



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

División de Ciencias Biológicas y de la salud

POSGRADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**Detección de alteraciones del gen *HER2* en muestras de pacientes
con cáncer cervicouterino**

TESIS

**Que para obtener el grado de
Maestra en Biología Experimental**

PRESENTA

Biol. Exp. Norma Leticia Moreno Soriano

Co-directores:

Dr. Alfonso Dueñas González

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz

Asesores:

Dra. Lucía Guadalupe Taja Chayeb

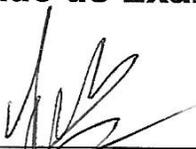
Correo electrónico. normabiology@gmail.com

El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020.

El presente trabajo se realizó gracias al apoyo proporcionado por CONACYT a través de la beca con número de registro 593001.

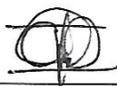
Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada “**Detección de alteraciones del gen *HER2* en muestras de pacientes con cáncer cervicouterino**”

Jurado de Examen



Presidente

Dr. Javier Esteban Jiménez Salazar
Departamento de Biología de la Reproducción
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



Secretaria

Dra. María Guadalupe Isabel Domínguez Gómez
Subdirección de Investigación Clínica
Instituto Nacional de Cancerología



Vocal

Dra. Alma Delia Chávez Blanco
Subdirección de Investigación Básica
Instituto Nacional de Cancerología

JOSÉ DE LA LUZ DÍAZ CH

Vocal

Dr. José De la Luz Díaz Chávez
Subdirección de Investigación Básica
Instituto Nacional de Cancerología

COMITÉ TUTORAL

CO-DIRECTOR

Dr. Alfonso Dueñas González

Laboratorio de Epigenética
Departamento de Investigación Básica
Instituto Nacional de Cancerología
alfonsoduenasg@yahoo.mx

CO-DIRECTOR

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz

Laboratorio de Fisiología Celular, S-351,
Departamento Ciencias de la Salud,
División Ciencias Biológicas y de la Salud,
Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa.
legq@xanum.uam.mx, gomezquiroz@gmail.com

ASESOR

Dra. Lucia Guadalupe Taja Chayeb

Laboratorio de Epigenética
Subdirección de Investigación Básica
Instituto Nacional de Cancerología
ltaja_chayeb@yahoo.com

Agradecimientos

Al posgrado en Biología Experimental por haberme dado la oportunidad de formar parte de esta nueva generación de investigadores en México.

A los Doctores Alfonso Dueñas y Luis Enrique Quiroz por dejarme formar parte de su equipo, por sus enseñanzas, consejos y por todo el apoyo que me brindaron a lo largo de esta etapa.

Al personal técnico y médico del Instituto Nacional de Cancerología por el apoyo que me brindaron en la realización de este proyecto.

A cada uno de los integrantes del jurado, Dr. Javier, Dra. Lupita, Dra. Alma, Dr. José y Dra. Caty por la confianza, comprensión y apoyo que me brindaron.

Dedicatorias

A mis padres por siempre impulsarme a seguir mis sueños, por la paciencia, amor y comprensión que siempre me han tenido. Por siempre apoyarme en cada una de las decisiones que he tomado y por que sin ellos yo no sería lo que soy en este momento.

LOS AMO.

A mis hermanos Paola y Juan, que siempre están en mi pensamiento, quiero agradecerles el apoyo que siempre me brindaron en los momentos difíciles, por el cariño y por todos los momentos maravillosos que hemos vivido juntos.

A mi querido Ivan porque desde un principio me ánimo a entrar a la Maestría, por el amor, paciencia, comprensión y apoyo que me ha brindado en esta etapa tan importante en mi vida. Te agradezco porque siempre has tenido palabras de aliento en los momentos difíciles y siempre me has impulsado a seguir adelante.

A mi querida Lucy que más que mi asesora se convirtió en una excelente amiga. Le agradezco todas sus enseñanzas, paciencia, apoyo y cariño que me ha brindado.

A mis compañeros de la Maestría por la convivencia y por la amistad que me brindaron, sobre todo a Carlos y Blanquita por su cariño y por los momentos agradables que hemos pasado.

A mis compañeros del laboratorio de Epigenética Mandy, Alex, Enrique, Marisol, Alma, Lupita, Harold, José, Caty y Lucy por su amistad, apoyo y consejos que me brindaron en estos años de convivencia.

Resumen

El cáncer cervicouterino es la cuarta causa de muerte de mujeres a nivel mundial y la segunda causa de muerte en México. Los tratamientos actuales como cirugía, radioterapia y quimioterapia para combatir esta enfermedad aún siguen siendo insuficientes, por lo que se realizan investigaciones en busca de nuevas dianas terapéuticas. Algunos de estos nuevos blancos terapéuticos están relacionados con el Receptor del Factor crecimiento Epidermico tipo 2 o HER2. Este receptor es el mejor caracterizado y está muy bien identificado en cáncer de mama y recientemente en neoplasias como cáncer gástrico.

HER2 es un receptor tirosina cinasa que puede formar heterodímeros con otros miembros de la familia de EGFR. La unión del ligando (EGF) a los receptores ERBB inducen la formación de homo-heterodímeros de receptores que a su vez inducen la activación del dominio cinasa intrínseca lo que resulta en la fosforilación de residuos de tirosina específicos, estos residuos fosforilados permiten el reclutamiento de proteínas que conducen a la activación de vías de señalización que están relacionadas con el crecimiento y la proliferación celular. Por lo que se han desarrollado diferentes fármacos que tienen la capacidad de inhibir la actividad de este receptor y así evitar la proliferación celular y la metástasis.

