

UCH-FC
Biotecnología
C697
C.1



FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

“CARACTERIZACIÓN DE PATRONES DE EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES TIROSINA QUINASA ERBB EN TEJIDO DE CÁNCER GÁSTRICO”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

NORBERTO ANDRÉS COLLAZO MUÑOZ

Dra. María Carmen Molina
Directora de Seminario de Título

Dr. Juan Carlos Aguillón Gutiérrez
Co-Director de Seminario de Título

Dra. María Rosa Bono Merino
Patrocinante Facultad de Ciencias





INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

“Caracterización de patrones de expresión de los receptores tirosina quinasa ERBB en tejido de cáncer gástrico”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

NORBERTO ANDRÉS COLLAZO MUÑOZ

Dra. María Carmen Molina Sampayo
Directora del Seminario

Dr. Juan Carlos Aguillón Gutiérrez
Co- Director

Dra. María Rosa Bono Merino
Profesor Patrocinante

Comisión de Evaluación

Dra. Verónica Palma Alvarado
Presidente Comisión

Dr. Francisco Chávez Espinosa
Evaluador

Firma manuscrita en azul de la Directora del Seminario, Dra. María Carmen Molina Sampayo, sobre una línea horizontal.

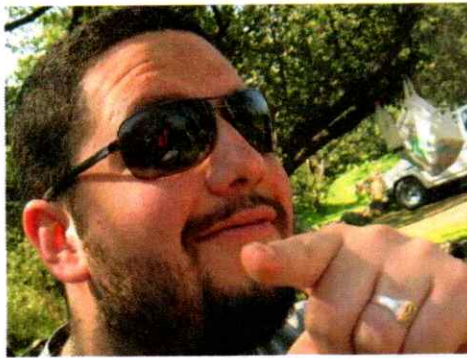
Firma manuscrita en azul del Profesor Patrocinante, Dra. María Rosa Bono Merino, sobre una línea horizontal.



Firma manuscrita en azul de la Presidente de la Comisión, Dra. Verónica Palma Alvarado, sobre una línea horizontal.

Firma manuscrita en azul del Evaluador, Dr. Francisco Chávez Espinosa, sobre una línea horizontal.

Santiago, Diciembre de 2010



Soy Norberto Andrés Collazo Muñoz, nací el 17 de Marzo de 1987 a las 20:01. Primogénito del matrimonio de Norberto Collazo Arias y Verónica Muñoz Quinteros, padres abnegados por sus hijos.

Siempre interesado por aprender, entré un año antes al colegio, lo cual me obligó siempre a ser el menor en todas mis andanzas de niño y joven, esto tuvo sus pro y contras, pero ya forman parte de mi historia. Pasé por muchos colegios, pero el que me marcó y me forjó como persona fue el Instituto La Salle, el cual me entregó herramientas para poder enfrentar la vida, afrontando todos los desafíos que ésta me ha puesto por delante. Además el colegio me entregó principios y valores los que me han hecho ser una persona de bien y querida por mis cercanos. No puedo dejar de lado los valores cristianos entregados por mi querido Instituto y por mi familia, estos han estado y estarán presentes siempre conmigo.

En el colegio encontré los mejores amigos, con los que he contado y contaré por siempre. En la Universidad conocí gente de la cual aprendí mucho, y por esto agradezco haber estudiado en la Universidad de Chile, ya que me entregó herramientas para afrontar todo tipo de circunstancias de la mejor forma, además de aprender cómo lidiar con un sinnúmero de personalidades. Hice muy buenas amistades en la "U", con las que aprendí que estudiar y "carretear" se puede, mientras quieras.

Estudiar Ingeniería en Biotecnología Molecular, me ha hecho ver las cosas desde muchos puntos de vista, me ha hecho conocer gente como la del laboratorio, que después conocerla me arrepentiría no haberla conocido, tanto por lo que aportaron en mi trayectoria de unidad de investigación y tesis. Las relaciones establecidas en el "lab" permitieron que fuese un agrado ir a trabajar en los experimentos transformándose en mi casa más que en el lugar de trabajo.

Finalmente puedo decir que en la vida hay que tener un estilo de vida "sin miedo", "100% ACTITUD" y en todo momento "*keep the faith*"...





*Este Seminario de Título se lo dedico
de todo corazón a mi familia, en especial
a mis padres y hermano, que siempre me
apoyaron y ayudaron en todo incondicionalmente.
De igual manera agradezco el apoyo a todos mis amigos,
los que me escucharon sin entender lo que decía, gracias a todos...*



AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó gracias al inmenso apoyo que recibí en todo momento de mis padres, quienes me han enseñado que siempre se puede más y que nunca hay que rendirse aunque esté todo en contra, GRACIAS.

A mis amigos que siempre estuvieron preguntando, sin entender lo que hacía, por mis "bichos" (células), por los "filetes" (muestras de tejido), etc., pero siempre demostrando preocupación por lo que hacía y ofreciendo ayuda anímica en los momentos en que no sabía nada.

Compañeros de Universidad, como olvidar esas tertulias en nuestro querido campus, esa noches de estudio al 50/50%, gracias por esos bellos momentos que hacían llevadera la exigente malla de nuestra carrera.

A la Dra. María Carmen Molina, Directora de Seminario, quien siempre me brindó su apoyo y guía en el transcurso de este trabajo, muchas gracias.

Al Dr. Juan Carlos Aguillón, Dra. Carolina Ribeiro, D. Roberto Zuñiga, Dr. Pablo Sotelo, Dra. Paula Fluxá, Dr. Diego Catalán por sus aportes en el desarrollo de este Seminario de Título.

A los Dres. Marcos Bustamante y Juan Carlos Justiniano (Hospital Salvador) y Owen Köm, Attila Csendes (Hospital Clínico de la Universidad de Chile), que permitieron la obtención de las muestras de tejido, además a las enfermeras amorosas del Hosp. Salvador: Patricia y Carolina que me facilitaron un montón esta tarea.

A Sra. Inelía Butrón, Sra. Nancy Fabres, Sra. Juana Orellana, Sra. Ruth Mora, Dn. Patricio, Dn. Félix y Dn. Jaime por su apoyo, solidaridad, disponibilidad, compañerismo y ser muchas veces cómplices de algunas travesuras.

Como olvidar y no mencionar a mis amigos de "lab": David "La Monja" Gárate, Rodrigo "La Paloma" Valenzuela, Sergio "Bigote" Mercado, Carolina Hernández, Macarena Garrido, Dr. Antonio Serrano, María Leonora Duasso, Francisca Coddou, Katherine Weinberger, Nicolás Ruiz-Tagle, Paulina García, Karina Kramm, Bárbara Pesce, Ismael Maldonado, GRACIAS POR HABER ESTADO AHÍ =).

A Padre e Hijo, POLLOS FC e Inmunología respectivamente, gracias por hacernos pasar buenos momento en la cancha.

A los Tíos del Santa Inés...

Y a ti Camilita que estás en el cielo... GRACIAS

Índice de Contenidos



AGRADECIMIENTOS.....	iii
Índice de Contenidos	iv
Índice de tablas	vii
Abreviaturas	viii
Resumen	x
Abstract	xi
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 HIPOTESIS	18
3 OBJETIVOS	18
3.1 Objetivo general	18
3.2 Objetivos específicos.....	19
4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
4.1 Reclutamiento de Pacientes	19
4.2 Diseño de partidores.....	20
4.3 Líneas celulares y condiciones de cultivo	21
4.4 Análisis de expresión génica mediante transcripción reversa acoplado a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)	21
4.4.1 Extracción de RNA total.....	21
4.4.2 Reacción de transcripción reversa.....	23
4.4.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	24
4.5 Electroforesis, geles de agarosa.....	24
4.5.1 RNA.....	24
4.5.2 cDNA.....	25
4.6 Western Blot.....	25
4.7 Inmunohistoquímica.....	27
4.8 Análisis estadístico	28
5 RESULTADOS	30
5.1 Diseño de partidores específicos para erbB1, 2, 3 y 4	30
5.2 Perfiles de expresión específico para erbB a partir de líneas celulares.....	33
5.2.1 Estandarización del uso de los partidores erbB	34



5.2.2	Perfiles de expresión de los receptores erbB en células de melanoma maligno, cáncer de próstata y cáncer gástrico	36
5.3	Perfiles de expresión (RT-PCR) específico para erbB a partir de mucosa gástrica de pacientes con cáncer gástrico.....	37
5.4	Expresión proteica de erbB2 a partir de extractos proteicos de mucosa gástrica de pacientes con cáncer gástrico.....	42
6	DISCUSIÓN.....	46
7	CONCLUSIONES.....	52
8	REFERENCIAS	53



Índice de figuras

Figura 1. Gráfica de las causas de muerte registradas en Chile en el año 2007..	1
Figura 2. Gráfica de las muertes por tumores malignos en Chile en el año 2007.....	2
Figura 3. Morfología y activación de los Receptores erbB.....	9
Figura 4. Alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas de los receptores erbB1, erbB2, erbB3 y erbB4.....	30
Figura 5. Anclaje de extremo 3' de los partidores.....	31
Figura 6. Análisis de polimorfismos en las secuencias nucleotídicas de los receptores erbB.....	32
Figura 7. Electroforesis en geles de agarosa de RNA total de distintas líneas celulares	33
Figura 8. Ensayo de reacciones cruzadas para los partidores erbB en células HEK ₂₉₃	35
Figura 9. Perfiles de expresión de erbB1-4 en distintas líneas celulares	36
Figura 10. Obtención de muestras de mucosa gástrica y extracción de RNA total	37
Figura 11. PCR semi cuantitativo para erbB2 y 3, normalizado con β -actina	38
Figura 12. PCR semi cuantitativo para erbB2 y 3 a partir de tejido gástrico	39
Figura 13. Perfil de expresión representativo para erbB1, 2, 3 y 4 a partir de muestras de tejido gástrico de pacientes con cáncer gástrico	40
Figura 14. Perfil de expresión de los receptores erbB en 10 pacientes con cáncer gástrico	41
Figura 15. Expresión de los receptores erbB en mucosa gástrica de pacientes sometidos a operaciones bariátricas.....	42



Figura 16. Gel representativo de la expresión del receptor erbB2 y β -actina en muestras de tejido gástrico y HEK₂₉₃ 43

Figura 17. Perfil de expresión de mRNA y proteico para el receptor erbB2 en muestra de tejido gástrico a partir de pacientes con cáncer gástrico 44

Figura 18. Expresión de la proteína erbB2 evaluada por inmunohistoquímica en tejido tumoral y normal de pacientes con cáncer gástrico.. 45

Índice de tablas

Tabla I. Identidad comparativa entre las secuencias nucleotídicas de los receptores erbB..... 31

Abreviaturas

ABC	: Complejo Avidina Biotina
AcMo	: Anticuerpo Monoclonal
AcPo	: Anticuerpo Policlonal
Akt	: Proteína quinasa serina/treonina específica
ADAM	: Dominio desintegrina y metaloproteinasa
AGS	: Línea celular humana epitelial de adenocarcinoma gástrico
APS	: Persulfato de Amonio
AR	: Amfiregulina
ATP	: Adenosín Trifosfato
BL	: Línea celular humana de melanoma maligno
bp	: Pares de bases
BSA	: Albúmina de suero bovino
BTC	: Betacelulina
cDNA	: DNA codificante
CO ₂	: Dióxido de carbono
DAB	: 3,3'-diaminobenzidina tetraclorhidrato
DEPC	: Dietilpirocarbonato
DF	: Línea celular humana de melanoma maligno
DMEM-F12	: <i>Dubelcco's Modified Eagle Medium-F12</i>
DNA	: Ácido Desoxirribonucleico
dNTPs	: Desoxinucleótido
EDTA	: Ácido etilendiaminotetraacético
EGF	: Factor de crecimiento epidermal
EGFR	: Receptor del factor de crecimiento epidermal
EPI	: Epiregulina
FISH	: Hibridación fluorescente <i>in situ</i>
FMS	: Línea celular humana de melanoma maligno
g	: Fuerza g
HBEGF	: EGF de unión a heparina
HEK 293	: Línea celular embrionica de riñón humano
HRP	: Peroxidasa de rábano picante
IHC	: Inmunohistoquímica
kDa	: Kilo Dalton
MAPK	: Proteína quinasa activadas por mitógenos
MNK45	: Línea celular epitelial de adenocarcinoma gástrico
MOPS	: Ácido 3-N-mofolino-propanosulfónico
mRNA	: RNA mensajero
NADPH	: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NGF	: Factor de crecimiento neuronal
nm	: Nanómetro
NRGs	: Neuroregulinas

NSCLC	: Cáncer no microcítico de células del pulmón
OCM1	: Línea celular humana de melanoma maligno
PAMPS	: Patrones moleculares asociados a patógenos
PAGE	: Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	: Pares de Bases
PBS	: Tampón fosfato salino
PC3	: Línea celular humana de cáncer de próstata
PCR	: Reacción en cadena de la polimerasa
PI3-Akt	: Vía fosfoinositol 3 quinasa-Akt
PM	: Peso Molecular
qRT-PCR	: Reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa retrotranscrita
RNA	: Ácido Ribonucleico
RIPA	: Tampón de
rpm	: Revoluciones por minuto
RPMI 1640	: <i>Roswell Park Memorial Institute 1640</i>
rRNA	: RNA ribosomal
RT-PCR	: Reacción en cadena de la polimerasa retrotranscrita
SDS	: Dodecil Sulfato de Sodio
SFB	: Suero Fetal Bovino
SNP	: <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SNU	: Línea celular de cáncer gástrico de epitelio de estómago
ssRNA	: RNA de simple hebra
STAT	: Transductor de señal y activador de transcripción
TBE	: Tampón Tris Borato EDTA
TBS	: Tampón Tris Salino
TBS-BSA	: TBS- Suero fetal bovino
TBS-T	: TBS-Tween
TE	: Tampón Tris-EDTA
TEMED	: N, N, N', N'-tetrametiletildiamina
TGF- α	: Factor de crecimiento transformante alfa
TLRs	: <i>Toll like receptors</i>
UV	: Ultravioleta
V	: Volts
WB	: Inmuno-electrotransferencia (<i>Western Blot</i>)

Resumen

En Chile, el cáncer gástrico es altamente prevalente y la primera causa en mortalidad por cáncer. La principal causa de muerte en cáncer son las complicaciones por metástasis, en las cuales los receptores tirosina quinasa de la familia de los receptores de crecimiento epidermal (erbB1, 2, 3 y 4) juegan un rol importante tanto en la proliferación como en diferenciación celular. En este estudio, las muestras de pacientes fueron tomadas para evaluar la expresión de los receptores erbB a partir de 10 pacientes sometidos a gastrectomía y derivaron de tejido normal y tumoral del estómago. Los niveles de mRNA de erbB fueron medidos por RT-PCR con primers diseñados específicamente para erbB1-4. Además, tres muestras fueron analizadas por inmunohistoquímica y western blot para medir proteína en la superficie celular y total, respectivamente. Los niveles de mRNA de erbB2 y erbB3 en tejidos tumorales fueron 1,5 y 1,7 veces mayor que en tejido normal, respectivamente. En ambos, tejido normal y tumoral, erbB2 mostró los niveles de expresión más altos. Los niveles de mRNA de erbB1 fueron los mismos en tejido normal y tumoral, siendo más bajos que erbB2 y erbB3. La expresión de erbB4 no fue detectada en tejido usando este método. Hemos identificando dos moléculas claves dentro de la familia de receptores erbB, las cuales son erbB2 y erbB3 las que se sobreexpresan en tejido tumoral de pacientes con cáncer gástrico. Estas moléculas podrían ser un excelente blanco terapéutico para este u otros cánceres

Abstract

In Chile, gastric cancer is highly prevalent and the first in mortality. The leading cause of cancer death are complications by metastasis, in which receptors tyrosine kinase family of Epidermal Growth Factor Receptor (erbB-1, -2, -3 And 4) play an important role in both, proliferation and cell differentiation. Samples were taken to evaluate the erbB receptors expression from 10 patients that have undergone gastrectomy and derived from normal and tumoral tissue. The mRNA levels of erbB proteins were measured by RT-PCR with primers designed specifically to erbB1-4. Furthermore, three samples were analyzed by immunohistochemistry and western blott to measure protein on the cell surface and total protein, respectively. The erbB2 and erbB3 mRNA levels in tumoral tissues were 1,5 and 1,7 fold higher than in normal tissue, respectively. In both, normal and tumoral tissue, erbB2 showed the highest expression level. The erbB1 mRNA levels were the same in both normal and tumoral tissue, but lower than erbB2 and erbB3. The expression of erbB4 was not detected in tissue using this method. We have indentified two key molecules within the erbB receptor family that areerbB2 and erbB3 are overexpressed in tumoral tissue of patients with gastric cancer. These molecules could be excellent therapeutic targets for this and other types of cancer.

1 INTRODUCCIÓN

El cáncer comprende un variado conjunto de enfermedades. Esta se desencadena cuando las células de un tejido específico pierden los mecanismos que controlan su ciclo celular, promoviendo su proliferación, invasión e inhibiendo su muerte. En los países desarrollados, el cáncer es la primera causa de muerte en la población adulta. En Estados Unidos, una de cada cuatro muertes son debidas al cáncer, el que se ha convertido en el principal problema de salud pública de este país (Jemal, Siegel et al. 2008). En Chile, se registran aproximadamente 21.488 muertes por año debido al cáncer, lo que abarca más de un quinto de las muertes al año registradas en nuestro país; solo se ve superada por las enfermedades del sistema circulatorio (MINSAL 2007) (Figura 1).

