Res* 2004; 64:5078–5083.
- 107) Henson, E. S., & Gibson, S. B. Surviving cell death through epidermal growth factor (EGF) signal transduction pathways: Implications for cancer therapy. *Cell Signal* 2006; 18:2089–2097.
- 108) Henson ES, Gibson EM, Villanueva J, Bristow NA, Haney N, Gibson SB. Increased expression of Mcl-1 is responsible for the blockage of TRAIL-induced apoptosis mediated by EGF/ErbB1 signaling pathway. *J Cell Biochem* 2003; 89:1177–1192.
- 109) Sansal I., Sellers WR., The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway. *J Clin Oncol* 2004; 22(14), 2954–2963.
- 110) Amit Vazina CM, Shishodia S, Harris D, Van Q, Wang M, Weber D, et al. Atiprimod blocks STAT3 phosphorylation and induces apoptosis in multiple myeloma cells. *Br J Cancer* 2005; 93:70–80.



- 111) Brabek J, Hanks SK. Assaying protein kinase activity. *Methods Mol Biol.*2004; 284:79–90.
- 112) Soto Cruz I., Santiago Pérez A.R, Moreno Morales X., Caceres Cortes J. R., Implication of tyrosine kinase receptors c-Kit and HER 2 in cell growth of cervical carcinoma2003,, *Res. Adv. In cancer,GRN*, 3, 1-13.
- 113) Soto Cruz I., Rangel Corona R., Valle Mendiola A., Moreno Morales X., Santiago Perez R., Weiss Steider B., Caceres Cortes J. R., The Tyrphostin B42 Inhibits Cell Proliferation and HER-2 Autophosphorylation in Cervical Carcinoma Cell Lines, 2007, *Preclinical Therapeutics, Cancer Investigation*,1-9.
- 114) Caceres Cortes JR., Alvarado Moreno J.A., Kazuo Waga, Rangel Corona R., Monroy Garcia Al., Rocha Zavaleta L., Urdiales Ramos J., Weiss Steider B., Implication of Tyrosine Kinase Receptor and Steel Factor in Cell Density-dependent Growth in Cervical Cancers and Leukemias, *AACR, Cancer Research*, 2001,61, 6281-6289.
- 115) <http://www.atcc.org/>
- 116) Philip A. Cole, Burnn P, Takacsll B., Walsh C. T., Evaluation of the Catalytic Mechanism of Recombinant Human Csk (C-Terminal Src Kinase) Using Nucleotide Analogs and Viscosity Effect, *the J of Biol Chem*, 1995, 270:22105–22108.
- 117) Williams D.M., Wang D., Cole P. A., Chemical Rescue of a Mutant Protein-tyrosine Kinase, *the journal of biological chemistry*, 2000, 275, 38127-38130.
- 118) Beebe J. A., Gregory J. Wiepz, Guadarrama A. G., Bertics P. J., Burke T.J., A Carboxyl-terminal Mutation of the Epidermal Growth Factor Receptor Alters Tyrosine Kinase Activity and Substrate Specificity as Measured by a Fluorescence Polarization Assay, *the J of Biol Chem*, 2003, 278, 26810-26816.
- 119) Zerecero Carreon, O. (2014). Análisis de la formación y prescencia de heterodímeros HER2/HER3 y la activación de la vía PI3K/AKT en células de carcinoma de cérvix CALO e INBL. Tesis de Maestría. UNAM.
- 120) Kaia K. Hampton, Rolf J. Craven, Pathways driving the endocytosis of mutant and wild-type EGFR in cancer, *Oncoscience*, 2014, 504-505.
- 121) Xu D, Makkinje A, Kyriakis JM. Gene 33 is an endogenous inhibitor of epidermal growth factor (EGF) receptor signaling and



- mediates dexamethasone-induced suppression of EGF function. *J Biol Chem.* 2005; 280: 2924-2933.
- 122) Hackel PO, Gishizky M and Ullrich A. Mig-6 is a negative regulator of the epidermal growth factor receptor signal. *Biol Chem.* 2001; 382: 1649-1662.
- 123) Xu, Dazhong; Makkinje, Anthony; Kyriakis, John M. Gene 33 Is an Endogenous Inhibitor of Epidermal Growth Factor (EGF) Receptor Signaling and Mediates Dexamethasone-induced Suppression of EGF Function. *J Biol Chem.* 2005; 280 (4):2924–2933.
- 124) Fiorentino L, et al. Inhibition of ErbB-2 mitogenic and transforming activity by RALT, a mitogen-induced signal transducer which binds to the ErbB-2 kinase domain. *Mol Cell Biol.* 2000; 20 (20):7735–7750.
- 125) Xuewu Zhang, Kerry A. Pickin, Ron Bose, Natalia Jura, Philip A. Cole, Kuriyan Inhibition of the EGF Receptor by Binding to an Activating Kinase Domain Interface, *Nature*, 2007.
- 126) Zhang YW, et al. Evidence that MIG-6 is a tumor-suppressor gene. *Oncogene.* 2007; 26 (2):269–276.
- 127) Anastasi S, et al. Feedback inhibition by RALT controls signal output by the ErbB network. *Oncogene.* 2003; 22 (27):4221–4234.
- 128) Zerecero Carreón, O. (2009). Detección de mutaciones en el receptor HER2, en el exón 19 y 21 en líneas de carcinoma de cérvix CALO e INBL. Tesis. UNAM.