Las alteraciones más estudiadas de HER2 en el caso del cáncer cervicouterino son la hiper-expresión con o sin amplificación génica, en el presente trabajo se pudo determinar que de las cien pacientes elegidas para el estudio el 38% presenta algún nivel de hiper-expresión de HER2 ya fuera en citoplasma, membrana o núcleo. Así mismo se identificó que el 26.31% de las muestras analizadas fueron positivas para amplificación génica.

Por lo tanto, es posible que las alteraciones encontradas en cáncer cervicouterino tengan relación con la biología celular de esta patología.

Abstract

Cervical cancer is the fourth cause of death of women worldwide and the second cause of death in Mexico. Current treatments such as surgery, radiotherapy and chemotherapy to combat this disease are still insufficient, so research is being carried out in search of new therapeutic targets. Some of these new therapeutic targets are related to the Epidermic Growth Factor Receptor type 2 or HER2. This receptor is the best characterized and is very well identified in breast cancer and recently in neoplasms such as gastric cancer.

HER2 is a tyrosine kinase receptor that can form heterodimers with other members of the EGFR family. The binding of the ligand (EGF) to the ERBB receptors induces the formation of homo-heterodimers of receptors that in turn induce the activation of the intrinsic kinase domain which results in the phosphorylation of specific tyrosine residues, these phosphorylated residues allow the recruitment of proteins that lead to the activation of signaling pathways that are related to cell growth and proliferation. So different drugs have been developed that have the ability to inhibit the activity of this receptor and thus prevent cell proliferation and metastasis.

The most studied alterations of HER2 in the case of cervical cancer are hyper expression with or without gene amplification, in the present work it was possible to determine that of the hundred patients chosen for the study, 38% present some level of overexpression of HER2 and outside in cytoplasm, membrane or nucleus. Likewise, it was identified that 26.31% of the samples analyzed were positive for gene amplification.

Therefore, it is possible that the alterations found in cervical cancer are related to the cellular biology of this pathology.

ÍNDICE

Resumen.....	1
Abstract.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1 Epidemiología del cáncer.....	5
1.2 Etiología del cáncer.....	6
2. MARCO TEORICO.....	7
2.1 Familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico.....	7
2.2 Estructura.....	8
2.3 Cáncer y vías de señalización de ErbB.....	11
3. ANTECEDENTES.....	22
3.1 Mutaciones de HER2 en carcinoma cervicoterino.....	22
3.2 Expresión de HER2 en carcinoma cervicouterino.....	23
4. JUSTIFICACIÓN.....	24
5. HIPÓTESIS.....	25
6. OBJETIVO GENERAL.....	25
7. OBJETIVOS PARTICULARES.....	25
8. METODOLOGÍA.....	25
8.1 Inmunohistoquímica con HERCEP-TEST.....	26
8.2 Hibridación Fluorescente <i>in situ</i> (FISH).....	27
8.3 Análisis de mutaciones por secuenciación.....	28
8.3.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	29
8.3.2 Secuenciación.....	30
9. RESULTADOS.....	30
9.1 Evaluación de HER2 por Inmunohistoquímica.....	30
9.2 Evaluación de HER2 por Hibridación Fluorescente <i>in situ</i> (FISH).....	37
9.3 Análisis de mutaciones por secuenciación.....	40
10. DISCUSIÓN.....	45

11.	CONCLUSIONES.....	50
12.	PERSPECTIVAS.....	51
13.	BIBLIOGRAFÍA.....	52

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Epidemiología del cáncer

Se estima que a nivel mundial aproximadamente 32.6 millones de personas viven con algún tipo de cáncer (**Globocan, 2012**). En 2012, los tipos de cáncer diagnosticados con mayor frecuencia en mujeres fueron cáncer de mama, colon y recto, pulmón, cuello uterino y estómago (**Organización Mundial de la Salud, 2016**).

El cáncer cervicouterino es la cuarta causa de muerte en mujeres y ocupa el tercer lugar de frecuencia en el mundo con un estimado de 528 mil nuevos casos diagnosticados anualmente. En 2012 hubo 266 mil muertes por cáncer cervicouterino en todo el mundo, lo que representa el 7.5% de todas las muertes por cáncer en mujeres. Casi 9 de cada 10 muertes (87%) por cáncer cervical se producen en las regiones menos desarrolladas (**Globocan, 2012**).

En América Latina es la segunda neoplasia más común en mujeres con 68,818 casos anuales, mientras que la mortalidad en esta región es de 28,565 defunciones y se presenta con mayor frecuencia en países como Brasil, México, Colombia, Perú, Venezuela y Argentina.

En México el tipo de cáncer más común en mujeres es el cáncer de mama seguido del cáncer cervicouterino, este último con una incidencia de 13,960 casos diagnosticados anualmente. La distribución de los casos de cáncer de cuello uterino en relación a la edad, muestra un incremento a partir de los 35 años, siendo el grupo de 50 a 59 años de edad quien registra el mayor porcentaje con alrededor del 30% de todos los casos

registrados para el año 2014 y es la segunda causa de muerte por cáncer en nuestro país con un estimado de 3,771 defunciones al año **(Secretaría de Salud; SSA 2016)**.

1.2 Etiología del cáncer

Cáncer es un término que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a diferentes órganos y tejidos, en donde las células tumorales pueden propagarse e invadir otros tejidos en el proceso conocido como metástasis. La transformación de una célula normal en una célula tumoral es un proceso multifásico que puede deberse a la interacción de diversos factores genéticos y ambientales **(Barrera, et al., 2007)**.