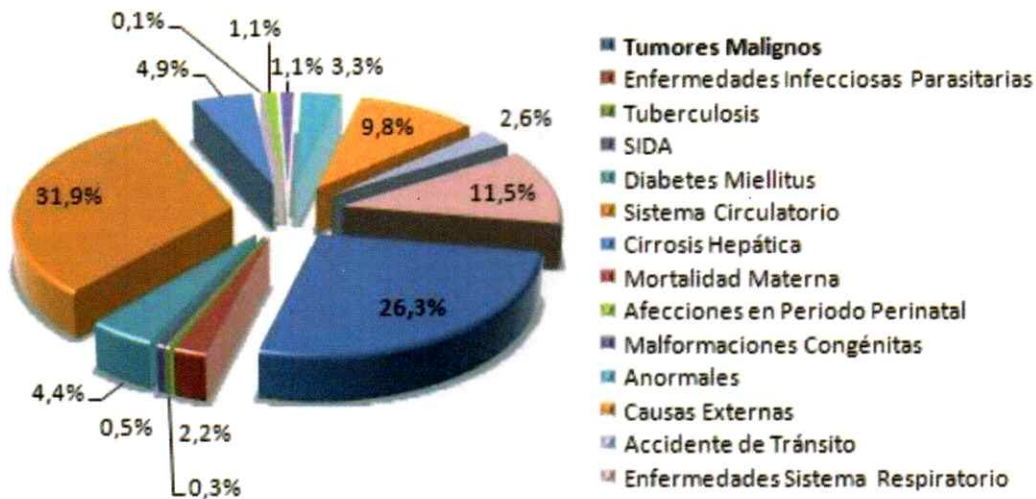


Figura 1. Gráfica de las causas de muerte registradas en Chile en el año 2007. Principales causas de muerte registradas en nuestro país durante el año 2007, en donde destacan los tumores malignos con alrededor de un 26%. Fuente: MINSAL.

Dentro los diversos tipos de cáncer, el gástrico registra una alta prevalencia y se sitúa en el primer lugar de mortalidad dentro de los tumores malignos en Chile, con 3.070 muertes/año, alcanzando una tasa de 18,5 muertes por cada 100.000 habitantes (MINSAL 2007) (Figura 2).

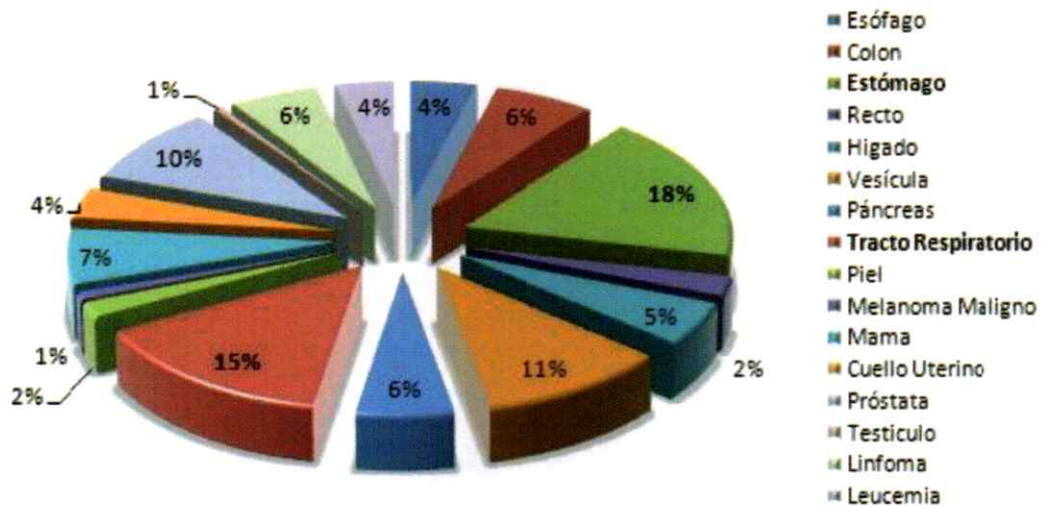


Figura 2. Gráfica de las muertes por tumores malignos en Chile en el año 2007. Se destacan los principales tumores malignos como causa de muerte registrada en Chile durante el año 2007, destacando el cáncer gástrico (estómago) con el mayor porcentaje (18%). Fuente: MINSAL.

En general, los pacientes con adenocarcinoma gástrico, al momento de su diagnóstico, ya presentan un tumor en estado avanzado. Esto debido a que este cáncer es de carácter silente, es decir, no presenta síntomas ante los cuales se puedan tomar medidas preventivas. Además, los pacientes frecuentemente tratan ellos mismos los síntomas, los que pueden ser comunes a otros trastornos gastrointestinales menos serios, como distensión, gases y acidez gástrica (Catalano, Labianca et al. 2009).

El pronóstico para estos pacientes no es muy alentador, especialmente en los cánceres más avanzados (Catalano, Labianca et al. 2009). En general, países con

altas tasas de cáncer gástrico muestran mejores tasas de supervivencia en comparación con países con bajas tasas de incidencias (Verdecchia, Corazziari et al. 2004). Este efecto está fuertemente ligado a diferencias en las tasas de supervivencia dependientes de la ubicación del tumor: tumores ubicados en el cardias del estómago (extremo por donde penetra el esófago al estómago) presentan diagnósticos muy pobres si se compara con tumores ubicados distalmente en el estómago como en el píloro (válvula inferior que conecta el estómago con el intestino delgado) y el antro (tercer tercio del estómago, ubicado antes del píloro) (Allum and Fielding 1990). La tendencia indica que el tiempo de supervivencia a este cáncer es 5 años a partir del diagnóstico (Verdecchia, Mariotto et al. 2003).

En la mayoría de los cánceres, las causas de estos no son aún conocidas, debido a la gran cantidad de factores que pueden desencadenar esta enfermedad; sin embargo, en el caso del cáncer gástrico, existen algunas relaciones de ciertos factores de tipo genético y nutricional, entre otros, con la incidencia de este mal. Poblaciones migratorias de países con alta incidencia a padecer la patología muestran una marcada disminución en el riesgo de incidencia cuando se mueven a áreas de bajo riesgo (Kolonel, Nomura et al. 1981). La dieta alimenticia juega un rol preponderante en la causalidad del cáncer al estómago. Recientemente, la *World Cancer Research Fund* (WCRF) y el *American Institute for Cancer Research* (AICR), entidades norteamericanas encargadas de investigación del cáncer, han concluido en base a una revisión de publicaciones que: (i) vegetales sin almidón, incluyendo específicamente vegetales del género *Allium*, así como frutas, protegen contra el cáncer al estómago, (ii) sal y alimentos preservados en sal son causas de este cáncer, (iii) leguminosas como la soya, y sus productos y también alimentos que contengan selenio protegen

contra el cáncer al estómago y (iv) existe información limitada de que el ají, carne procesada, alimentos ahumados, asados y aliñados son causas de cáncer al estómago (Marmot 2007).

Algunos estudios han señalado que existe una relación entre personas fumadoras y cáncer gástrico: aproximadamente un 18% del cáncer gástrico podrían ser atribuibles al hábito de fumar (Gonzalez, Pera et al. 2003).

Infecciones en el estómago con la bacteria *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) se han descrito como un factor presente en casi todos los casos de cáncer al estómago. Sin embargo, esto no implica que esta sea la causa del cáncer al estómago (Group. 2001)

Factores genéticos se han asociado al cáncer gástrico: aproximadamente un 10-15% de los cánceres gástricos aparecen en individuos con un historial familiar de esta patología (Barber, Fitzgerald et al. 2006). El riesgo de desarrollar cáncer de estomago es de dos a tres veces mayor, en parientes de primer grado del paciente con la enfermedad (Dhillon, Farrow et al. 2001).

Un alto porcentaje de los pacientes que se someten a algún tipo de operación gástrica no derivada de cáncer gástrico ha mostrado la tendencia a generar tumores estomacales. Estos normalmente se han detectado en un estadio temprano, debido al seguimiento al que es sometido el paciente, obteniendo así una mayor sobrevivencia que aquellos pacientes a los que se les detectó la enfermedad en estadios más tardíos, como se señaló anteriormente (Csendes 1991).

Se consideran otros factores de riesgo del cáncer gástrico: grupo sanguíneo tipo A, antecedentes de anemia perniciosa, antecedentes de gastritis atrófica crónica y antecedentes previos de un pólipo gástrico (Rustgi 2007).

Dentro de las neoplasias, tumores que son una masa de tejido anormal con un crecimiento prácticamente autónomo que excede al de los tejidos normales pueden ser clasificados en dos grandes categorías: tumores benignos y malignos. El tipo de neoplasia se basa en las características de su parénquima, que es el tejido que hace funcional al órgano (Richard N. Mitchell 2007).

El cáncer gástrico corresponde generalmente a un adenocarcinoma (MINSAL 2009), carcinoma o forma de cáncer con origen en células que constituyen el revestimientos interno de las glandulas de secreción externa (Fauquier, Gulland et al. 2003). En 1965, Lauren y Jarvi identificaron dos tipos histológicos principales, con características epidemiológicas, clínicas, anátomo-patológicas y pronósticas distintas: un tipo de cáncer gástrico intestinal que se desarrolla en la mucosa con metaplasia intestinal, y otro difuso, que se origina en la mucosa gástrica propiamente tal (MINSAL 2009).

La combinación particular de múltiples cambios difiere en dos tipos histológicos, indicando que puedan existir diferentes vías genéticas para el cáncer gástrico bien-diferenciado (tipo intestinal) y poco-diferenciado (tipo difuso) (Rajcevic, Juvan et al. 2001).

Carcinomas gástricos no surgen *de novo* a partir de células epiteliales normales, pero si se desarrollan producto de sucesivos cambios tanto celulares, como genéticos y morfológicos. Está bien caracterizado el tipo intestinal de cáncer gástrico en humanos;

no obstante, las lesiones gástricas que predisponen al desarrollo del tipo difuso de cáncer gástrico aún no están claras (Catalano, Labianca et al. 2009), siendo estos dos tipos de cáncer gástrico distintos. El desarrollo del tipo intestinal de cáncer gástrico incluye la transformación de mucosa normal a mucosa que se asemeja a epitelio intestinal (metaplasia intestinal), lo que aumenta el riesgo de cáncer gástrico (Stemmermann 1994). En una etapa más avanzada, esta metaplasia intestinal podría progresar a displasia, y en última instancia a carcinoma. La displasia implica células neoplásicas, no invasivas, que generan un estado precursor de una lesión invasiva. La invasión de la lámina propia por células neoplásicas es concluyente a la hora de interpretar un diagnóstico de carcinoma de mucosa gástrica (Goldstein and Lewin 1997).

En contraste, el tipo difuso de cáncer gástrico presumiblemente surge debido a cambios a partir de una sola célula mucosa en la región del cuello de las glándulas gástricas. Luego, estas células proliferan e invaden la lámina propia. Para explicar esta hipótesis, la carcinogénesis gástrica se entiende como un proceso de multiestados y multifactorial el cual implica un medio ambiente gástrico irritante y otros factores como sobre secreción ácida, sobrepoblación de bacterias y una producción de nitritos o compuestos N-nitrosos (altamente susceptibles a la oxidación en ambientes ácidos como el estómago). Relacionado con la producción de intermediarios de nitrógeno, los receptores de tipo toll (TLRs), son una familia de receptores de reconocimiento de patrones que son conocidos por su rol en la defensa hospedero de infecciones (Janeway 1989). Los TLRs reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). El reconocimiento de los PAMPs por los TLRs conlleva a la inducción de la óxido nítrico sintetasa (Kleinert, Pautz et al. 2004) y la activación del complejo NADPH

oxidasa (Park, Jung et al. 2004) el cual es importante para la producción de intermediarios reactivos de oxígeno y nitrógeno (Rakoff-Nahoum and Medzhitov 2009). El resultado de esta cascada de eventos genera un espectro progresivo de los estados histológicos que van desde el epitelio gástrico normal a un adenocarcinoma gástrico (Correa 1992).

Actualmente, los investigadores en las áreas básicas, pre-clínica y clínica están abocados en comprender los mecanismos celulares y moleculares de esta enfermedad y, así, generar tratamientos más efectivos y menos invasivos que permitan combatir la enfermedad. La búsqueda de genes expresados diferencialmente en cáncer gástrico podría ayudar a caracterizar alteraciones moleculares, además de definir ciertos métodos de diagnóstico y tratamiento para cáncer gástrico. Por lo tanto, el desarrollo de más análisis moleculares de esta enfermedad es necesario para identificar variaciones entre pacientes sanos y pacientes con cáncer, para así determinar factores que contribuyen a la carcinogénesis gástrica y que podrían utilizarse como marcadores moleculares de diagnóstico temprano de cáncer gástrico (Jung, Kim et al. 2000).

La principal causa de muerte por cáncer deriva de complicaciones por metástasis y no por tumores primarios, por lo que es importante comprender los mecanismos de invasión y metástasis en cáncer gástrico. Para producir metástasis, las células tumorales deben completar la progresión de múltiples pasos a través de eventos secuenciales y selectivos. El proceso metastásico comprende el desprendimiento de las células tumorales, invasión local, motilidad, angiogénesis, invasión de vasos, supervivencia en la circulación, adhesión a células endoteliales, extravasación y recrecimiento en diferentes órganos. Se han identificado moléculas involucradas en

cada paso; estas incluyen moléculas de adhesión celular, diversos factores de crecimiento, enzimas que degradan la matriz extracelular y factores de motilidad. La mayoría de estas moléculas pueden ser usadas como factores de pronóstico e incluso, como blancos terapéuticos en el diseño de terapias dirigidas en cáncer gástrico (Yasui, Que et al. 2005). Para un mejor entendimiento de este nuevo enfoque, estos agentes terapéuticos se podrían dividir en cinco categorías diferentes, dependiendo de la función que ejerza: (i) interfieren directamente con las señales de crecimiento, tales como aquellos que inhiben el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR); (ii) inhiben el proceso de angiogénesis; (iii) interfieren con el potencial que presentan las células de replicarse ilimitadamente, como los inhibidores del ciclo celular; (iv) promueven la apoptosis, como los inhibidores del proteosoma; e (v) inhiben la invasión del tejido y el proceso de la metástasis, como los inhibidores de las metaloproteinasas de la matriz (Tabernero, Macarulla et al. 2005).

Dentro de estos blancos utilizados en terapia dirigida o intervención terapéutica, juegan un rol importante las proteínas de la familia erbB, denominadas así por su homología con v-erbB, el producto génico del eritroblastoma viral. Estas proteínas pertenecen al grupo de los receptores tirosina quinasa, proteínas que son capaces de transferir un grupo fosfato del ATP a un residuo de tirosina de ciertas proteínas, y consta de cuatro miembros: el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR), también conocido como erbB1 o HER1, erbB2/HER2/Neu, erbB3/HER3, y erbB4/HER4. Estos receptores juegan un rol fundamental en la activación y regulación de una gran variedad de respuestas celulares, que incluyen proliferación celular, diferenciación, apoptosis, migración y adhesión, entre otros (Yarden and Sliwkowski 2001). Los cuatro receptores tienen en común un dominio extracelular de unión a ligando, un dominio

transmembrana y un dominio citoplasmático con actividad tirosina quinasa. Estos receptores tienen la capacidad de formar tanto homo como heterodímeros, ante la unión de un ligando (factor de crecimiento) en su dominio extracelular (Normanno, De Luca et al. 1998; Riese and Stern 1998; Jones, Akita et al. 1999).

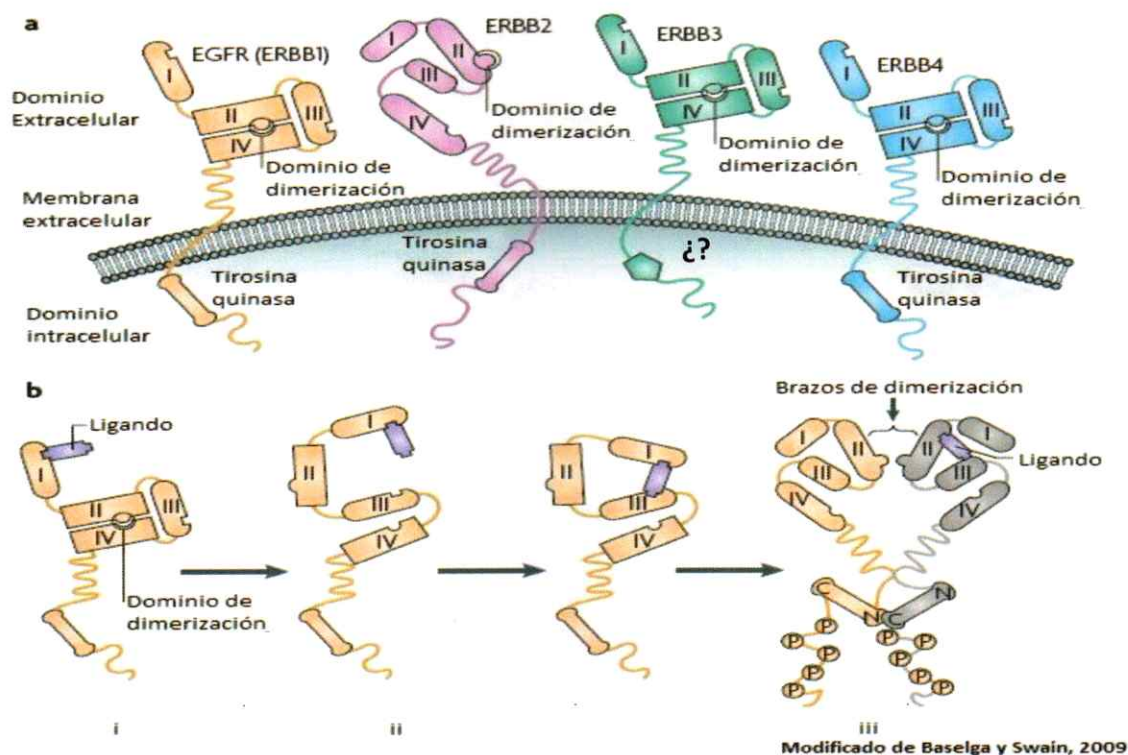


Figura 3. Morfología y activación de los Receptores erbB. a) Cada receptor está compuesto de tres dominios funcionales: un dominio extracelular dividido en 4 subdominios responsables de la unión a ligando; un dominio transmembrana α -hélice; y un dominio intracelular con actividad tirosina quinasa. ErbB2 no presenta subdominio de unión a ligando conocido, mientras que los demás receptores permanecen en una conformación cerrada donde no es posible la dimerización; erbB2 está permanentemente disponible para la dimerización (Burgess, Cho et al. 2003). Se ha descrito recientemente que erbB3 presenta actividad tirosina quinasa (Shi, Telesco et al. 2010) b) Conceptualización del cambio conformacional de los receptores al unir el ligando. i) Conformación cerrada, no disponible para la dimerización; ii) conformación abierta disponible para la dimerización del receptor y iii) dimerización, activación de la tirosina quinasa y transfosforilación. La interacción de los dominios quinasa es asimétrica, un lóbulo amino-terminal del dominio tirosina quinasa interactúa con el lóbulo carboxi terminal del otro dominio (Zhang, Gureasko et al. 2006).