El desarrollo del cáncer es un proceso de varios pasos que comienza a partir de una hiperplasia benigna y termina con un tumor invasivo capaz de metastatizar a otros órganos. Durante este proceso las células cancerosas adquieren nuevas propiedades que son necesarias para el fenotipo maligno completo. Para lograr esto, las células deben evitar la inhibición del contacto y los puntos de control naturales, que normalmente inducirían la apoptosis. Además, para el crecimiento más allá de cierto tamaño, el tumor primario debe mejorar su suministro de nutrientes y oxígeno a través de la formación de nuevos vasos sanguíneos, proceso que se denomina como angiogénesis. El paso final implica células tumorales que abandonan el sitio de crecimiento primario y forman metástasis. Este paso requiere que las células adquieran varias características nuevas, incluyendo la capacidad de migrar e invadir tejidos distantes. **(Holbro, 2003)**

2. MARCO TEORICO

2.1 Familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico

Algunas de las investigaciones relacionadas en la comprensión y optimización de tratamientos para el cáncer van orientadas hacia algunos de los miembros de la familia de Receptores del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR, por sus siglas en inglés) que se sabe, están implicados en el desarrollo de muchos cánceres humanos.

La familia de receptores ErbB/EGFR se compone de cuatro miembros: ErbB1 (HER1, EGFR), ErbB2 (Neu, HER2), ErbB3 (HER3) y ErbB4 (HER4). Estos receptores responden a EGF (Factor de Crecimiento Epidérmico) y a otros ligandos relacionados con el crecimiento celular y la diferenciación en múltiples tejidos, tanto en el embrión durante el desarrollo así como en el adulto. Se ha demostrado en modelos animales que la pérdida de actividad en alguno de los miembros de la familia ErbB resulta en la letalidad embrionaria de ratones ya que presentan defectos observados en órganos como el cerebro, corazón, piel, pulmón y tracto gastrointestinal, dependiendo del receptor afectado **(Wieduwilt, Moasser, 2008)**.

En el caso del receptor tipo 2 o HER2 se ha detectado RNAm en etapas fetales, y durante el desarrollo se encuentra en el sistema nervioso, el hueso, el músculo, la piel, el corazón, los pulmones y el epitelio intestinal **(Coussens, et al. 1985)**.

Las funciones de HER2 durante el desarrollo fueron delimitados utilizando ratones knockout para HER2, en estos estudios se pudo identificar que los ratones nulos para este receptor presentaron una muerte temprana a mediados de la gestación debido a

malformaciones de las trabéculas del corazón (**Lee, et al. 1995**) así mismo se identificó que la inactivación selectiva de HER2 en cardiomiocitos conduce a una cardiomiopatía dilatada severa, causando disfunción cardíaca en el segundo mes post-natal lo que sugiere que la señalización de HER2 es esencial para la función del corazón en el adulto (**Özcelik, et al. 2002**).

Por otro lado la actividad de HER2 no solo se ve involucrada en el desarrollo cardíaco, también se sabe que los ratones deficientes de este receptor muestran defectos en los ganglios sensoriales craneales (**Lee, et al. 1995**), ya que, juega un papel en la diferenciación terminal de oligodendrocitos en la médula espinal, así como en la mielinización de los nervios periféricos por las células de Schwann (**Park, et al. 2001**), también se cree que ErbB2 y ErbB3 median la supervivencia de las células de la cresta neural, contribuyendo al desarrollo del sistema nervioso periférico (**Chan, et al. 2002**).

2.2 Estructura

Los miembros de la familia EGFR son Receptores Tirosina Kinasa (RTK) transmembranales con una porción extracelular glicosilada constituida aproximadamente de 630 aminoácidos que se compone de cuatro subdominios (I-IV), dispuestos en una repetición en tándem. Los subdominios I y III denominados L1 y L2 respectivamente, son los encargados de mediar la unión del ligando, por otro lado los subdominios II y IV denominados CR1 y CR2 respectivamente juegan un rol muy importante en la dimerización de los receptores (Figura 1) (**Citri, et al. 2002**).

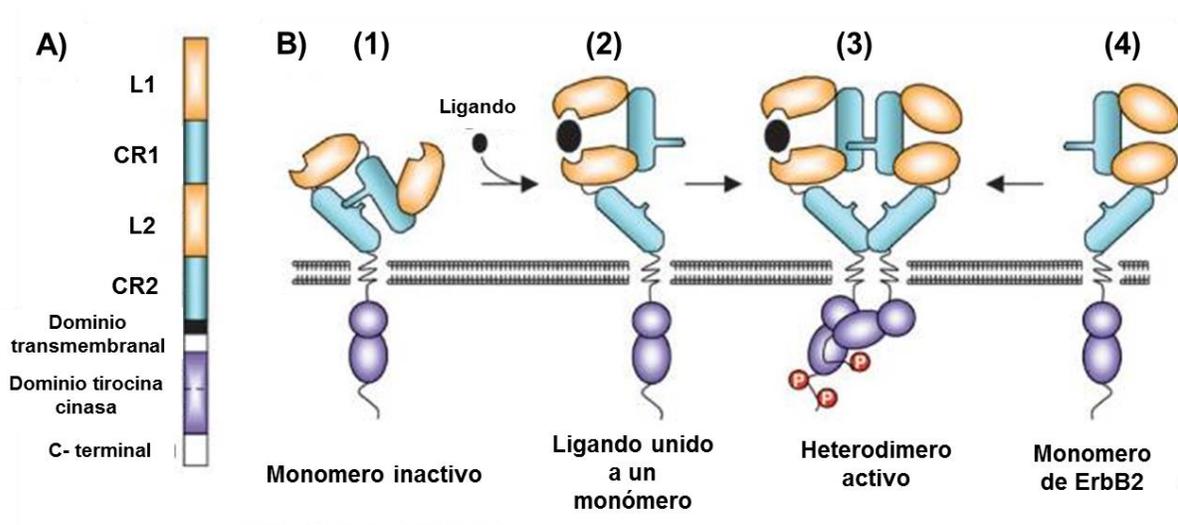


Figura 1. Estructura de los receptores ErbB. A) Representación lineal de los dominios, donde se observan las subunidades L1 y L2, así como los subdominios CR1 y CR2 y el dominio Tirosina Cinasa. B) Descripción esquemática de la dimerización y activación del receptor donde: (1) Estructura libre de ligando, (2) La unión del ligando a los dominios L1 y L2 provocando así el cambio conformacional que libera a CR1 permitiendo así la homo-heterdimerización, (3) La dimerización y la subsecuente autofosforilación de los receptores, (4) ErbB2 es el único miembro que presenta una conformación extendida lista para interactuar con los otros miembros de la familia. **(Wieduwilt, Moasser, 2008).**

Las cristalografías de algunos de los miembros de esta familia muestran que los subdominios L1 y L2 son sitios ricos en Leucina, mientras que los subdominios CR1 y CR2 son sitios ricos en cisteína **(Ogiso, et al. 2002)**. El sitio CR1 está constituido en forma de una β -horquilla que es fundamental para la función de los receptores. La mayoría de los miembros de esta familia muestran que en forma inactiva, libre de ligando, el dominio extracelular adquiere una conformación en el que el bucle de la β -horquilla de CR1 interactúa con CR2 ocultando así el sitio catalítico (Figura 1). La estructura del dominio extracelular de EGFR demuestra que la unión del ligando a los

dominios L1 y L2 conduce a cambios conformacionales en el que el receptor adquiere una forma extendida que expone el dominio de dimerización y permite la interacción de ectodominios entre receptores formando así los homo-heterodímeros. La unión del ligando al ectodominio de ErbB y la dimerización del receptor induce cambios conformacionales en los dominios extracelulares seguido de una rotación en las hélices transmembranales que conducen a la desestabilización del dímero intracelular inactivo. El dominio C-terminal se separa del dominio Tirosina Kinasa intracelular y de esta forma puede llevarse a cabo la fosforilación, haciendo que la cinasa sea accesible a los sustratos **(Moriki, et al. 2001)**.

La homo/heterodimerización de dos miembros de EGFR que se encuentran en estrecha proximidad resulta en el contacto directo tanto de las regiones transmembranales y citoplásmicas, así como de los dominios tirosina cinasa de dos protómeros receptores **(Yarden, Schlessinger, 1987; Zhang et al., 2006)**.

A pesar de que se tiene conocimiento de la activación de los miembros de esta familia, el receptor ErbB2 es uno de los miembros más intrigantes, ya que su activación no solo es independiente de fosforilación, sino también independiente de ligando. Algunas propuestas de esta activación han llevado a proponer un mecanismo molecular para la activación acoplada por rotación de este receptor **(Fleishman, et al. 2002)**, es decir, el dominio transmembranal de un homodímero de ErbB2 puede ocupar una de las dos conformaciones estables correspondientes a los estados activos e inactivos del receptor. El cambio entre las dos conformaciones, que implica una rotación del dominio transmembranal, induce la reorientación de los dominios citoplásmicos dentro de los

dímeros del receptor, lo que conduce a la trans-autofosforilación y la estimulación de la actividad enzimática (**Landau, et al., 2004**).

En condiciones patológicas se ha identificado que algunos miembros de la familia de EGFR como HER1 (EGFR) y HER2 presentan mutaciones puntuales ya sea en el dominio extracelular o en el dominio tirosina cinasa, las cuales están involucradas en la activación constitutiva de los receptores, permitiendo así la activación constante de vías de señalización implicadas en la proliferación y supervivencia de células tumorales (**Weigelt, 2013**).

2.3 Cáncer y vías de señalización de ErbB.

En condiciones fisiológicas normales la activación de los receptores ErbB se encuentra controlada por la expresión espacial y temporal de los ligandos que son miembros de la familia de Factores de Crecimiento Epidérmico (EGF), así como el Factor de Crecimiento Transformante- α (TGF- α) y neu-regulinas. La unión del ligando desencadena la señalización intracelular a través de un complejo y vías de señalización estrechamente controladas que maneja y regula muchas funciones celulares.

EGFR, ErbB2 y ErbB3 están implicados en el desarrollo y la progresión del cáncer por lo que la homo/heterodimerización juega un papel crucial en esta función, además se ha reportado que la expresión o función aberrante de HER2 está implicada en el desarrollo y evolución del cáncer de mama, cáncer gástrico e incluso cáncer de ovario (**Baselga, Swain, 2009**).

En general la unión extracelular de los ligandos a sus receptores afines induce la formación de homo/heterodímeros activos, permitiendo así la autofosforilación cruzada de residuos de tirosina que proporcionan sitios de unión para proteínas de señalización que median en la activación de moléculas efectoras corriente abajo. Las redes de señalización descendente controladas por la activación de ErbB consisten en varios módulos interconectados, algunos de los efectores de ErbB incluyen la vía PI3K-Akt, m-TOR, la vía MAPK y la ruta de la Fosfolipasa C gamma (PLC γ) (**Roskoski, 2014**). Estas cascadas de señalización regulan una gran variedad de eventos fisiológicos que incluyen proliferación celular, apoptosis, angiogénesis, adhesión celular y motilidad, desarrollo embrionario y organogénesis (**Yarden, Pines, 2012, Baselga, Swain, 2009**).