La dimerización de los receptores es esencial para la función de los receptores erbB y para la señalización intracelular que los mismos pueden comandar (Olayioye, Neve et al. 2000; Ferguson, Berger et al. 2003). Estos receptores normalmente se encuentran en una conformación inactiva y como monómeros, plegadas de tal manera de evitar la dimerización (Figura 3) (Burgess, Cho et al. 2003; Baselga and Swain 2009).

La región extracelular de cada receptor erbB se compone de cuatro dominios (I-IV; Figura 3). La determinación de la estructura de unión al ligando se ha demostrado en estudios tempranos que muestran la importancia de los dominios I y III en la unión del ligando. Además, estos estudios revelaron que hay una interacción receptor-receptor directa, promovido por el dominio II que presenta un "brazo" de dimerización; los ligando no están implicados en la interacción receptor-receptor (Garrett, McKern et al. 2002; Ogiso, Ishitani et al. 2002). Cuando los receptores adoptan la conformación cerrada (erbB1, 3 y 4), es porque el dominio II de dimerización está bloqueado por la interacción intramolecular entre los dominios II-IV (Ferguson, Berger et al. 2003). La estructura de la región extracelular de erbB2 es radicalmente diferente de las otras. erbB2 ha adoptado una conformación que ensambla un estado ligando-activado: la interacción entre el dominio II-IV está ausente y el "brazo" de dimerización o "loop" en el dominio II está expuesto (Garrett, McKern et al. 2002; Cho, Mason et al. 2003). Esta estructura es consistente con los datos que indican que erbB2 es la molécula preferida de dimerización para los otros erbB activados, así como permanentemente está listo para la interacción con otros receptores erbB que hayan unido su respectivo ligando (Lee-Hoeflich, Crocker et al. 2008).

La cascada de señalización compuesta por la familia de los factores de crecimiento epidermal (EGF) y sus receptores regula la proliferación y diferenciación de muchos

tipos de tejidos. La desregulación de esta red es un factor significativo en la génesis o progresión de un gran número de cánceres humanos, incluyendo neoplasias del cerebro, pulmón, mama, ovarios, páncreas y próstata (Hynes and Stern 1994; Salomon, Brandt et al. 1995).

Se han descrito tres grupos de ligandos para los receptores de la familia erbB: el primer grupo lo constituye el EGF por sí mismo, factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α) y amfiregulina (AR) que se unen a erbB1 (Gschwind, Fischer et al. 2004). El segundo grupo de ligandos se unen a erbB2 y erbB4 e incluye a EGF de unión a heparina (HBEGF), betacelulina (BTC) y epiregulina (EPI) (Shelly, Pinkas-Kramarski et al. 1998). El tercer grupo de ligandos, el cual une a erbB3 y erbB4, incluye a un grupo de complejos polipeptídicos denominados neuregulinas (NRGs), y también un grupo conocido como heregulinas o NRG1, entre otros, y neuregulina-2s (NRG2), también conocido como factor de crecimiento derivado de cerebelo. Además, múltiples isoformas de NRG1 y NRG2 aparecen de *splicing* transcripcional alternativo (Carraway, Weber et al. 1997; Chang, Riese et al. 1997).

La mayoría de los péptidos de la familia de hormonas EGF son sintetizados a partir de precursores de transmembrana, que son proteolíticamente digeridos para ser liberados de forma soluble y tener la función de señales tanto auto como paracrina o cumplir una función como hormonas membrana-anclada en señales yuxtacrinas, mediante uniones celulares como los *gap* (conexiones entre las células en mamíferos) (Riese and Stern 1998). Además, en varios tumores, los ligandos de los receptores erbB son producidos tanto por las células tumorales o secretadas por células del estroma que rodean al tumor, lo que promueve la activación de los receptores erbB (Salomon, Brandt et al. 1995).

Existe un gran número de formas de activación diferencial de los receptores erbB, debido a que existe una gran combinatoria de ligandos e interacciones cruzadas entre los cuatro receptores erbB. Para considerar lo anterior, se debe tener en cuenta que un ligando se puede unir a múltiples receptores, un receptor erbB puede unir múltiples ligandos, y además, los ligandos pueden activar a los receptores erbB en *trans*. Esto quiere decir que un ligando que no se une a un receptor erbB lo puede activar si este está dimerizado con otro receptor erbB que sí se une a este ligando (Stern and Kamps 1988).

La dimerización de los receptores conduce a una auto o transfosforilación por la actividad tirosina quinasa intrínseca en residuos aminoácidos específicos en los dominios citoplasmáticos. Los sitios fosforilados actúan como sitios de anclaje para varias proteínas involucradas en la activación y regulación de numerosas cascadas de señales celulares. La familia de receptores erbB tiene diferente especificidad de señales; además, el poder de heterodimerizar genera una gran diversidad de respuestas (Di Fiore, Segatto et al. 1990). La activación de las diversas vías de señalización es dependiente de los distintos dímeros, porque cada miembro de la familia de receptores erbB tiene características bioquímicas distintas y un único conjunto de receptores interactuantes, así como sus respectivos ligandos (Hynes, Horsch et al. 2001; Citri and Yarden 2006).

Para considerar la importancia de los receptores erbB en el desarrollo de tumores malignos, es importante también conocer el rol preponderante que juegan estos receptores. Una forma de hacerlo es conocer algunas funciones de estos receptores en tejidos no malignos. Los péptidos NRG juegan un rol significativo en el desarrollo neuronal: las neuronas producen NRGs, mientras que las células post-sinápticas o

células asociadas con neuronas (glía o precursores de células de Schwann) expresan receptores de la familia erbB (Fischbach and Rosen 1997). Funciones adicionales para las NRGs se han identificado en ratones mutantes, en los cuales las señales de NRG está interrumpida, mostrando defectos en el sistema nervioso periférico y sobre todo una pérdida de células en los ganglios sensitivos craneales o una pérdida de innervación de rombómeros por las neuronas craneales sensoriales y motoras (Meyer and Birchmeier 1995).

Ratones *knock out* para erbB1 usualmente mueren en la primera semana post natal debido a problemas respiratorios, además muestran fenotipos gastrointestinales aberrantes, piel fina y defectos de los folículos pilosos que se traducen en cabello quebradizo (Threadgill, Dlugosz et al. 1995). Estas observaciones ayudan a explicar los efectos secundarios más comunes asociados con la inhibición de erbB1 en el ámbito clínico.

ErbB2 tiene un papel esencial en el desarrollo del corazón (Lee, Simon et al. 1995). Los embriones de ratones que carecen de estos receptores mueren por una formación inadecuada de la trabécula ventricular, estructura responsable de mantener el flujo sanguíneo. En el área clínica, un número de pacientes tratados con trastuzumab (anticuerpo usado en inmunoterapia contra el cáncer de mama) muestran fenotipos cardíacos, como miocardiopatía, insuficiencia cardíaca congestiva y la disminución de la fracción de eyección ventricular, coincidente con lo visto en ratones (Slamon, Leyland-Jones et al. 2001). El fenotipo observado en los ratones *knock out* para erbB2 es idéntica al observado en los ratones que carecían de erbB4 (Gassmann, Casagrande et al. 1995) o NRG1 (Meyer and Birchmeier 1995), demostrando la

importancia de las interacciones del heterodímero erbB2-erbB4 en el desarrollo del corazón.

De los cuatro receptores erbB, erbB2 y erbB3 son particularmente proteínas dependientes entre sí, ya que son receptores funcionalmente incompletos por sí mismos. ErbB2 tiene un dominio extracelular que no presenta sitio de unión a ligandos, mientras que erbB3 tiene un dominio intracelular pseudoquinasa que se ha pensado inactivo, por ende, presentaría una menor actividad catalítica quinasa. Recientemente se ha descrito que, a pesar de las alteraciones en la secuencia aminoacídica de erbB3, presenta la suficiente actividad quinasa para trans-autofosforilar su región intracelular (Shi, Telesco et al. 2010) En complementación, el heterodímero erbB2-erbB3 es altamente funcional como unidad de señalización y constituye el dímero más activo de señalización dentro de esta familia (Karunagaran, Tzahar et al. 1996; Tzahar, Waterman et al. 1996).

Todas las interacciones ya mencionadas entre los receptores erbB y las diversas formas de activar estos receptores, ya sea como homo o heterodímeros, generan vías de señalización intracelulares que desencadenan variadas reacciones para promover la proliferación de tumores malignos en los cánceres. Para que esto ocurra, se necesita una activación o transactivación de los receptores erbB, como ya se mencionó, la unión de ligando al receptor erbB y la subsecuente formación del dímero inicia la señalización mediante un arreglo complejo de vías intracelulares. La formación de dímeros resulta en la fosforilación de los mismos, generando sitios de anclaje que permiten el reclutamiento de componentes de la cascada de señalización río abajo, además de la formación de complejos de las mismas vías.

Dos vías claves de señalización activadas por la familia de dímeros erbB son la vía de las proteínas quinasa activadas por mitógenos (MAPK), la cual estimula la proliferación celular, y la vía de la fosfoinositol 3 quinasa-Akt (PI3K-Akt), la que promueve la supervivencia celular del tumor. La vía de las MAPKs y su relación con la familia de los receptores erbB está bien descrita. Se sabe que su activación conduce a la transcripción de genes que promueve la proliferación celular, así como migración, diferenciación celular y angiogénesis (Olayioye, Neve et al. 2000; Yarden and Sliwkowski 2001). La señalización mediante la vía PI3K-Akt conduce a numerosos procesos celulares, entre ellos la supervivencia, anti-apoptosis celular y control del ciclo celular (Cantley 2002). La fosforilación de los receptores erbB también promueve la unión directa de la molécula transductora de señales y activadora de transcripción (STAT). Esta unión genera su auto fosforilación en un residuo de tirosina para así dimerizar e ingresar al núcleo, resultando en una unión específica a secuencias de DNA en regiones promotoras de genes como factores pro-supervivencia (Hynes and Lane 2005). Estas vías y proteínas son solo unos pocos ejemplos de moléculas de señalización involucradas en la red de los receptores erbB. En total, más de 100 proteínas interactuantes y más de 200 EGF relacionados a los receptores erbB han sido descritos en la literatura (Morandell, Stasyk et al. 2008).

Se han descrito mutaciones en los receptores erbB, que se traducen en una sobre expresión de los mismos, lo que ha sido descrito en numerosos cánceres, ya que una constante activación resulta en una división celular descontrolada. Hoy en día se sabe que estos receptores juegan un rol en casi todos los tipos de cáncer (Prenzel, Zwick et al. 2000; Shawver, Slamon et al. 2002), entre ellos el cáncer gástrico (Hsieh and Moasser 2007; Hofmann, Stoss et al. 2008; Arkenau 2009; Marx, Tharun et al. 2009;

Zhang, Yang et al. 2009).. ErbB1 se ha encontrado sobre expresado en más del 80% de los cánceres a cabeza y cuello, activados por amplificación y/o mutación en aproximadamente 50% de gliomas y activados por mutación en alrededor de 10-15% de cáncer no microcitico de células del pulmón (NSCLC) (Frederick, Wang et al. 2000). La amplificación génica y sobre expresión proteica de erbB2 se ha visto en alrededor de 25-30% de cáncer de mamas y algunos otros cánceres (Slamon, Godolphin et al. 1989). Es más, la amplificación génica de erbB2 ha sido considerada como un indicador de tipo pronóstico, ya que presenta una relación indirectamente proporcional con la sobrevida del paciente, es decir que a mayor cuantificación de amplificación génica y/o expresión proteica es menor el pronóstico de sobrevida del paciente (Lee, Soung et al. 2005; Becker, Muller-Tidow et al. 2006). Abundante evidencia revela que erbB3 es la molécula de dimerización de erbB2 y, además, juega una importante y necesaria función en la tumorigénesis mediada por erbB2. ErbB3 está frecuentemente sobre expresado en cáncer de mamas en conjunto con la sobre expresión de erbB2 (Naidu, Yadav et al. 1998). Tumores generados en ratón debido a la sobre expresión transgénica de erbB2 son también caracterizados por el incremento de expresión y fosforilación de erbB3 (Siegel, Ryan et al. 1999). Un aumento de expresión de erbB3 aumenta sinérgicamente la potencia transformante de erbB2 (Alimandi, Romano et al. 1995).

La identificación de los receptores erbB, como oncogénes, ha llevado al desarrollo de terapias contra el cáncer dirigidas contra estas moléculas. Ejemplo de estas terapias son los diseños de anticuerpos de diversos tipos (monoclonales, policlonales, quiméricos, humanizados, "humanos") contra los receptores erbB, los cuales bloquean la dimerización de los receptores o dominio tirosina quinasa (Schmitz and Ferguson

2009). Además, existen inhibidores farmacológicos contra el dominio tirosina-quinasa de los receptores, bloqueando ciertas vías de señalización intracelulares. Ejemplos de estos nuevos tipos de terapias oncológicas, aprobadas por la FDA (Food and Drugs Administration) son los inhibidores del dominio tirosina-quinasa de erbB1, como Getinib (Iressa®) e Imatib (Gleevec®). Dentro de los anticuerpos monoclonales, uno de los más destacados es el Cetuximab (Erbix®), dirigido para el tratamiento de cáncer colorectal y recientemente aprobado para su uso en carcinoma celular escamoso de cabeza y cuello (Goldberg 2005), y Trastuzumab (Herceptin®), dirigido para el tratamiento de cáncer de mamá avanzado (Romond, Perez et al. 2005). Basándose en evidencias recientes con buenos resultados en los tratamientos de inhibidores y anticuerpos nombrados, se busca aplicarlos en otros tipos de cáncer usando como hipótesis de que los receptores erbB están presentes en variados tipos de cánceres. Para esto, se diseñan estudios en líneas celulares, con el propósito de analizar los efectos de medicamentos ya diseñados, pero en otras neoplasias. Ejemplo de esto son los estudios que se han hecho en líneas celulares de cáncer gástrico (SNU, líneas celulares de cáncer gástrico), utilizando Trastazumab. Se ha observado que Trastazumab inhibe el crecimiento de las líneas celulares con amplificación génica de erbB2, todo esto en conjunto con tratamiento de quimioterapia (Kim, Kim et al. 2008).

Éstas moléculas son un excelente blanco terapéuticos, ya que la inhibición de estos receptores, con anticuerpos monoclonales, no solo impide el crecimiento del tumor, inhibiendo señales intracelulares, sino que también, al unirse en la superficie celular, pueden tener un efecto citotóxico, al activar funciones efectoras de anticuerpos, como citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos o activación del sistema del complemento, lisando las células tumorales (Gröner, Hartmann et al. 2004).

Recientemente, los avances en las ciencias biológicas y la tecnología están proveyendo objetivos moleculares para diagnósticos y tratamientos contra el cáncer. Existen variadas técnicas basadas en PCR (*Polymerase Chain Reaction*) que se estudian validar, para así mejorar la precisión de un pronóstico, predecir respuestas ante terapias, resistencias o toxicidades ante una terapia (Bernard and Wittwer 2002) y así complementar los resultados obtenidos de los protocolos ya implementados para las distintas neoplasias.

En base a los antecedentes descritos, este seminario de título tiene como objetivo encontrar posibles blancos terapéuticos moleculares contra el cáncer gástrico, centrándose en los receptores erbB, con lo que se pretende generar a largo plazo un anticuerpo anti-erbB que ayude en el tratamiento del cáncer gástrico

2 HIPOTESIS

Se generará un perfil de expresión para los receptores erbB en cáncer gástrico mediante RT-PCR, demostrando que la técnica permite determinar patrones de expresión diferenciales.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Caracterizar el patrón de expresión de los receptores erbB en células de cáncer gástrico

3.2 Objetivos específicos

- Estandarizar la técnica de PCR para determinar la expresión de mRNA de receptores tirosina quinasa erbB en distintas líneas celulares de cáncer gástrico.
- Analizar la expresión de mRNA de los receptores tirosina quinasa erbB en muestras de tejido gástrico de pacientes con cáncer gástrico.
- Analizar expresión proteica de al menos un miembro de la familia de los receptores tirosina quinasa erbB en muestras de tejido gástrico de pacientes con cáncer gástrico.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Reclutamiento de Pacientes

Se generaron tres consentimientos informados, los cuales fueron aprobados por: Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Comité de Ética Científico, Servicio de Salud Metropolitano Oriente y Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos del Hospital Clínico de la Universidad de Chile. Esto fue realizado a la luz de los postulados de la Declaración Helsinki, de la guía internacional de ética para la investigación biomédica que involucra sujetos humanos (CIOMS 1992), y de las guías de buena práctica clínica de ICH 1996. Se analizaron 10 muestras de mucosa gástrica, tanto del tumor como de tejido adyacente (que, según biopsia rápida en cirugía, indicaba tejido morfológicamente normal) de pacientes que fueron sometidos a gastrectomía con diagnóstico de adenocarcinoma gástrico en el Hospital del Salvador y el Hospital Clínico de la Universidad de Chile (HCUCH). En este último recinto, también se obtuvieron

muestras gástricas de operaciones bariátricas, todo esto después la firma del consentimiento informado correspondiente.