EGFR (ErbB1) y ErbB4 cuentan con siete ligandos bien definidos (Tabla 1), ErbB3 cuenta con dos ligandos, pero carece de actividad tirosina cinasa intrínseca ya que no puede unirse al ATP, por lo que necesito unirse a otro miembro de la familia (**Roskoski, 2014**). Por el contrario ErbB2 posee un dominio activo de tirosina cinasa pero no tiene un ligando conocido por lo que presenta una conformación disponible constitutivamente para la dimerización y por esta misma razón es el miembro preferido de los otros miembros de EGFR (**Yarden, 2001, Hynes, 2005**). Los receptores existentes permiten que haya 28 posibles combinaciones de dímeros, pero si se toma en cuenta que ErbB2 no tiene ligandos y ErbB3 no presenta actividad tirosina cinasa, entonces las combinaciones se reducen a 26. Así mismo hay 614 posibles combinaciones de complejos ligando-receptor (**Roskoski, 2014**).

Tabla 1. Ligandos de los miembros de la familia de EGFR

Receptores	Ligandos
ErbB1 (HER1, EGFR)	EGF, EPG, TGF α , AR, BTC, HB-EGF, EPR
ErbB2 (HER2)	No presenta ligandos conocidos
ErbB3	Nrg-1, Nrg-2
ErbB4	BTC, HB-EGF, EPR, Nrg-1, Nrg-2, Nrg-3, Nrg-4

Dependiendo del ligando y del receptor activo se desencadena una u otra de las vías de señalización antes mencionadas. La activación de la vía PI3K se da a través de la subunidad p85 de PI3K que se une potencialmente a una docena de fosfotirosinas del receptor ErbB3 que conducen a la activación de PI3K. Esta enzima cataliza la fosforilación del fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato (PIP2) unido a la membrana plasmática.

Akt, que también se conoce como proteína cinasa B (PKB), es una proteína serina-treonina-cinasa que se une al fosfatidilinositol trifosfato con alta afinidad (**Roskoski, 2014**); PTEN cataliza la hidrólisis de fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato para formar fosfatidil inositol 4,5 bisfosfato y fosfato inorgánico, regulando así negativamente la ruta Akt. Algunos de los sustratos identificados para Akt son la glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3), el antagonista proapoptótico de la proteína BCL-2 (BAD), el cual regula el ciclo celular a través de p21 y p27 y AS160 (sustrato de Akt de 160 kDa) que es una proteína activadora de RAB GTPasa (GAP) que regula y estimula la exocitosis del transportador de glucosa tipo 4 (GLUT4) (**Vanhaesebroeck, et al., 2012, Engelman, 2009**).

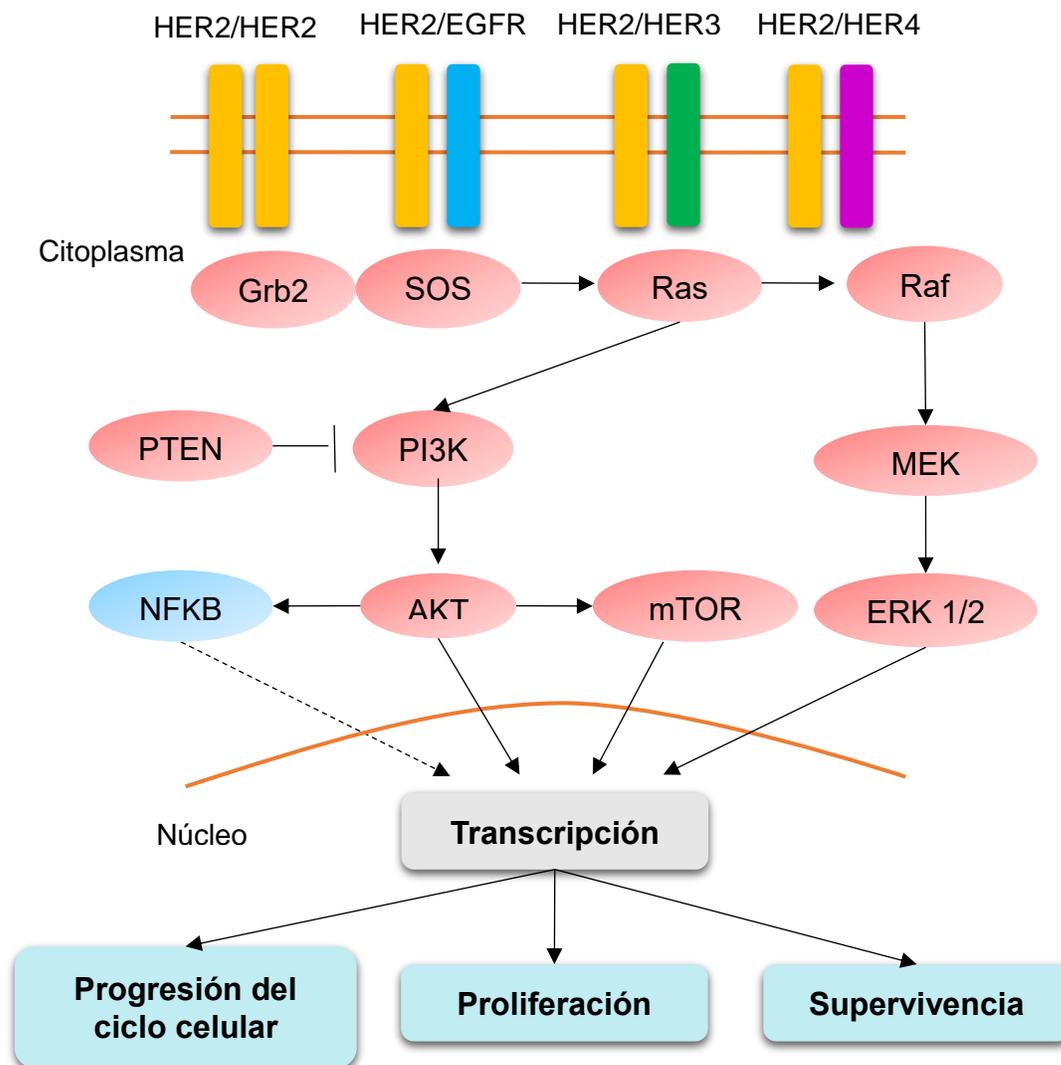


Figura 2. La unión del ligando y la posterior dimerización da como resultado la fosforilación cruzada, creando sitios de acoplamiento de componentes de señalización aguas abajo. Dos vías de señalización activadas por los dímeros de ErbB son la vía MAPK que estimula la proliferación y la vía PI3K-Akt que promueve la supervivencia de las células tumorales, así mismo la activación de la familia Akt permite la activación a través de la fosforilación de muchas otras proteínas como mTOR, que inician procesos que permiten la supervivencia celular, supresión de la apoptosis, progresión del ciclo celular y proliferación.

Por otro lado la proteína cinasa dependiente de fosfoinositido 1 (PDK1) y el blanco del complejo 2 de rapamicina de mamamifero (mTORC2) catalizan la fosforilación de Akt en Thr308 y Ser473, respectivamente, y la bisfosforilación y activación de Akt cataliza a su vez la fosforilación de mTOR (objetivo de rapamicina de mamífero) **(Vanhaesebroeck, et al., 2012)** mTOR es una proteína serina-treonina-cinasa con docenas de sustratos que participan en múltiples procesos celulares incluyendo la supervivencia celular **(Engelman, 2009)**. Se ha identificado que mTOR funciona como dos complejos el complejo 1 (mTORC1) y el complejo 2 (mTORC2), que se pueden distinguir por sus diferencias en la sensibilidad a la rapamicina, proteínas de unión en el núcleo y sustratos rio abajo **(Shimobayashi, 2014)**. La localización de estos complejos también es distinta mTORC1 se asocia con membranas endosomales y lisosomales, mientras mTORC2 interactúa con la membrana plasmática y en algunos casos con membranas asociadas a ribosomas, como el retículo endoplásmico rugoso (ER). mTORC1 está regulado por las entradas de señalización de nutrientes, energía y crecimiento, mientras mTORC2 se activa mediante señales de crecimiento. Estos complejos permiten la activación de la traducción a través de proteínas como eIF4F que funciona como una RNA helicasa para desenrollar la estructura secundaria de la región 5' no traducida (UTR) del mRNA para permitir que el ribosoma escanee de manera eficiente a lo largo de la 5'-UTR desde el 5'-Cap al codón de inicio AUG. El ensamblaje de eIF4F es un paso limitante para la velocidad de inicio de la traducción **(Siddiqui, et al., 2015)**. Los altos niveles de expresión de eIF4F aumentan la eficacia de traducción de un conjunto de mRNA diana implicados en la progresión del cáncer, que incluyen al proto-oncogen *MYC* y la *ciclina D1*, ambos implicados en la

proliferación, al Factor de Crecimiento Endotelial Vascular A (VEGFA) que estimula la angiogénesis, MLC1 que es un regulador de la apoptosis y la metalopeptidasa de matriz 3 (MMP3) que hace más eficiente el proceso de metástasis **(Rad, et al., 2018)**.

Otra vía importante activada por los miembros de ErbB es la de MAPK, donde la proteína adaptadora Grb2 que esta rio arriba de Ras se puede unir a varios residuos de fosfotirosina en ErbB1/2/3/4. La unión de Grb2 a las fosfotirosinas y a su vez la unión con el factor intercambiador de nucleótidos de guanina SOS el cual media el intercambio de GTP por GDP conduce a la activación de la vía de señalización Ras/Raf/MEK/ERK1/2 (Figura 2) **(Roskoski, 2010)**. ERK1/2 tiene varios sustratos que incluyen proteínas cinasas y factores de transcripción como AP1 que promueve la tumorigénesis en diferentes niveles, incluida la transición epitelio-mesénquima, invasión, metástasis, angiogénesis, proliferación y supervivencia **(Roskoski, 2012)**.

Como se mencionó anteriormente la señalización de ErbB puede activar a un gran número de moléculas efectoras como PLC- γ , STAT y SRC **(Balz, et al., 2012, Quesnelle, et al., 2007)**. La diversidad de redes de señalización intracelular iniciadas por ErbB impulsan la progresión tumoral en un gran número de tumores sólidos humanos. Por lo que es muy importante continuar con el desarrollo de una nueva generación de fármacos que se dirijan selectivamente a oncoproteínas como ErbB, ya que se ha demostrado que los tratamientos ya existentes para este tipo de receptores presentan una oportunidad de eficacia en el área clínica.