4.2 Diseño de partidores

Se diseñaron partidores específicos para las secuencias génicas de cada receptor *erbB* (*Homo sapiens sapiens*), considerando los siguientes códigos de genes (GeneID): *erbB1* (1956), *erbB2* (2064), *erbB3* (2065) y *erbB4* (2066) (EntrezGene). Para el diseño de los partidores, se realizó un análisis de alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas del ARN mensajero (mRNA) con el programa ClustalW2. Para visualizar las secuencias blanco y analizar propiedades de los partidores, se utilizó el programa OligoExplorer 1.2. Los partidores diseñados en esta investigación fueron los siguientes:

Partidor directo *erbb1F01*: 5'-TCATTGCCCTCAACACAGTGG-3'

Partidor reverso *erbb1R01*: 5'-CTGGCAGTTCTCCTCTCCT-3

Partidor directo *erbb2F01*: 5'-CATTCTGCTGGTCGTGGTCT-3'

Partidor reverso *erbb2R01*: 5'-CCACACCAGCCATCACGTAT-3'

Partidor directo *erbb3F01*: 5'-G TTCAGAATGAATGT CGGCC-3'

Partidor reverso *erbb3R01*: 5'-GCACAGTTCCAAGACACCC-3'

Partidor directo *erbb4F01*: 5'-GGTATTCATGGGGACCCTTA-3'

Partidor reverso *erbb4R01*: 5'-AGCCATCACTGGAACACAGA-3

Partidor directo Hu β - actina: 5'-GCCAACCGCGAGAAGATGACC-3'

Partidor reverso Hu β - actina: 5'- CTCCTTAATGTACACGCACGATTC-3'

4.3 Líneas celulares y condiciones de cultivo

Se utilizaron las líneas celulares BL, OCM1, FMS y DF de melanoma maligno, donadas por el Dr. Flavio Salazar, Universidad de Chile, Facultad de Medicina, Instituto de Ciencias Biomédicas, Laboratorio de Inmunología Anti Tumoral, MKN45 y AGS, células epiteliales provenientes de adenocarcinoma gástrico donadas por el Dr. Andrew Quest, Universidad de Chile, Facultad de Medicina, Instituto de Ciencias Biomédicas, Laboratorio de Comunicación Celular, PC3, línea humana de cáncer de próstata, donada por el Dr. Enrique Castellón Universidad de Chile, Facultad de Medicina, Instituto de Ciencias Biomédicas, Laboratorio Andrología Celular y Molecular, y HEK-293 (*Human Embryonic Kidney*). Todas estas líneas celulares se cultivaron a 37 °C en una atmosfera humedecida y con 5% de CO₂, en medio de cultivo RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute), las cinco primeras líneas celulares y DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)/F12 (1:1 v/v), las tres líneas celulares restantes, AGS, PC3 y HEK-293, suplementado al 5% con suero fetal bovino (SFB), 100 U/ml de penicilina G y 100 µg/ml de estreptomina.

4.4 Análisis de expresión génica mediante transcripción reversa acoplado a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

4.4.1 Extracción de RNA total

4.4.1.1 Extracción de RNA total a partir de líneas celulares

El RNA se purificó utilizando la solución de Trizol (Invitrogen®) y siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, a 5x10⁶ células en fase exponencial (confluencia 70-80%), cultivadas en botellas de 25 ml, se les agregó 1 ml de solución

Trizol y se lisaron mediante intenso pipeteo. El lisado se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos; luego, se agregó 0,2 ml de cloroformo y se mezcló por 15 segundos en vórtex. Seguido a esto, se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C, y luego se rescató la fase acuosa superior transparente donde se encuentra exclusivamente el RNA, agregándole un volumen de isopropanol. Las muestras se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12000 x g por 10 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet con 1 ml de etanol 75% mediante vórtex y centrifugación a 7500 x g por 5 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se secó el pellet bajo campana alrededor de 5 minutos. Luego, se disolvió el RNA en 40 µl de agua libre de nucleasas. El RNA obtenido fue tratado con DNasa I (Ambion). Se tomaron 2 µl y se enrasó a 500 µl (agua DEPC (dietilpirocarbonato) o libre de nucleasas). Se midió la absorbancia usando un espectrofotómetro *Genova* (Jenway) a 260 y 280 nm. Se consideró una relación 260/280 nm adecuada entre 1.7 y 2.0 con respecto a su pureza, para asegurar que no existiera contaminación con proteínas y DNA. Para obtener la concentración en µg/µl, se multiplicó la absorbancia a 260 nm por 10, considerando la siguiente ecuación:

$[ssRNA] = A_{260} \times 40 \times 250/1000$ (ecuación 1), donde una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 40 µg/ml ssRNA. El tercer término de la ecuación corresponde al factor de dilución y transformación de unidades de ml a µl.

4.4.1.2 Extracción de RNA total a partir de tejido de mucosa gástrica

Se utilizaron 30 mg de tejido gástrico obtenidos durante la cirugía gástrica, de tejido tumoral y normal adyacente al tumor de cada paciente y, como controles negativos,

tejidos de pacientes sometidos a operaciones bariátricas como manga gástrica o bypass gástrico.

Una vez obtenida la muestra en pabellón esta fue almacenada en un tubo eppendorf con un estabilizador de tejido *RNAlater® Stabilization Reagent* (Quiagen) que protege la integridad del RNA infiltrándose en el tejido, siendo limitante el tamaño del tejido procurando que el tejido se infiltre completamente . Con este paso, se pudo guardar el tejido sin problemas durante 1 mes a 4 °C.

El tejido se disgregó y homogenizó con un triturador de tejido *Tissue Tearor™* (BIOSPEC PRODUCTS, INC.), en presencia del buffer de lisis del kit de extracción de RNA total *RNeasy Mini Kit* (Quiagen), y luego se siguieron las indicaciones del fabricante. La concentración y pureza del RNA fue determinada como se describió previamente.

4.4.2 Reacción de transcripción reversa

A 3 µg de RNA se le agregó 1µl de oligo dT, de concentración 500 µg/ml y cantidad suficiente de agua DEPC para completar un volumen de 13 µl. Se incubó en el termociclador a 70 °C durante 10 minutos, luego se incubó 5 minutos a 4 °C. Se agregaron 4 µl de *M-MLV RT Buffer 5x* (Promega), 2 µl de una mezcla de desoxinucleótido trifosfato (dNTP) 10 mM. Se incubó 5 minutos a 37 °C, luego se agregó 1 µl de la enzima *M-MLV Reverse Transcriptase* (Promega). Con esto se obtuvo un volumen final de 20 µl. Se incubaron los tubos a 37 °C en el termociclador durante 1 h y se inactivó la enzima incubando por 10 minutos a 72 °C.

4.4.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Cada reacción de PCR se realizó en un volumen final de 20 μ l, el cual consistió en: 10 μ l de *GoTaq[®] Green Master Mix* (Promega), 7 μ l de *Nuclease-Free Water* (Promega), 0,5 μ l de partidor directo y partidor reverso y 2 μ l de cDNA generado en la transcripción reversa. Para los cinco pares de partidores se estandarizó un programa de ciclos: 1 ciclo a 95 °C por 10 minutos, 28 ciclos a: 95 °C por 30 segundos, 54 °C por 30 segundos y 72 °C por 30 segundos y 1 ciclo a 72 °C por 10 minutos en el termociclador *Mastercycler gradient* (Eppendorf).

4.5 Electroforesis, geles de agarosa

4.5.1 RNA

Se expuso a luz UV por 30 minutos todo el material utilizado en este procedimiento (cámara de electroforesis, peñeta, cubeta, matraz, probeta). Se preparó un gel de agarosa para biología molecular al 1,5% diluido en tampón MOPS (3-morfolino-1-propanosulfonato) 1X con un volumen final de 35 ml. Además, se agregó 1 μ l de bromuro de etidio para luego visualizar en transiluminador con luz ultravioleta (UV). Antes de cargar el gel, el RNA se incubó por 10 minutos a 65 °C y luego se puso inmediatamente en hielo para posteriormente cargar 3 y 5 μ g de RNA, para ver la correlación entre concentración y presencia de bandas. Se corrió el gel a 50 V por 45 minutos en cámara electroforética. La visualización se llevó a cabo con luz UV, teniendo en consideración que, en un RNA de buena calidad, la banda de rRNA de 28S representa aproximadamente el doble en cantidad con respecto a la banda de rRNA de 18S.

4.5.2 cDNA

Se tomaron 0.53 g de agarosa para biología molecular (SeaKem®) y se mezclaron con 35 ml de buffer TBE (Tris-borato-EDTA) 1X (gel al 1,5%). Se disolvió en microondas, llevando a ebullición y agitando esporádicamente. Se agregó 1 μ l de bromuro de etidio, luego se enfrió para verter en cámara de electroforesis. Se cargaron 10 μ l de amplificado más 7 μ l de estándar de peso molecular *100 bp DNA Ladder* (New England Biolabs). Se corrió el gel en cámara electroforética por 15 minutos a 40 V y luego 1 h a 60 V. Posteriormente, los productos amplificados fueron visualizados bajo transiluminador con luz UV. El registro del gel se hizo con una cámara digital CANON®, modelo Power Shot S500 ELPH, 3X, 5.0 Megapíxeles. El análisis densitométrico de las bandas se realizó con el programa ImageJ versión 1.42.

4.6 Western Blot

Se utilizaron 5×10^6 células, a las que se les removió el medio de cultivo lavando con tampón fosfato salino (PBS) (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 1,4 mM KH_2PO_4) centrifugando a 1.300 rpm por 5 minutos a 4 °C. Se resuspendieron las células en 1 ml de PBS en tubos eppendorf y se centrifugaron a 6.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se agregó 100 μ l de tampón de lisis RIPA (50mM Tris-HCl, pH 7.5, 150mM NaCl, 1% Tritón X-100, 0.5% Deoxicolato sódico, 0.1% SDS) en presencia de *Protease Inhibitor Cocktail* (Calbiochem®), se resuspendió vigorosamente y se incubó en hielo por 10 minutos. En el caso del uso de tejido se utilizó entre 50 – 100 mg de tejido gástrico, el cual fue lavado vigorosamente con PBS, luego se cortó en trozos lo más pequeño posible para así disgregar y homogenizar con el triturador de tejido, en presencia de tampón de lisis RIPA más el cocktail de proteasas antes mencionado. Para obtener una solución lo más homogénea posible, el

tejido se sonicó con el sonicador *Microson™ XL2000* (Misonix) a nivel 5 por 1 minuto, 5 veces, luego se incubó por 10 minutos en hielo para así posteriormente realizar el mismo procedimiento aplicado a las líneas celulares. Se centrifugó a 13.000 rpm por 25 minutos a 4 °C y se rescató el sobrenadante sin tocar el pellet, transfiriéndose el sobrenadante a un tubo limpio.

Se determinó la cantidad total de proteínas con el reactivo de *Bradford* (BioRad), utilizando el reactivo de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Una vez que se cuantificó el contenido proteico, se agregó tampón de carga 3X (Tris pH 6,8, glicerol 97%, β -mercaptoetanol, SDS 20%, agua y azul de bromofenol), para denaturar las proteínas, las muestras se incuban durante 5 minutos a 100 °C. Se cargaron 25 μ g de proteína en un gel de poliacrilamida al 5,5% / 10%, utilizando la solución de tampones para la porción concentradora y separadora del gel respectivamente, descritas anteriormente por Laemmli (Laemmli 1970). El gel de poliacrilamida se corrió durante 15 minutos a 50 V y luego a 1 h a 100 V. Las proteínas que ya habían corrido en el gel se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se tiñeron momentáneamente con solución rojo de Ponceau al 1% (rojo Ponceau 1% p/v y ácido acético 10% v/v), con el propósito de visualizar que la cantidad de proteína cargada fuera la misma, además de asegurarse de la transferencia a la membrana. Se lavó la membrana con solución TBS-Tween (TBS-T) al 0,1% v/v (5 M NaCl, 1 M Tris/HCl pH 7,5 y 0,1% Tween-20) y luego se bloqueó durante la noche con proteínas de leche descremada al 5% p/v en TBS-T en agitador a 4 °C. Finalizado el bloqueo, se lavó 7 veces por 5 minutos con TBS-T y se incubó durante 2 h con el anticuerpo monoclonal producido en ratón anti c-erbB-2 humano (Invitrogen) y anticuerpo monoclonal anti actina producido en conejo (Sigma-Aldrich®), en forma separada, a una concentración de 0,5 μ g/ml y 1:1000

respectivamente, diluidos en TBS-T. Finalizada la incubación, la membrana se lavó 7 veces por 5 minutos con TBS-T y se incubó durante 1 h con el anticuerpo conjugado a HorseRadish Peroxidase (HRP) de cabra anti inmunoglobulinas de ratón (Santa Cruz Biotechnology, inc.) y anti inmunoglobulinas de conejo (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), respectivamente, ambas a una dilución de 1:500 en TBS-T. Finalizada la incubación, la membrana se lavó 7 veces por 5 minutos y se reveló con el reactivo quimioluminiscente *Pierce® ECL Western Blotting Substrate* (Thermo Scientific). El análisis densitométrico de las bandas se realizó con el programa ImageJ versión 1.42.

4.7 Inmunohistoquímica

Las muestras para los estudios de Inmunohistoquímica de tejido gástrico se fijaron en formalina neutralizada por 24 h y luego se deshidrataron en gradiente ascendente de etanol 70, 95 y 100 %, aclaradas en Xilol (TCL-Chile) y se embebieron en parafina líquida (Paraplast®) en autotécnico automático (Leica). Las muestras utilizadas fueron obtenidas en pabellón del Hospital del Salvador y el Hospital Clínico de la Universidad de Chile (HCUCH). Las inclusiones de tejido en parafina se cortaron en micrótopo de rotación RM2125 (Leica-Alemania) del servicio de Anatomía Patológica del HCUCH. Cortes de 4 µm se montaron en portaobjetos silanizados, luego se colocaron en xilol por 2 veces, 15 minutos cada uno. Se rehidrataron las muestras en escala descendente de etanol hasta agua destilada (100% →95% →70% →Agua), 5 minutos en cada alcohol y 2 veces en agua, 5 minutos cada vez.

Se realizó la exposición de antígeno con tampón citrato (10mM, pH 6,0) de la siguiente manera: se hirieron la muestras en microondas a potencia 40% (100 Watts, potencia microondas), deteniendo inmediatamente al comenzar a ebulir el tampón, luego de esto se mantuvo por 20 minutos en potencia 10%. Se enfrió a temperatura ambiente

alrededor de 30 minutos y luego se enjuagó con agua destilada y se bloqueó la actividad de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 0,3% durante 30 minutos. Después de lavar 3 veces por 5 minutos cada vez con TBS 1X, los cortes se incubaron en TBS-BSA 1% por 45 minutos en cámara húmeda. Sin lavar, para no sacudir los cortes, se incubó toda la noche con anticuerpo primario monoclonal de ratón anti c-erbB-2 humano (Invitrogen) a una concentración de 2 µg/ml, recomendada por el fabricante, el anticuerpo fue diluido en tampón de bloqueo TBS-BSA al 1%. Se lavó tres veces en TBS, 10 minutos cada vez y se incubó con anticuerpo secundario de Vectastin® Elite® ABC Peroxidase Kit (Vector Laboratories), a una dilución 1:50, durante 45 minutos en cámara húmeda. Se lavó 3 veces con TBS, 5 minutos por vez y luego se colocó la solución ABC (Avidin-Biotin-Complex) a cada corte y se dejó incubar 30 minutos, se lavó 3 veces con TBS por 5 minutos cada vez. Se incubó luego por 6-10 minutos con peróxido de hidrógeno al 3% en 3,3'-diaminobenzidina tetraclorhidrato (DAB), luego de esto se lavaron suavemente los cortes con agua desionizada y se tiñeron con hematoxilina que tiñe compuestos aniónicos (ácidos) de los tejidos, tiñendo fuertemente de color violeta los núcleos de las células. Se lavó en agua rápidamente (evitando que las muestras se pongan azules) para luego deshidratar las muestras ascendentemente en alcoholes 5 minutos en cada uno y 15 minutos en xilol (lavado agua → 70% → 95% → 100% → Xilol). Se colocó 1 gota de líquido sellante entre el portaobjeto y cubreobjetos. Los preparados histológicos fueron fotografiados con la cámara CANON®, modelo Power Shot S500 ELPH, 3X, 5.0 Megapíxeles.

4.8 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico y el diseño de los gráficos se usó el programa GraphPad Prism (GraphPad Prism® Software Inc.), utilizando el test de ANOVA de dos cola

acoplado al test de comparación múltiple de Bonferroni. Los gráficos de barras son presentados como la media \pm la desviación estándar de cada determinación.

5 RESULTADOS

5.1 Diseño de partidores específicos para erbB1, 2, 3 y 4

Para el diseño de partidores específicos para cada erbB, considerando que la identidad de las secuencias nucleotídicas de estos 4 receptores es de alrededor de un 50% (Tabla I), se diseñó una estrategia que consistió en analizar las cuatro secuencias nucleotídicas mediante alineamiento múltiple en el programa ClustalW2, con el fin de encontrar puntos del alineamiento en que las 4 bases nucleotídicas de las secuencias fuesen distintas. Estos puntos fueron denominados *hot spots* (Figura 4).

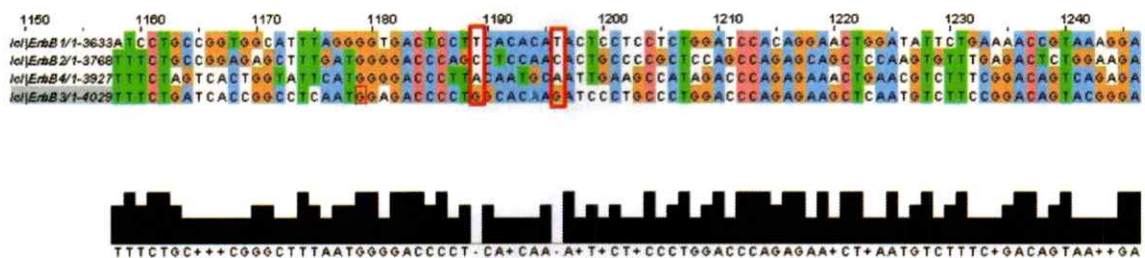


Figura 4. Alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas de los receptores erbB1, erbB2, erbB3 y erbB4. La figura muestra una considerable identidad entre las 4 secuencias de mRNA de los receptores. Los rectángulos rojos señalan los puntos denominados *hot spots*, donde los 4 nucleótidos son completamente distintos.