Cada uno de los integrantes de esta familia tiene la capacidad de activar o alterar las vías de señalización de una manera particular, en el caso del miembro tipo 2, el cual puede ser reconocido como ErbB2, HER2 o HER2-neu, este último, denominado así porque fue identificado por primera vez en neuroblastoma de rata (**Bargmann, et al. 1986**), es uno de los receptores que tienen mayor relevancia en el campo de la oncología ya que se ha identificado que se amplifica e hiper-expresa en una gran variedad de tipos tumorales, por lo que se ha establecido como un objetivo para la terapia anti-tumoral.

La amplificación génica de *HER2* es un aumento en el número de copias del gen sin un aumento proporcional en otros genes, este fenómeno es resultado de la duplicación de una región de DNA, a través de errores en la replicación del DNA y la maquinaria de reparación (**Albertson, 2006**). La expresión de HER2 se ha documentado en diferentes tipos tumorales, en algunos casos acompañados por amplificación génica. Aunque la amplificación génica proporciona evidencia convincente de la importancia biológica de *HER2*, la hiper-expresión sin amplificación genética de HER2 también se ha asociado con un mal pronóstico en varios tipos tumorales (**Iqbal, et al., 2014**).

HER2 es uno de los oncogenes que han tenido mayor relevancia en el área clínica, particularmente en el cáncer de mama en donde se ha identificado que se amplifica y/o hiper-expresa en aproximadamente del 20%-30% de los casos diagnosticados (**Sandhu, 2010**), razón por la cual se ha explotado su valor terapéutico mediante la creación de drogas dirigidas contra este receptor, tanto anticuerpos monoclonales

como moléculas inhibidoras de la actividad tirosina cinasa **(Wieduwilt, Moasser, 2008)**.

Actualmente se han aprobado tres anticuerpos monoclonales y una molécula pequeña (Inhibidor de tirosina cinasa) para cáncer de mama, y recientemente un anticuerpo (trastuzumab) en cáncer gástrico **(Baselga, Swain, 2009)**. Trastuzumab es un anticuerpo monoclonal que se une a HER2 en la porción extracelular, específicamente en el dominio IV y suprime la actividad del receptor inhibiendo así la activación de vías de señalización río abajo, resultando en el arresto del ciclo celular y la reducción de la angiogénesis **(Izumi, 2002)**. Se ha sugerido que trastuzumab puede regular la activación de vía la PI3K-Akt **(Le. et al. 2006)**. Además de inhibir la señalización, tiene otros mecanismos de acción como evitar la escisión del dominio extracelular, el cual es otro mecanismo de activación aberrante de HER2 y que es independiente de ligando e incluso de dimerización. Además tiene una actividad citostática y citotóxica **(Longva, 2005)**.

Pertuzumab es otro de los anticuerpos aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) para la administración a pacientes con tumores positivos para la hiperexpresión de HER2, este anticuerpo se une al dominio II que es el dominio de dimerización, evitando así la dimerización con otros miembros de la familia de EGFR, esto contrasta con la actividad de trastuzumab que no inhibe la dimerización con los otros miembros de la familia pero si evita la posible activación de vías de señalización que se desencadenan por la unión del ligando a los receptores **(Baselga, 2009)**.

Otra de las opciones de tratamiento es Trastuzumab-DM1 que es el anticuerpo monoclonal conjugado con un potente inhibidor de polimerización de microtúbulos DM1 (derivado de maitansina). Una vez que el anticuerpo se une a HER2, T-DM1 se internaliza y se produce la digestión proteolítica del conjugado, liberando así un metabolito interno Lys-MCC-DM1 que evita la síntesis de microtúbulos e inhibe la división celular (LoRusso, *et al.*, 2011). Al igual que trastuzumab no conjugado los mecanismos de acción incluyen la inhibición de vías de señalización como PI3K-Akt y puede producir citotoxicidad dependiente de anticuerpos (Phillips, *et al.*, 2008).