Durante este análisis se encontraron un gran número de *hot spots*. La idea de estos *hot spots* son usarlos de puntos de anclaje para el extremo 3' tanto de los partidores directos como reversos para cada receptor (Figura 5). Con esto se buscó lograr una mayor especificidad para la amplificación. Como es sabido, para que ocurra amplificación de los partidores, es necesario que el extremo 3' esté unido a una base nucleotídica en el DNA templado.

Secuencia	Largo (nt)	Secuencia	Largo (nt)	% Identidad
erbB1	3633	erbB2	3768	50
erbB1	3633	erbB3	4029	46
erbB1	3633	erbB4	3927	49
erbB2	3768	erbB3	4029	45
erbB2	3768	erbB4	3927	47
erbB3	4029	erbB4	3927	46

Tabla I. Identidad comparativa entre las secuencias nucleotídicas de los receptores erbB. Estos resultados muestran una identidad alrededor de un 50% entre todas las secuencias. Estos datos fueron obtenidos al alinear las secuencias de los genes obtenidas en la NCBI (National Center for Biotechnology Investigation), analizadas en ClustalW2.

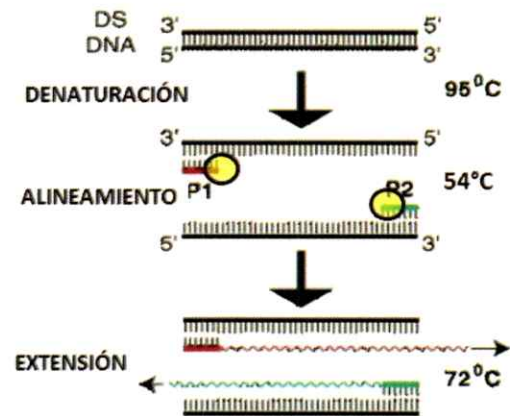


Figura 5. Anclaje de extremo 3' de los partidores. En la figura se muestra en círculo amarillo el extremo 3' del partidor (P1 y P2) tanto directo como reverso, extremo clave para la amplificación específica de cada receptor.

Una vez encontrados todos los *hot spots*, se buscaron las parejas que generaran los pares de partidores que presentaran la menor o nula cantidad de estructuras secundarias, dímeros de partidores y ausencia de reacciones cruzadas, como se explicará más adelante. El tamaño del amplicón se acotó entre 300 y 500 pb, para así tener un set de partidores para un posible uso en PCR cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR).

Las propiedades de los partidores fueron analizadas con el programa OligoExplorer 1.2. Los amplicones obtenidos *in silico* fueron: erbB1 (356 pb), erbB2 (353 pb), erbB3 (355 pb) y erbB4 (421 pb). Luego de diseñar los partidores, se buscó algún polimorfismo que pudiese afectar el anclaje estratégico de los partidores en el extremo 3'. Esta búsqueda se realizó en la base de datos SNP del NCBI (*Single Nucleotide Polymorphism*). No se encontraron polimorfismos que interfieran en el anclaje de los

partidores en el extremo 3', pero sí polimorfismos dentro del amplicón, los cuales no afectarían en medida alguna el tamaño final del mismo (Figura 6).

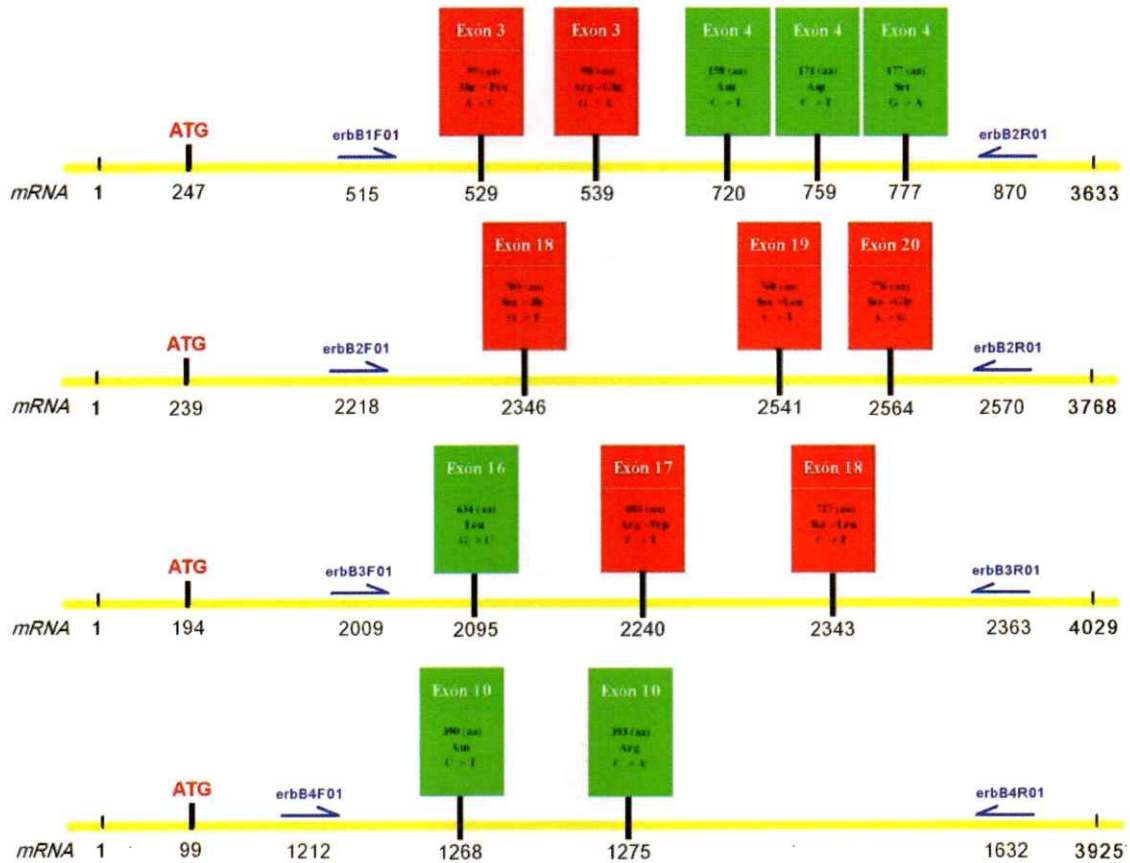


Figura 6. Análisis de polimorfismos en las secuencias nucleotídicas de los receptores erbB. La figura muestra una serie de polimorfismos encontrados dentro del área flanqueada por el par de partidores en cada secuencia. Como indica la figura, no se encontraron polimorfismos en los nucleótidos con los cuales alinean los partidores (flechas azules). En cuadros rojos se indican polimorfismos de tipo *missense* (donde el cambio de un nucleótido genera un cambio de aminoácido), en cuadros verdes se muestran los polimorfismos de tipo *synonymous* (donde el cambio de un nucleótido genera el mismo aminoácido según el triplete), las flechas azules indican los partidores directos (erbBxF) y partidores reversos (erbBxR) y su posición dentro de la secuencia nucleotídica (línea amarilla).

5.2 Perfiles de expresión específico para erbB a partir de líneas celulares

Se extrajeron los RNA totales para cada línea celular, según lo descrito en materiales y métodos (Sección 4.4.1.1). El resultado de esta extracción se evaluó mediante cuantificación en espectrofotómetro y electroforesis en geles de agarosa. En cada extracción de RNA, a partir de las líneas celulares, se procuró obtener una relación de absorbancia de 260/280 nm mayor a 1.7, además de observar las bandas de 28S y 18S (28S aproximadamente el doble de la 18S con respecto a intensidad) en geles de agarosa, ya que estos corresponderían a los parámetros de calidad esperados (Figura 7).

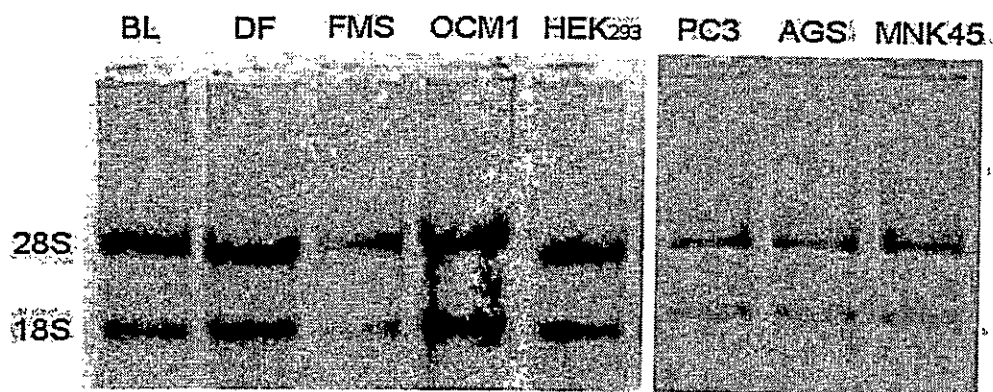


Figura 7. Electroforesis en geles de agarosa de RNA total de distintas líneas celulares. Para cada línea celular se aprecian las dos bandas de rRNA de 28 y 18S. BL a HEK₂₉₃ se cargaron 3µg y de PC3 a MNK45 se cargó 1µg de RNA. Gel de agarosa al 1,5%

A partir del RNA extraído, se realizó la síntesis de cDNA según lo descrito en Materiales y Métodos (Sección 4.4.2).

5.2.1 Estandarización del uso de los partidores erbB

Con el fin de estandarizar el RT-PCR, se utilizaron células HEK293, ya que son de origen embrionarias, y como es sabido, los receptores erbB juegan un rol importante tanto en proliferación como diferenciación celular.

La temperatura de alineamiento teórica arrojada por el programa OligoExplorer 1.2 para los cuatro pares de partidores fue de alrededor de 57° C. Para determinar la temperatura de alineamiento experimental, se generó un PCR en el cual se hizo un barrido de temperaturas de alineamiento desde 50-60° C. En la figura 8, podemos observar la amplificación de DNA de erbB1,2 y 3 a las temperaturas de alineamiento analizadas. Si bien se observa una mayor amplificación de DNA de erbB3 a 50°C, se generó otro experimento de igual característica, pero acotado entre la temperatura mayor donde se obtuvieron amplificado positivo y la siguiente menor (52-56° C), para así aumentar la especificidad. Luego de este experimento, se determinó la temperatura de alineamiento experimental a 54° C.

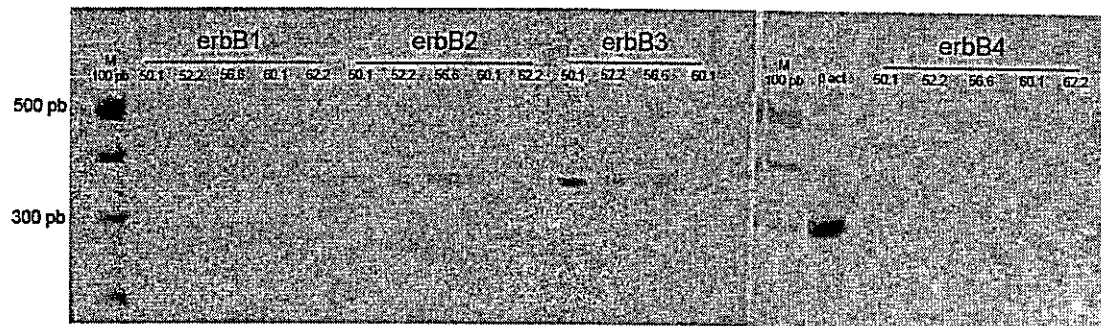


Figura 8 Gradiente de temperatura de alineamiento de los partidores erbB en células HEK₂₉₃. La figura muestra amplicones a cada temperatura de alineamiento por carril, para los distintos receptores (erbB1-4). Para erbB1-3 se observa los amplicones de alrededor de 350 pb y para erbB4 superior a 400 pb correspondiente con el tamaño teórico de 421 pb. Además se agregó un control positivo de amplificación, gen constitutivo β -actina (carril β -act), banda de alrededor de 300 pb. M indica el marcador molecular de 100 pb, donde se indican dos bandas características de 500 pb y 300 pb.

Con el fin de verificar que los amplicones que se detectan, en los geles de agarosa, sean específicos para cada receptor erbB producto de cada partidor, se determinó que no existieran reacciones cruzadas entre los partidores. Para esto, se realizaron todas las combinatorias de partidores directos y reversos (Figura 9), encontrando que los productos de PCR obtenidos eran específicos a los pares de partidores esperados, sin generar productos inespecíficos que pudieran interferir en la interpretación de posteriores resultados. Más aún, se confirmó que cada banda en el gel pertenece al amplicón en estudio y no al resultado de un partidor directo propio y un reverso de otro receptor.

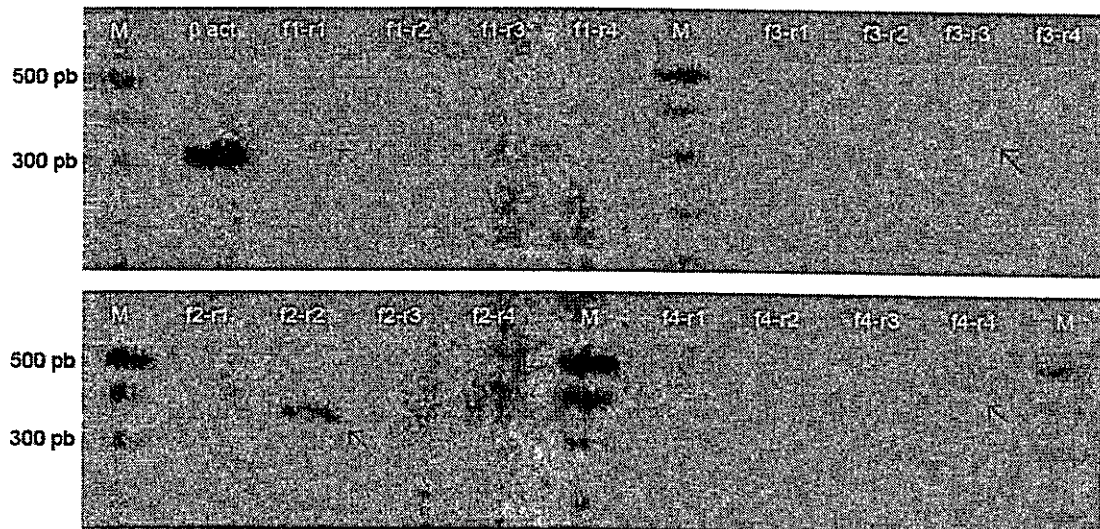


Figura 9. Ensayo de reacciones cruzadas para los partidores erbB en células HEK₂₉₃. Gel de agarosa con el amplificado por RT-PCR utilizando combinatoria de los distintos partidores. Cada carril muestra una combinatoria posible entre un partidor directo (f) y un partidor reverso (r), el número que acompaña a la letra es a que receptor erbB corresponde (1-4). Se observan amplicones (flechas) en los carriles que se aparearon el partidor directo y reverso correspondiente (f1-r1:356, f2-r2: 353, f3-r3: 355 y f4-r4: 421 pb). M, marcador molecular de 100 pb y β-act, control positivo de amplificación (300 pb).

5.2.2 Perfiles de expresión de los receptores erbB en células de melanoma maligno, cáncer de próstata y cáncer gástrico

Con el fin de analizar la expresión de transcritos de erbB y el perfil de expresión de estas moléculas, se realizó RT-PCR. Se establecieron perfiles de expresión, considerando presencia o ausencia de amplicones en geles de agarosa para distintas líneas celulares de melanoma maligno (BL, DF, FMS y OCM1), cáncer de próstata (PC3), cáncer gástrico (AGS y MNK45) y HEK₂₉₃. Los resultados indican que esta técnica es capaz de arrojar perfiles de expresión diferenciales, dependiendo de cada línea celular, demostrando en una primera instancia una cierta sensibilidad en la estrategia (Figura 10).

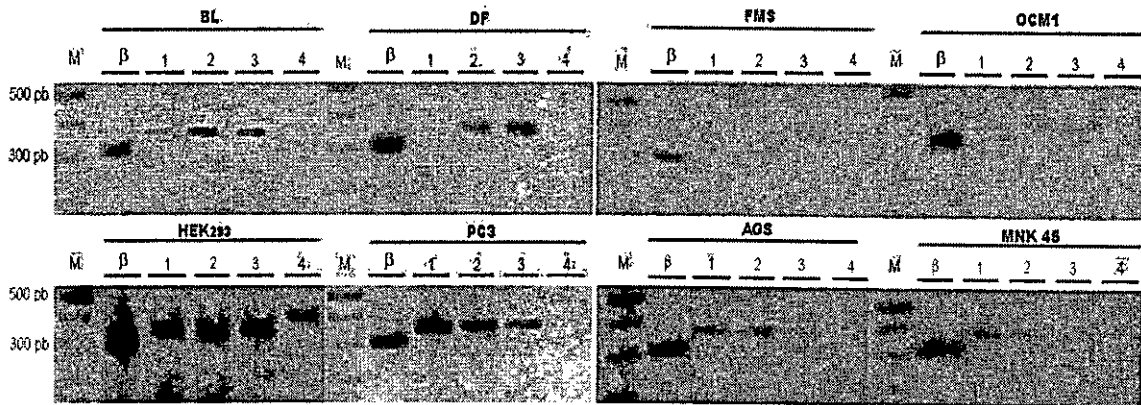


Figura 10. Perfiles de expresión de erbB1-4 en distintas líneas celulares. RT-PCR generado a partir de RNA total, de líneas celulares de melanoma maligno (BL, DF, FMS y OCM1), cáncer de próstata (PC3) y cáncer gástrico (AGS y MNK45). M, marcador molecular de 100 pb y β , control positivo de amplificación (300 pb). Se cargaron 10 μ l en cada carril obtenido de los productos de PCR. Gel de agarosa al 1,5%

Los perfiles observados en las líneas celulares de cáncer gástrico podrían sugerir los resultados que se obtendrían en las muestra de tejido gástrico de pacientes con cáncer gástrico. Estudios previos indican que, en cáncer gástrico, existe una sobre expresión

de erbB2 y erbB3 (Zhang, Yang et al. 2009), lo que se ha observado mediante técnicas cuantitativas como PCR en tiempo real (qRT-PCR) o hibridación fluorescente *in situ* (FISH). Hasta el momento, en esta investigación se ha evaluado de forma cualitativa la presencia o ausencia de los receptores erbB.

5.3 Perfiles de expresión (RT-PCR) específico para erbB a partir de mucosa gástrica de pacientes con cáncer gástrico

Con el fin de analizar la expresión de transcritos en células de tejidos primero se estandarizó un RT-PCR semicuantitativo. El RNA total se extrajo de cada muestra de paciente mediante un kit de extracción de RNA *RNeasy Mini Kit* (Quiagen) como se indicó en Materiales y Métodos (Sección 4.4.1.2). La muestra de tejido fue obtenida en cirugía al momento en que se realizó cada gastrectomía, y luego se almacenó el tejido en un estabilizador *RNAlater® Stabilization Reagent* (Quiagen), para posterior traslado y procesamiento de la muestra (Figura 11).

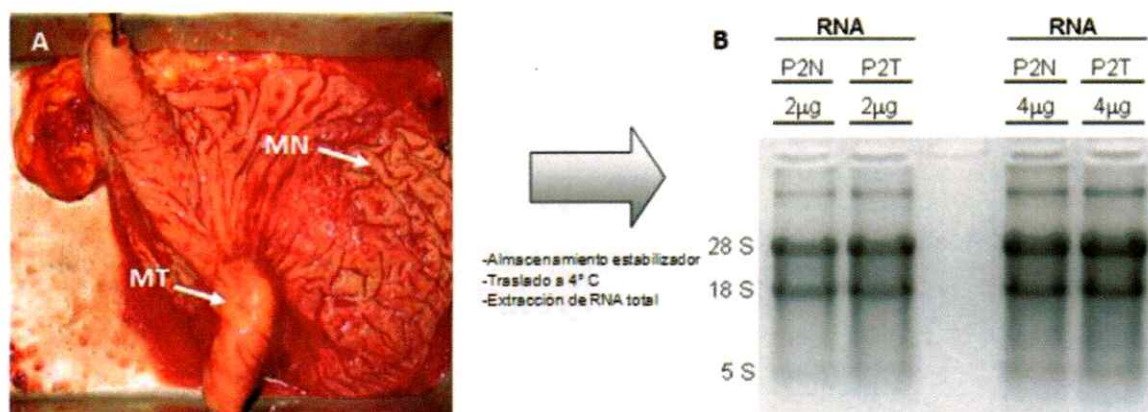


Figura 11. Obtención de muestras de mucosa gástrica y extracción de RNA total. A) interior de estómago, abierto por curvatura mayor después de gastrectomía. MT, muestra tumoral y MN, muestra normal. **B)** Electroforesis en gel de agarosa de RNA obtenido del paciente numero 2 (P2), tanto tejido normal (N) como tumoral (T).

Para estandarizar el RT-PCR, se seleccionó un número de ciclos de PCR en el cual el número de copias no se saturara, considerando la sensibilidad de la técnica PCR y su método de visualización, mediante geles de agarosa (Figura 12). Se estandarizó con cDNA obtenido a partir de las muestras de tejido gástrico, donde el número de ciclos fue establecido en 28 (Figura 13), que es cuando aún se mantiene la gráfica en su fase exponencial, mediante un PCR para erbB2 y erbB3, normalizado con un gen de expresión constitutiva, como β -actina.

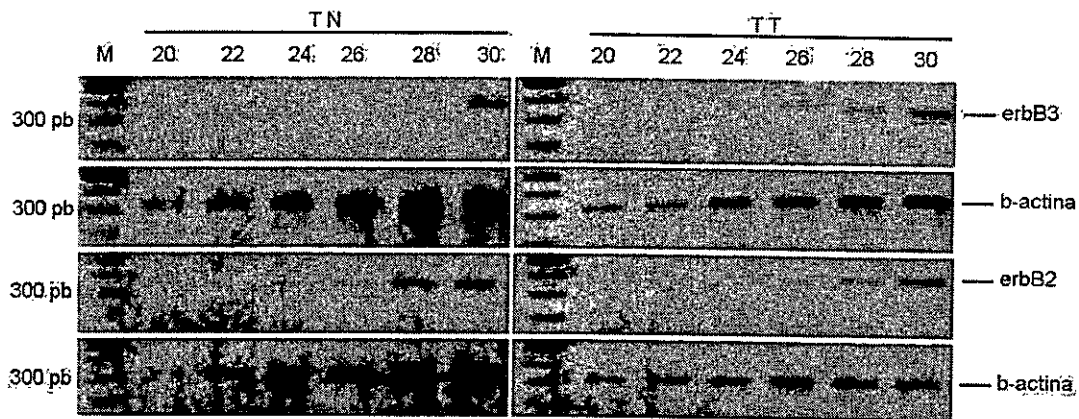


Figura 12 PCR semi cuantitativo para erbB2 y 3, normalizado con β -actina. Gel de agarosa 1,5% con amplificado de erbB2 y erbB3 y b-actina correspondiente a diferentes número de ciclos de PCR (indicados sobre cada carril). El análisis se hizo en tejido normal (TN) y tejido tumoral (TT) de un paciente en estudio. M, marcador molecular de peso 100 pb. Se cargaron 10 μ l de producto de PCR.

Para este ensayo, se eligió erbB2 y erbB3, debido a que en estudios previos se ha señalado que estos dos receptores presentan una sobre expresión de alrededor de un 26% en cáncer gástrico, variando según el tipo de cáncer (Zhang, Yang et al. 2009)

Para cuantificar los resultados de la figura 12, se realizó un análisis densitométrico como se señaló en materiales y métodos. Este análisis entregó una curva de saturación de productos de PCR a distintos números de ciclos, lo que permitió elegir el

número de ciclos antes de lograr la saturación de productos de amplificación (Figura 13), estableciendo que el número óptimo de ciclos es 28, número de ciclos utilizado a lo largo de esta investigación.

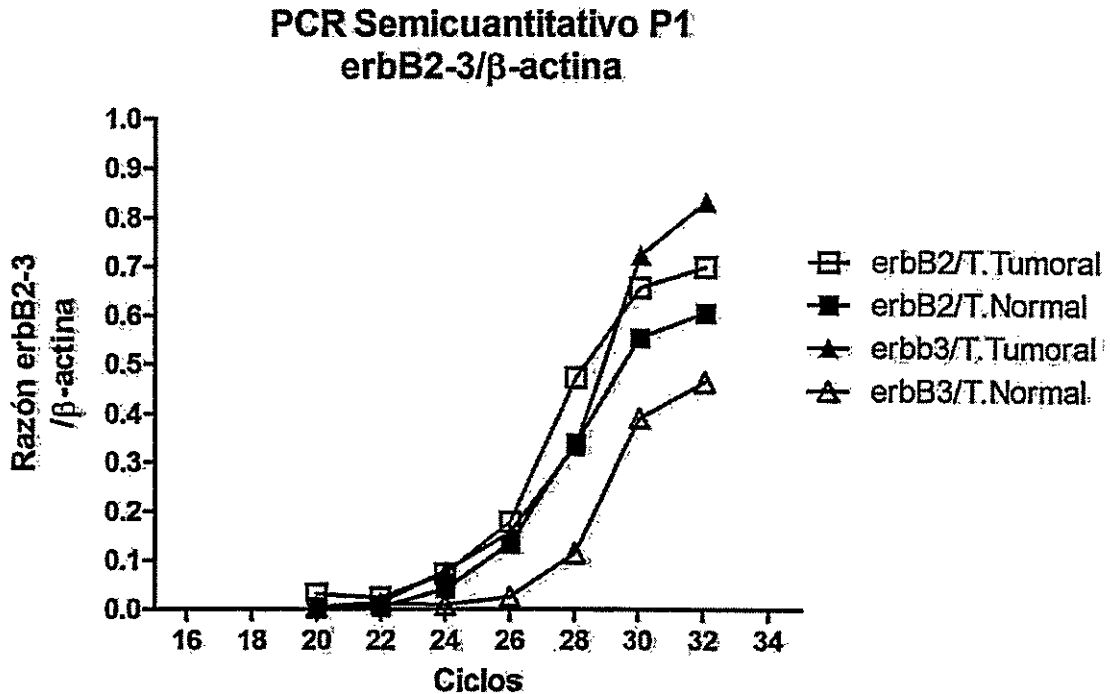


Figura 13 PCR semi cuantitativo para erbB2 y 3 a partir de tejido gástrico. Gráfico de la razón de los valores de densitometría, obtenido a partir de los geles de agarosa al 1,5% del amplificado por PCR, de las muestras para erbB2 y erbB3 y gen constitutivo de β -actina, tanto para muestra de tejido tumoral como normal.

El patrón de expresión de los receptores erbB en pacientes con cáncer gástrico y sometido a gastrectomía fue determinado al analizar muestras tanto de tejido normal como tejido tumoral del mismo paciente, para poder generar una comparación en sus niveles de expresión. El muestreo fue de 10 pacientes sometidos a gastrectomía y 3 pacientes sometidos a manga gástrica o *bypass* gástrico (operaciones bariátricas) sin presencia de cáncer gástrico. En la figura 14 se muestra un resultado representativo de

10 muestras analizadas, mientras que en la figura 15 se grafica la cuantificación de estos resultados en unidades arbitrarias relacionadas con la intensidad de cada banda. Se aprecia una diferencia en el patrón de expresión entre el tejido normal y el tejido tumoral, evidenciando bandas muy intensas para erbB2 y erbB3 en la muestra tumoral, para erbB4 en general no se observó expresión.

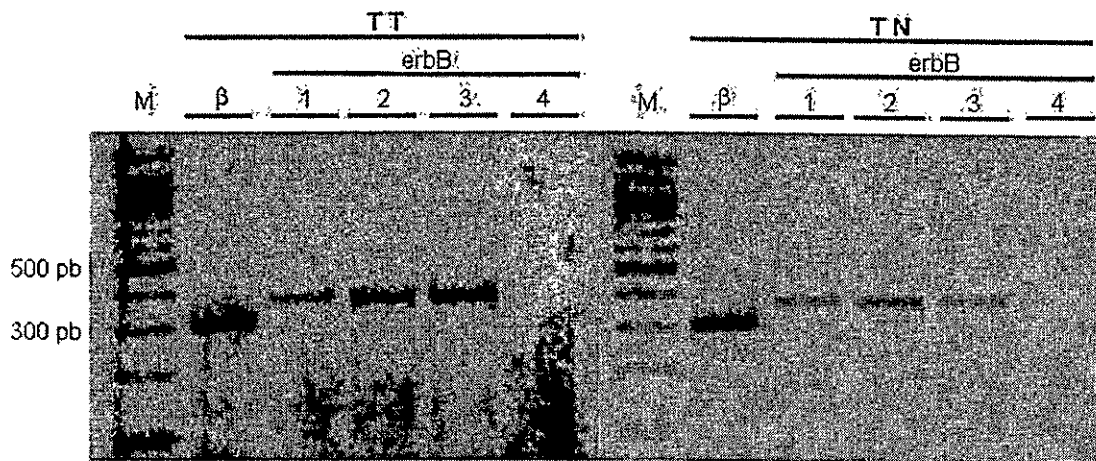


Figura 14. Perfil de expresión representativo para erbB1, 2, 3 y 4 a partir de muestras de tejido gástrico de pacientes con cáncer gástrico. Gel de agarosa al 1,5% con DNA amplificado por PCR, utilizando 28 ciclos, tanto para tejido tumoral (TT) como normal (TN). Se observan bandas de alrededor 350 pb en erbB1, 2 y 3 tanto en TT y TN. M, marcador molecular de 100 pb y β , control positivo de amplificación (300 pb).

Debido a que los resultados obtenidos hasta este punto solo demuestran presencia o ausencia de los receptores, se cuantificó la intensidad de cada banda obtenida en los geles de agarosa para cada muestra de paciente analizada. Con esto se generaron los patrones de expresión semi cuantitativos (Figura 15) para el muestreo de 10 pacientes.

Como controles negativos de la expresión de erbB en tejidos gástricos extraídos quirúrgicamente, se analizaron 3 muestras de pacientes que no tenían cáncer pero que se sometieron a cirugía bariátrica, donde no se observó presencia de los receptores erbB1, 2, 3 y 4 (Figura 16).

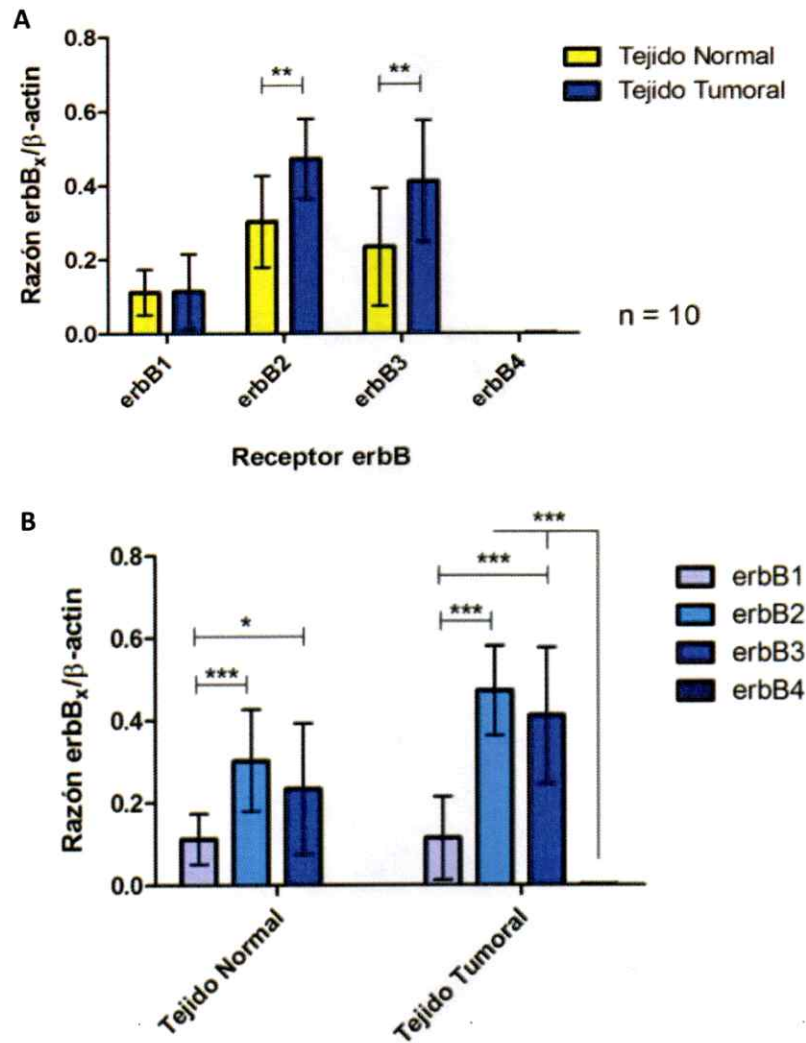


Figura 15 Perfil de expresión de los receptores erbB en 10 pacientes con cáncer gástrico. Estos resultados fueron obtenidos midiendo la densidad óptica de cada banda analizada, luego se normalizó con respecto a el control de expresión de β -actina. **A)** Se comparó cada receptor erbB normalizado en dos condiciones: tejido normal y tumoral. **B)** Expresión normalizada de los receptores erbB comparada entre ellos en tejido normal y tumoral. Gráfico en base a 10 experimentos independientes. Los valores están expresados en promedio \pm desviación estandar, $*=p<0,05$, $**=p<0,01$ y $***=p<0,001$, ANOVA de dos colas acoplado al test de comparación múltiple de Bonferroni.

El análisis de los resultados muestran que los receptores que se expresan en mayor cantidad en tejido tumoral son los receptores erbB2 y erbB3, ya que presentan una diferencia estadísticamente significativa entre tejido normal y tumoral (Figura 15 A). ErbB2 tanto en tejido normal como tumoral muestra los niveles más altos de expresión,

comparándose con los niveles de los demás erbB. Los niveles de expresión de erbB1 en ambos tipos de tejido son iguales, asumiendo una expresión basal de erbB1, mientras que solo en un paciente se registró una banda para erbB4, siendo de muy baja intensidad (Figura 15 B).

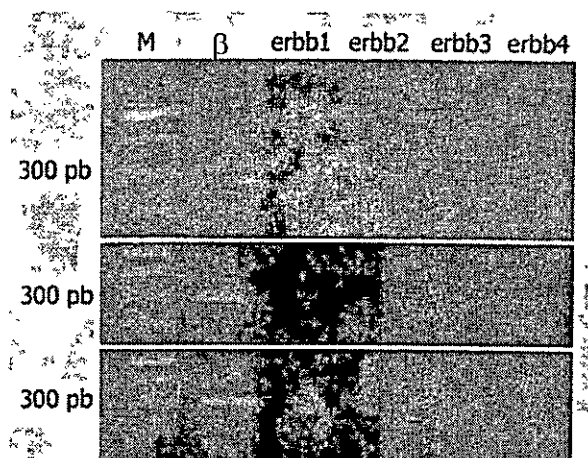


Figura 16. Expresión de los receptores erbB en mucosa gástrica de pacientes sometidos a operaciones bariátricas. Electroforesis en gel de agarosa, donde no se aprecia amplicones para ningún receptor erbB. M, marcador molecular de 100 pb y β , control positivo de amplificación (300 pb). Gel de agarosa al 1,5%

5.4 Expresión proteica de erbB2 a partir de extractos proteicos de mucosa gástrica de pacientes con cáncer gástrico

Considerando que los niveles de mRNA no siempre se correlacionan con los niveles de proteínas, se extrajeron las proteínas totales a partir de las muestras de tejido gástrico de pacientes con cáncer gástrico como se señaló en la sección de materiales y métodos. Se analizaron tres muestras de pacientes a los cuales también se les hizo RT-PCR.

Este experimento se diseñó para erbB2 (185 kDa), puesto que es la molécula de la cual se disponía de anticuerpos monoclonales dirigidos contra ella.

En la figura 17 se muestran los resultados obtenidos mediante la técnica de western blotting. En todas las muestras tumorales se aprecia una banda más intensa que en las muestras control (tejido normal), similar a los resultados obtenidos en RT-PCR, ya que en todas las muestras analizadas el nivel de proteína expresada fue mayor en la muestra de tejido tumoral que en la de tejido normal. En este experimento además se analizaron muestras de tejido gástrico de pacientes que se sometieron a operaciones bariátricas y células HEK₂₉₃ como control positivo. Se observó una banda débil para erbB2 en las tres muestras de operaciones bariátricas.

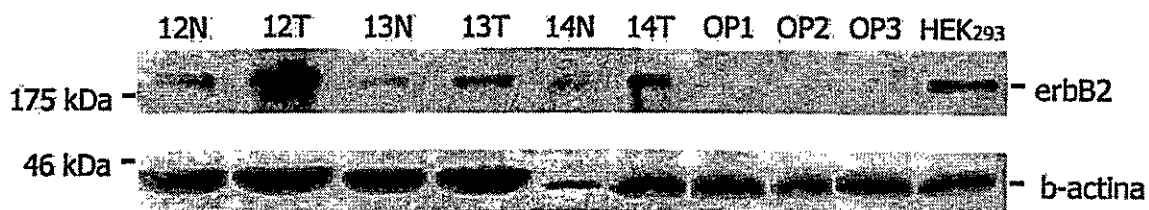


Figura 17. Expresión proteica del receptor erbB2 y β -actina en muestras de tejido gástrico y HEK₂₉₃. Western blotting con lisado celular de tejido normal (N) y tumoral (T) de paciente con cáncer gástrico (12 -14) y sometido a operación bariátrica (OP1-3) y células HEK₂₉₃, utilizadas como control positivo. La banda para erbB2 tiene un peso mayor que 175 kDa, coincidente con el peso teórico de erbB2 de 185 kDa. Como proteína control se usó actina que aparece con un peso inferior a 46 kDa, coincidente con el peso teórico de 42 kDa. En cada carril se cargaron 25 μ g de proteínas totales, el número indica el paciente y la letra N o T indica tejido normal y tumoral respectivamente, OP indica operación bariátrica y el número indica el paciente.

Al comparar los resultados obtenidos en los pacientes 12, 13 y 14 a nivel de mRNA y proteína mediante análisis densitométrico, se puede observar la misma tendencia de mayor expresión de erbB2 en la muestra tumoral que en la muestra normal. Más aún

sale a luz una relación estadísticamente idéntica entre ambas muestras (normal y tumoral), al normalizar erbB2 con β -actina como gen de expresión constitutiva (Figura 18).

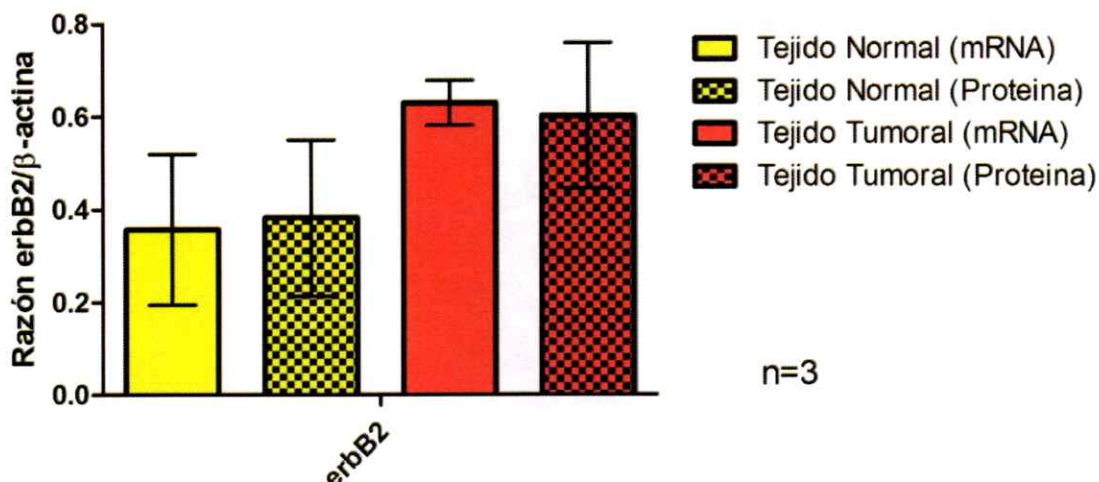


Figura 18. Perfil de expresión de mRNA y proteico para el receptor erbB2 en muestra de tejido gástrico a partir de pacientes con cáncer gástrico. Valores de densidad óptica de banda obtenida en gel de agarosa al 1,5% con cDNA e inmunowestern para erbB2 y normalizados con el control respectivo de expresión de β -actina. Se compararon los niveles de expresión para erbB2 en tejido normal y tumoral. Gráfico en base al promedio de tres experimentos independientes. Los valores están expresados en promedio \pm desviación estándar, test de ANOVA de una cola acoplado a test de comparación múltiple de Bonferroni.

Una vez determinada esta correlación entre mRNA y proteína, dentro de las muestras de tejido gástrico, se analizó la presencia de este receptor (erbB2) en la membrana de las células de mucosa gástrica, donde serían funcionales, por medio de la técnica de inmunohistoquímica. Aquí se observó una tinción color café de la peroxidasa alrededor de las células, variando en intensidad de color: mientras más oscura mayor cantidad de moléculas de erbB2 en la membrana celular. Los resultados mostraron, al igual que en los experimentos anteriores, una mayor presencia de erbB2 en los tejidos tumorales que en los tejidos normales (Figura 19).

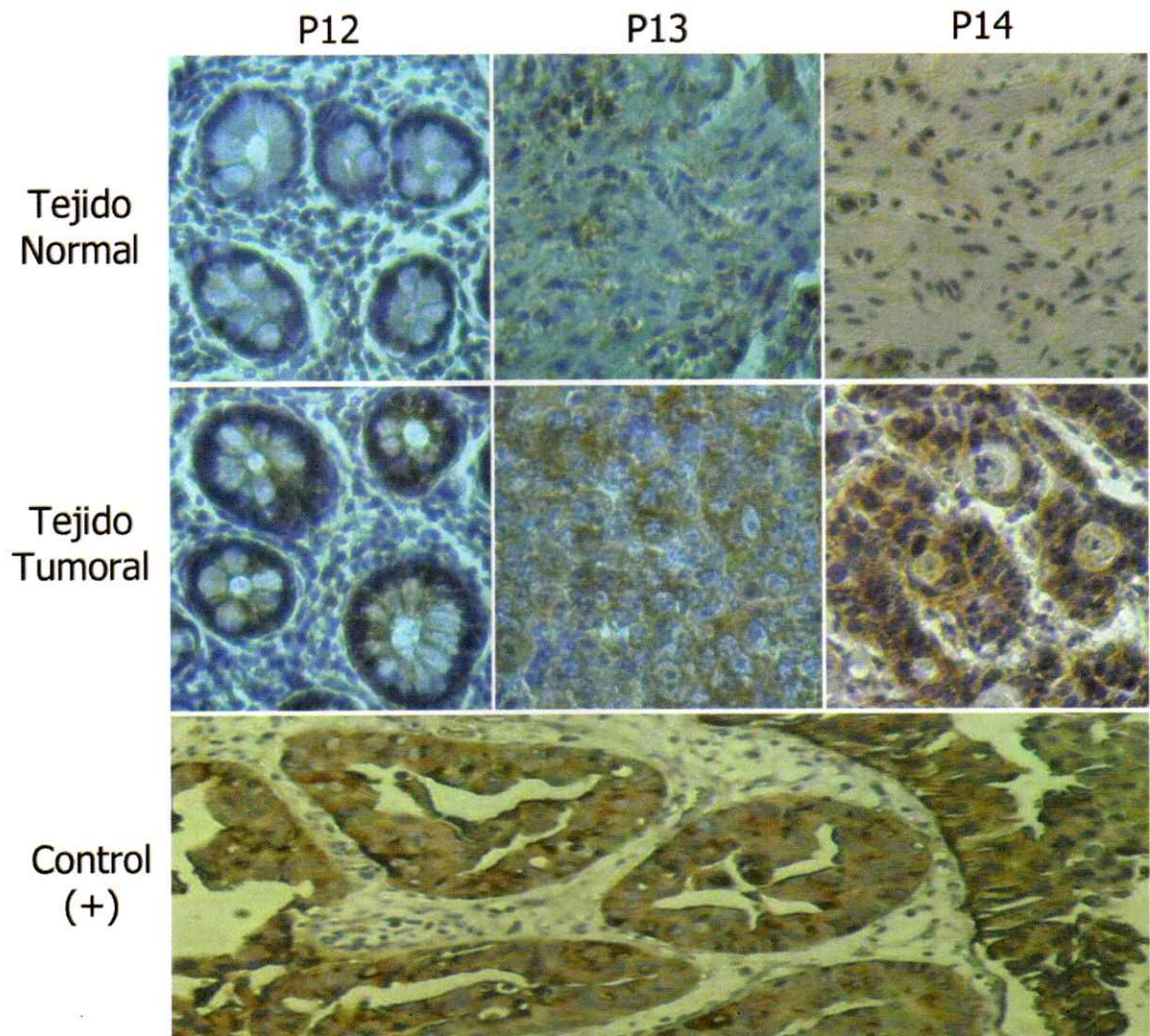


Figura 19. Expresión de la proteína erbB2 evaluada por inmunohistoquímica en tejido tumoral y normal de pacientes con cáncer gástrico. Tinción inmunohistoquímica, de membrana, para cada tipo de tejido en distintos pacientes (P12, P13 y P14). Se utilizó una muestra de cáncer de vesícula como control positivo (control (+)) de expresión de erbB2 en el experimento (donado gentilmente por la Dra. Paula Fluxá, el aumento utilizado fue de 400X, Laboratorio Inmunología Antitumoral, Universidad de Chile, Programa de Inmunología, Facultad de Medicina).

6 DISCUSIÓN

La familia erbB, formada por receptores tirosina quinasa, participa en una gran cantidad de cascadas de señales que colectivamente programan la transcripción y control de expresión de genes involucrados en la organogénesis, durante el desarrollo embrionario y mantención de tejido en estado adulto. Estos receptores se han encontrado frecuentemente sobre expresados o activados de forma aberrante en varios cánceres, lo que sugiere que la actividad de los receptores erbB debe ser muy bien regulada en el tejido sano. Las cascadas de señalización comandadas por los receptores erbB, cuando se encuentran sobre expresadas o mutadas, son capaces de promover procesos celulares que contribuyen a la iniciación de un cáncer o su progresión.

Dependiendo de la activación de ligandos específicos y la combinación de dímeros erbB, estos pueden estimular una gran variedad de vías de señalización celular que culminan en el núcleo para conducir programas de control transcripcional, controlando migración celular, sobrevivencia, adhesión, diferenciación y proliferación (Marmor, Skaria et al. 2004).

Dentro del área del cáncer existen principalmente tres puntos los cuales necesitan ser mejorados: diagnóstico, pronóstico y tratamiento en respectivo orden a realizar. En las últimas décadas se han realizado esfuerzos enormes para mejorar estos tres puntos, desde un punto de vista de la biología molecular, como por ejemplo generando árboles genealógicos para considerar componentes genéticos en la enfermedad, desarrollo de distintos medicamentos como anticuerpos que bloquean moléculas claves en la proliferación del cáncer o ciertos fármacos inhibidores de proteínas claves en el

desarrollo del cáncer. Estas se denominan blancos terapéuticos moleculares, lo que permite generar terapias dirigidas y específicas para cada paciente y por supuesto para cada cáncer (Arkenau 2009).

En este seminario, se desarrolló una caracterización de expresión de los receptores erbB en pacientes con cáncer gástrico mediante RT-PCR, técnica de menor costo y mayor rapidez que las validadas actualmente en cáncer de mamas y gástrico (Hofmann, Stoss et al. 2008), que son FISH e IHC. Para este fin, se extrajo RNA total de muestra de mucosa gástrica, por lo que se debió hacer ciertos cambios al protocolo que sugería el fabricante del kit de extracción, ya que el tejido gástrico obtenido estaba en un medio lejos de ser estéril o limpio, como lo es el estómago. Debido a esto, se modificaron ciertos pasos de lavados e incubaciones, los cuales mejoraron considerablemente el rendimiento de obtención de RNA. Estos pasos se convirtieron en pasos críticos en conjunto con la preservación del tejido para obtener altos rendimientos de RNA.

El diseño de partidores para amplificar los receptores erbB a partir de cDNA generado del RNA total extraído se hizo pensando en el alto porcentaje (50%) de identidad entre las cuatro secuencias de los genes erbB. El análisis de los polimorfismos en estas secuencias (Figura 6) fue preponderante, debido a que, si existiese un polimorfismo en el nucleótido de la secuencia de DNA templado, donde se uniría el extremo 3' del partidore que según diseño es altamente específico, no habría amplificación positiva para cada secuencia (Figura 5). Con esto, los partidores resultaron ser propios para cada receptor, además no generaron reacciones cruzadas entre sí (Figura 8), lo cual era altamente probable al considerar la alta identidad entre las secuencias. Todos los experimentos realizados para estos partidores nos dan pruebas de que contamos con

un método altamente sensible y específico para detectar la presencia de cualquiera de estos receptores erbB a partir de cDNA de cualquier muestra obtenida.

La obtención de perfiles de expresión diferenciales en distintas líneas celulares mediante esta estrategia, permitió validar de cierta manera la especificidad y sensibilidad de los partidores diseñados, ya que se obtuvieron distintos patrones de expresión para distintas líneas celulares (Figura 9).

Estudios anteriores muestran que los resultados obtenidos por qRT-PCR presentan una alta concordancia con respecto al método actual (FISH), al cuantificar sobre expresión de erbB2 en pacientes con cáncer gástrico, esta concordancia llega a un 97,6 % y 100% de sensibilidad (Kim, Jung et al. 2007). Considerando que un qRT-PCR aumenta considerablemente la sensibilidad con respecto a un RT-PCR, es un buen aporte utilizar esta estrategia como primera herramienta de búsqueda de estos receptores u otras moléculas en otros tipos de cánceres o enfermedades, para generar potenciales blancos terapéuticos moleculares.

Para generar perfiles de expresión a partir de muestras de tejido de pacientes con cáncer gástrico, se determinó el número de ciclos para el programa de PCR donde aún el número de copias del amplicón no se saturara. Esto se visualizó gracias a un PCR semi cuantitativo, normalizado por β -actina. Los genes utilizados para este ensayo fueron erbB2 y erbB3 ya que estudios recientes muestran que estos receptores se encuentran sobre expresados en un 18,6% y 13,7% respectivamente en muestras de tejido gástrico. Según el tipo de cáncer gástrico, encontramos que erbB2 y erbB3 se sobre expresan en 26,7% (Intestinal) y 26, 2% (Difuso) respectivamente (Zhang, Yang et al. 2009). Al hacer la estandarización en base a los genes que presentan más copias

en la muestra, se aseguró de elegir el número de ciclos donde se podrían ver diferencias entre estos receptores y los distintos pacientes, además de erbB1.

La obtención de los patrones de expresión de los receptores erbB en las muestras de los pacientes con cáncer gástrico demuestran que erbB2 y erbB3 son los que más se expresan en tejido tumoral (Figura 14), corroborando los resultados ya obtenidos por trabajos anteriores (Sithanandam and Anderson 2008; Marx, Tharun et al. 2009; Zhang, Yang et al. 2009).

Si bien no existen diferencias significativas entre la expresión de erbB2 y erbB3 en tejido tumoral, se observa un mayor nivel de expresión de erbB2, lo cual concuerda con lo visto anteriormente en la investigación, ya que el receptor erbB2 se sobre expresa en un alto porcentaje de cánceres y en especial cáncer gástrico.

Al observar los resultados que muestran una expresión de erbB1, 2 y 3 tanto en tejido normal como tumoral (Figura 14) llama la atención el resultado obtenido, cuestionando si la muestra de tejido sana es realmente sana. Es por eso que se analizaron tres muestras de tejido gástrico de pacientes sin cáncer sometidos a operaciones bariátrica, donde no se aprecian bandas o amplicones para ningún receptor erbB (Figura 15). Con lo anterior podemos inferir que los niveles de erbB1 observado en tejido normal y tumoral, que estadísticamente son iguales, corresponden a un nivel basal de expresión incrementado, con respecto al tejido gástrico no canceroso a partir de pacientes sometidos a operaciones bariátricas. Podemos suponer que erbB1 juega un rol en el cáncer gástrico pero no preponderante como erbB2 y erbB3 que su nivel se ve aumentado considerablemente con respecto a erbB1 en tejido normal y más aún en tejido tumoral. Es más, esta evidencia corrobora que erbB2 y erbB3 suelen formar

heterodimeros y generar una fuerte respuesta celular (Chausovsky, Tsarfaty et al. 1998). Lo anterior puede sugerir que el ambiente tumoral del estómago induce a la expresión de los receptores erbB en mayor medida que bajo condiciones normales.

En esta investigación solo se observó producto de PCR para erbB4 en un solo paciente con cáncer gástrico (muestra tumoral) y con una muy leve intensidad. No se observó tampoco amplicones en las muestras de tejido de operaciones bariátricas (tejido sano). Estos resultados coinciden con lo visto por Srinivasan y colaboradores (Srinivasan, Poulson et al. 1998), donde afirman que no encontraron expresión de mRNA de erbB4 en el tracto intestinal completo, a pesar de la presencia de niveles moderados de mRNA de α -actina, lo que sugiere un nivel extremadamente bajo de expresión en este tejido.

Al determinar la expresión proteica de erbB2, mediante la técnica western blotting, se determinó que, en los tres pacientes con cáncer gástrico, el nivel de erbB2 era mayor en el tejido tumoral que en el tejido normal (Figura 16). Esta misma tendencia se observó en estos pacientes a nivel de mRNA (Figura 17). Considerando las normalizaciones con actina tanto a nivel de mRNA como proteína, los niveles de erbB2 tanto en tejido normal como tumoral son estadísticamente iguales, como se aprecia en la figura 17, indicando que un muy alto porcentaje del mRNA es traducido a proteína en el tejido gástrico de pacientes con cáncer gástrico.

En el western blotting que se realizó para la detección de erbB2, también se analizaron muestras de proteínas a partir de tejido gástrico de pacientes sometido a operaciones bariátricas, donde se observa una banda muy débil para las tres muestras; en comparación al análisis de estas muestras a nivel de mRNA (Figura 15), donde no se

apreciaron amplicones. Esta diferencia puede deberse a que la cantidad de cDNA de los erbB obtenidos en la retro transcripción con la enzima transcriptasa reversa a partir de mRNA con partidores oligodT, en estados normales de tejido, es insuficiente para generar la cantidad de copias necesarias para poder visualizarlas por un gel de agarosa. En cambio, en el caso de las proteínas, es probable que la cantidad de proteína está cercana al límite de detección, aunque esta técnica tiene pasos en los cuales la revelación se puede magnificar, como, por ejemplo, manteniendo la placa más tiempo en la solución reveladora. Estas son variables que pudiesen magnificar la señal original.

Como es sabido, los receptores erbB son receptores tirosina quinasa ubicados en la membrana celular., Es ahí donde estos receptores son funcionales y cumplen los papeles ya mencionados dentro del cáncer y organogénesis. Una técnica para determinar específicamente la ubicación espacial de una proteína en un tejido o en una célula es la inmunohistoquímica, técnica llevada a cabo en este trabajo para visualizar erbB2 en tres muestras de tejido gástrico de pacientes con cáncer gástrico (Figura 18). Estas tres muestras fueron las mismas que se analizaron por western blotting, y mediante este método se observó una mayor expresión en la membrana de erbB2 (tinción café alrededor de la célula, Figura 18) en tejido tumoral que en tejido normal. Como se ha validado la forma de calificar las muestras de cáncer de mama para cáncer gástrico en inmunohistoquímica (Hofmann, Stoss et al. 2008), es posible calificar y dar un valor a cada inmunohistoquímica realizada. Sin embargo, para esta evaluación se requiere la interpretación de un patólogo experto en este tipo de tejido e inmunohistoquímica, lo cual en esta investigación no se consiguió.

7 CONCLUSIONES

- Se generó un perfil de expresión para los receptores erbB a partir de muestras de tejido de cáncer gástrico, mediante RT-PCR.
- Mediante el diseño específico de los partidores contra los receptores erbB, se generó una estrategia altamente sensible y capaz de generar patrones de expresión diferencial de mRNA dependiendo de la línea celular o muestra de tejido, ya que se apreciaron diferencias estadísticamente significativas entre un tipo de muestra y otro.
- Los niveles de expresión de erbB2 y erbB3 en las muestras de tejido tumoral son 1,5 y 1,7 veces mayor respectivamente, que en tejido normal, en pacientes con cáncer gástrico.
- No existe variación en los niveles de expresión de erbB1 entre las muestras de tejido normal y tumoral en pacientes con cáncer gástrico.
- En base a los resultados obtenidos a partir de las muestras de tejido gástrico de operaciones bariátricas, se formula que los niveles de expresión de erbB1, 2 y 3 en muestras de tejido normal podrían estar inducidos por el ambiente tumoral que se genera en el estómago, lo que podría resultar en un aumento en la secreción de los ligandos de los receptores erbB, así proliferando la expresión de estos mismos.
- Existe un aumento de la expresión del gen erbB2 al analizar el aumento de expresión tanto de mRNA y proteína en tejido tumoral con respecto al tejido normal.

8 REFERENCIAS

- Alimandi, M., A. Romano, et al. (1995). "Cooperative signaling of ErbB3 and ErbB2 in neoplastic transformation and human mammary carcinomas." Oncogene **10**(9): 1813-21.
- Allum, W. H. and J. W. Fielding (1990). "Gastric cancer: a 25-year review." Br J Surg **77**(3): 353.
- Arkenau, H. T. (2009). "Gastric cancer in the era of molecularly targeted agents: current drug development strategies." J Cancer Res Clin Oncol **135**(7): 855-66.
- Barber, M., R. C. Fitzgerald, et al. (2006). "Familial gastric cancer - aetiology and pathogenesis." Best Pract Res Clin Gastroenterol **20**(4): 721-34.
- Baselga, J. and S. M. Swain (2009). "Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3." Nat Rev Cancer **9**(7): 463-75.
- Becker, J. C., C. Muller-Tidow, et al. (2006). "Role of receptor tyrosine kinases in gastric cancer: new targets for a selective therapy." World J Gastroenterol **12**(21): 3297-305.
- Bernard, P. S. and C. T. Wittwer (2002). "Real-time PCR technology for cancer diagnostics." Clin Chem **48**(8): 1178-85.
- Burgess, A. W., H. S. Cho, et al. (2003). "An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors." Mol Cell **12**(3): 541-52.
- Cantley, L. C. (2002). "The phosphoinositide 3-kinase pathway." Science **296**(5573): 1655-7.
- Carraway, K. L., 3rd, J. L. Weber, et al. (1997). "Neuregulin-2, a new ligand of ErbB3/ErbB4-receptor tyrosine kinases." Nature **387**(6632): 512-6.
- Catalano, V., R. Labianca, et al. (2009). "Gastric cancer." Crit Rev Oncol Hematol **71**(2): 127-64.
- Citri, A. and Y. Yarden (2006). "EGF-ERBB signalling: towards the systems level." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(7): 505-16.
- Correa, P. (1992). "Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention." Cancer Res **52**(24): 6735-40.
- Csendes, A. (1991). "Adenocarcinoma of the stomach: a review of 35 years and 1,710 cases." World J Surg **15**(4): 558.
- Chang, H., D. J. Riese, 2nd, et al. (1997). "Ligands for ErbB-family receptors encoded by a neuregulin-like gene." Nature **387**(6632): 509-12.
- Chausovsky, A., I. Tsarfaty, et al. (1998). "Morphogenetic effects of neuregulin (neu differentiation factor) in cultured epithelial cells." Mol Biol Cell **9**(11): 3195-209.
- Cho, H. S., K. Mason, et al. (2003). "Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab." Nature **421**(6924): 756-60.
- Dhillon, P. K., D. C. Farrow, et al. (2001). "Family history of cancer and risk of esophageal and gastric cancers in the United States." Int J Cancer **93**(1): 148-52.
- Di Fiore, P. P., O. Segatto, et al. (1990). "The carboxy-terminal domains of erbB-2 and epidermal growth factor receptor exert different regulatory effects on intrinsic receptor tyrosine kinase function and transforming activity." Mol Cell Biol **10**(6): 2749-56.
- Fauquier, D., F. Gulland, et al. (2003). "Biliary adenocarcinoma in a stranded northern elephant seal (*Mirounga angustirostris*)." J Wildl Dis **39**(3): 723-6.
- Ferguson, K. M., M. B. Berger, et al. (2003). "EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization." Mol Cell **11**(2): 507-17.
- Fischbach, G. D. and K. M. Rosen (1997). "ARIA: a neuromuscular junction neuregulin." Annu Rev Neurosci **20**: 429-58.

- Frederick, L., X. Y. Wang, et al. (2000). "Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas." Cancer Res **60**(5): 1383-7.
- Garrett, T. P., N. M. McKern, et al. (2002). "Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha." Cell **110**(6): 763-73.
- Gassmann, M., F. Casagrande, et al. (1995). "Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor." Nature **378**(6555): 390-4.
- Goldberg, R. M. (2005). "Cetuximab." Nat Rev Drug Discov Suppl: S10-1.
- Goldstein, N. S. and K. J. Lewin (1997). "Gastric epithelial dysplasia and adenoma: historical review and histological criteria for grading." Hum Pathol **28**(2): 127-33.
- Gonzalez, C. A., G. Pera, et al. (2003). "Smoking and the risk of gastric cancer in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (EPIC)." Int J Cancer **107**(4): 629-34.
- Groner, B., C. Hartmann, et al. (2004). "Therapeutic antibodies." Curr Mol Med **4**(5): 539-47.
- Group, H. a. C. C. (2001). "Gastric cancer and Helicobacter pylori: a combined analysis of 12 case control studies nested within prospective cohorts." Gut **49**(3): 347-53.
- Gschwind, A., O. M. Fischer, et al. (2004). "The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy." Nat Rev Cancer **4**(5): 361-70.
- Hofmann, M., O. Stoss, et al. (2008). "Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study." Histopathology **52**(7): 797-805.
- Hsieh, A. C. and M. M. Moasser (2007). "Targeting HER proteins in cancer therapy and the role of the non-target HER3." Br J Cancer **97**(4): 453-7.
- Hynes, N. E., K. Horsch, et al. (2001). "The ErbB receptor tyrosine family as signal integrators." Endocr Relat Cancer **8**(3): 151-9.
- Hynes, N. E. and H. A. Lane (2005). "ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors." Nat Rev Cancer **5**(5): 341-54.
- Hynes, N. E. and D. F. Stern (1994). "The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer." Biochim Biophys Acta **1198**(2-3): 165-84.
- Janeway, C. A., Jr. (1989). "Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **54 Pt 1**: 1-13.
- Jemal, A., R. Siegel, et al. (2008). "Cancer statistics, 2008." CA Cancer J Clin **58**(2): 71-96.
- Jones, J. T., R. W. Akita, et al. (1999). "Binding specificities and affinities of egf domains for ErbB receptors." FEBS Lett **447**(2-3): 227-31.
- Jung, M. H., S. C. Kim, et al. (2000). "Identification of differentially expressed genes in normal and tumor human gastric tissue." Genomics **69**(3): 281-6.
- Karunakaran, D., E. Tzahar, et al. (1996). "ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer." EMBO J **15**(2): 254-64.
- Kim, M. A., E. J. Jung, et al. (2007). "Evaluation of HER-2 gene status in gastric carcinoma using immunohistochemistry, fluorescence in situ hybridization, and real-time quantitative polymerase chain reaction." Hum Pathol **38**(9): 1386-93.
- Kim, S. Y., H. P. Kim, et al. (2008). "Trastuzumab inhibits the growth of human gastric cancer cell lines with HER2 amplification synergistically with cisplatin." Int J Oncol **32**(1): 89-95.
- Kleinert, H., A. Pautz, et al. (2004). "Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase." Eur J Pharmacol **500**(1-3): 255-66.
- Kolonel, L. N., A. M. Nomura, et al. (1981). "Association of diet and place of birth with stomach cancer incidence in Hawaii Japanese and Caucasians." Am J Clin Nutr **34**(11): 2478-85.

- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
- Lee-Hoeflich, S. T., L. Crocker, et al. (2008). "A central role for HER3 in HER2-amplified breast cancer: implications for targeted therapy." Cancer Res **68**(14): 5878-87.
- Lee, J. W., Y. H. Soung, et al. (2005). "ERBB2 kinase domain mutation in a gastric cancer metastasis." APMIS **113**(10): 683-7.
- Lee, K. F., H. Simon, et al. (1995). "Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development." Nature **378**(6555): 394-8.
- Marmor, M. D., K. B. Skaria, et al. (2004). "Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors." Int J Radiat Oncol Biol Phys **58**(3): 903-13.
- Marmot, M. a. A., T. and Byers, T. and Chen, J. and Hirohata, T. and Jackson, A. and James, W.P.T. and Kolonel, L.N. and Kumanyika, S. and Leitzmann, C. and Mann, J. and Powers, H.J. and Reddy, K.S. and Riboli, E. and Rivera, J.A. and Schatzkin, A. and Seidell, J.C. and Shuker, D.E. and Uauy, R. and Willett, W. and Zeisel, S.H. (2007). Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective. Washington, American Institute for Cancer Research.
- Marx, A. H., L. Tharun, et al. (2009). "HER-2 amplification is highly homogenous in gastric cancer." Hum Pathol **40**(6): 769-77.
- Meyer, D. and C. Birchmeier (1995). "Multiple essential functions of neuregulin in development." Nature **378**(6555): 386-90.
- MINSAL (2007). "Mortalidad por causa 1990-2007." http://deis.minsal.cl/deis/ind_2007.asp.
- MINSAL (2009). "Guía Clínica, Cáncer Gástrico."
- Morandell, S., T. Stasyk, et al. (2008). "Quantitative proteomics and phosphoproteomics reveal novel insights into complexity and dynamics of the EGFR signaling network." Proteomics **8**(21): 4383-401.
- Naidu, R., M. Yadav, et al. (1998). "Expression of c-erbB3 protein in primary breast carcinomas." Br J Cancer **78**(10): 1385-90.
- Normanno, N., A. De Luca, et al. (1998). "Epidermal growth factor-related peptides as targets for experimental therapy of human colon carcinoma." Cancer Detect Prev **22**(1): 62-7.
- Ogiso, H., R. Ishitani, et al. (2002). "Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains." Cell **110**(6): 775-87.
- Olayioye, M. A., R. M. Neve, et al. (2000). "The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer." EMBO J **19**(13): 3159-67.
- Park, H. S., H. Y. Jung, et al. (2004). "Cutting edge: direct interaction of TLR4 with NAD(P)H oxidase 4 isozyme is essential for lipopolysaccharide-induced production of reactive oxygen species and activation of NF-kappa B." J Immunol **173**(6): 3589-93.
- Prenzel, N., E. Zwick, et al. (2000). "Tyrosine kinase signalling in breast cancer. Epidermal growth factor receptor: convergence point for signal integration and diversification." Breast Cancer Res **2**(3): 184-90.
- Rajcevic, U., R. Juvan, et al. (2001). "Assessment of differential expression of oncogenes in gastric adenocarcinoma by fluorescent multiplex RT-PCR assay." Pflugers Arch **442**(6 Suppl 1): R190-2.
- Rakoff-Nahoum, S. and R. Medzhitov (2009). "Toll-like receptors and cancer." Nat Rev Cancer **9**(1): 57-63.
- Richard N. Mitchell, V. K., Abul K. Abbas y Nelson Fausto (2007). COMPENDIO DE Robbins y Cotran Patología Estructural y Funcional. Madrid, España, Elsevier España, S.A.

- Riese, D. J., 2nd and D. F. Stern (1998). "Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network." Bioessays **20**(1): 41-8.
- Romond, E. H., E. A. Perez, et al. (2005). "Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer." N Engl J Med **353**(16): 1673-84.
- Rustgi (2007). Neoplasms of the stomach. Philadelphia, Saunders Elsevier.
- Salomon, D. S., R. Brandt, et al. (1995). "Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies." Crit Rev Oncol Hematol **19**(3): 183-232.
- Schmitz, K. R. and K. M. Ferguson (2009). "Interaction of antibodies with ErbB receptor extracellular regions." Exp Cell Res **315**(4): 659-70.
- Shawver, L. K., D. Slamon, et al. (2002). "Smart drugs: tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy." Cancer Cell **1**(2): 117-23.
- Shelly, M., R. Pinkas-Kramarski, et al. (1998). "Epiregulin is a potent pan-ErbB ligand that preferentially activates heterodimeric receptor complexes." J Biol Chem **273**(17): 10496-505.
- Shi, F., S. E. Telesco, et al. (2010). "ErbB3/HER3 intracellular domain is competent to bind ATP and catalyze autophosphorylation." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(17): 7692-7.
- Siegel, P. M., E. D. Ryan, et al. (1999). "Elevated expression of activated forms of Neu/ErbB-2 and ErbB-3 are involved in the induction of mammary tumors in transgenic mice: implications for human breast cancer." EMBO J **18**(8): 2149-64.
- Sithanandam, G. and L. M. Anderson (2008). "The ERBB3 receptor in cancer and cancer gene therapy." Cancer Gene Ther **15**(7): 413-48.
- Slamon, D. J., W. Godolphin, et al. (1989). "Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer." Science **244**(4905): 707-12.
- Slamon, D. J., B. Leyland-Jones, et al. (2001). "Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2." N Engl J Med **344**(11): 783-92.
- Srinivasan, R., R. Poulosom, et al. (1998). "Expression of the c-erbB-4/HER4 protein and mRNA in normal human fetal and adult tissues and in a survey of nine solid tumour types." J Pathol **185**(3): 236-45.
- Stemmermann, G. N. (1994). "Intestinal metaplasia of the stomach. A status report." Cancer **74**(2): 556-64.
- Stern, D. F. and M. P. Kamps (1988). "EGF-stimulated tyrosine phosphorylation of p185neu: a potential model for receptor interactions." EMBO J **7**(4): 995-1001.
- Taberero, J., T. Macarulla, et al. (2005). "Novel targeted therapies in the treatment of gastric and esophageal cancer." Ann Oncol **16**(11): 1740-8.
- Threadgill, D. W., A. A. Dlugosz, et al. (1995). "Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype." Science **269**(5221): 230-4.
- Tzahar, E., H. Waterman, et al. (1996). "A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor." Mol Cell Biol **16**(10): 5276-87.
- Verdecchia, A., I. Corazziari, et al. (2004). "Explaining gastric cancer survival differences among European countries." Int J Cancer **109**(5): 737-41.
- Verdecchia, A., A. Mariotto, et al. (2003). "Comparison of stomach cancer incidence and survival in four continents." Eur J Cancer **39**(11): 1603-9.
- Yarden, Y. and M. X. Sliwkowski (2001). "Untangling the ErbB signalling network." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(2): 127-37.

- Yasui, W., N. Oue, et al. (2005). "Molecular-pathological prognostic factors of gastric cancer: a review." Gastric Cancer **8**(2): 86-94.
- Zhang, X., J. Gureasko, et al. (2006). "An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor." Cell **125**(6): 1137-49.
- Zhang, X. L., Y. S. Yang, et al. (2009), "Comparative study on overexpression of HER2/neu and HER3 in gastric cancer." World J Surg **33**(10): 2112-8.