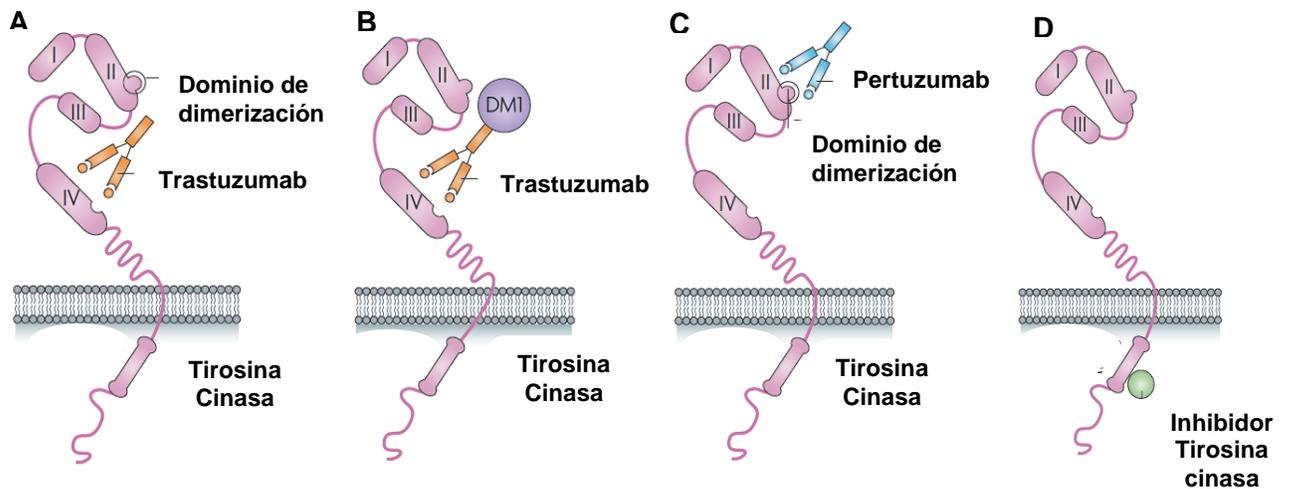


Figura 3. Terapias dirigidas contra ErbB2. **A.** El anticuerpo Trastuzumab se une directamente al dominio IV de región extracelular de ErbB2, suprimiendo así la actividad de señalización. **B.** Trastuzumab-DM1 consiste en Trastuzumab conjugado con un agente anti-microtúbulos denominado DM1. Después de unirse a ErbB2 Trastuzumab-DM1 se internaliza y DM1 se libera dentro de la célula para ejercer sus efectos citotóxicos. **C.** Pertuzumab es otro anticuerpo monoclonal que se une al dominio II que es el dominio de dimerización, esta unión evita que se formen dímeros ErbB2-ErbB2 o con otros miembros de la familia de EGFR. **D.** Lapatinib es una molécula pequeña que inhibe la actividad tirosina cinasa del receptor (Baselga, 2009).

La molécula pequeña Lapatinib es un TKI que inhibe directamente la actividad del dominio tirosina cinasa de los receptores ErbB, especialmente ErbB1 y ErbB2. Estos agentes se unen al sitio de unión de ATP, evitando la activación y la transducción de señales como MAPK y PI3K-Akt, aumentando la apoptosis y una disminución en la proliferación celular **(Spector, 2005)**.

Debido a lo reportado en la literatura así como los tratamientos existentes para combatir los tumores positivos para la hiper-expresión y amplificación de HER2 en cáncer de mama, ha permitido la investigación en otros tipos de cáncer, por lo que la potencial aplicación de terapias anti-HER2 en otras neoplasias reviste especial relevancia.

Actualmente se ha aprobado el uso de Trastuzumab en cáncer gástrico, ya que se ha comprobado que entre el 7% y el 38% de los casos presentan amplificación y/o expresión de HER2. Al igual que para cáncer de mama se ha reportado que la hiper-expresión de HER2 se asocia con un mal pronóstico en pacientes con cáncer gástrico **(Lei, et al. 2017)**, por lo que el uso de Trastuzumab en combinación con quimioterapia ha demostrado un aumento significativo en la supervivencia global en pacientes que recibieron Trastuzumab en comparación con los pacientes que solo recibieron quimioterapia **(Bang, 2010)**.

Recientemente se han llevado a cabo estudios en los que se pretende identificar alguna anomalía de HER2 en otros tipos de cáncer **(Ross 2013; Kavuri 2015)**.

En particular algunas de estas investigaciones van orientadas a encontrar alguna anomalía de HER2 en cáncer cervicouterino, el cual se origina en las células que lo recubren.

El cuello uterino se subdivide en la porción vaginal denominada ectocérvix y la porción interna denominada endocérvix. El ectocérvix es visible a simple vista en la exploración vaginal y está recubierto por el epitelio escamoso estratificado no queratinizado, el epitelio escamoso converge centralmente con el epitelio cilíndrico del endocérvix el cual tiene como función la secreción de moco.

El área del cérvix donde el epitelio cilíndrico es sustituido por el epitelio escamoso, se conoce como zona de transformación, esta zona es muy susceptible a la infección por VPH (Virus del Papiloma Humano debido al gran número de células inmaduras, por esta razón la mayoría de los casos de cáncer cervical se originan en las células que están ubicadas en la zona de transformación.

Los dos tipos más comunes de cáncer de cuello uterino son el carcinoma de células escamosas y el adenocarcinoma. La mayoría de los casos de cáncer de cuello uterino son carcinomas de células escamosas y el resto son adenocarcinomas (**American Cancer Society; AMS, 2016**).

3. ANTECEDENTES

3.1 Mutaciones de HER2 en carcinoma cervicoterino.

Aunque las alteraciones más estudiadas de HER2 son la hiper-expresión con o sin amplificación génica y estas han sido utilizadas como parámetro para el uso de terapias blanco, recientemente se ha descrito que el gen *HER2* puede presentar mutaciones del tipo "ganancia de función" por lo que también los inhibidores de HER2 tienen acción antitumoral en modelos experimentales con mutaciones activadoras del gen. Sin embargo, este tipo de alteraciones no pueden ser detectadas por inmunohistoquímica ni FISH (Hibridación Fluorescente in situ). En un estudio reciente, se analizaron más de 7300 muestras de tumores sólidos mediante secuenciación de última generación (**Chmielecki, et al., 2014**). En 403 muestras se encontraron alteraciones en el gen *HER2*: sustituciones de bases, inserciones, deleciones, reordenamientos y cambios en el número de copias. Se identificaron mutaciones activadoras en 131 muestras (32.5%); se observó amplificación en 246 muestras (61%). Dos muestras (0.5%) presentaron un reordenamiento HER2. Diez muestras (2.5%) presentaron múltiples mutaciones puntuales en HER2, y se encontró que la presencia de mutaciones y amplificaciones fueron mutuamente excluyentes en el 91% de los casos con alguna alteración. Estos resultados indican que utilizando perfiles genómicos se pueden detectar más pacientes que pueden ser candidatos a terapia anti-HER2, en el orden de 3.5 veces (**Chmielecki, et al., 2014**).

Así mismo recientemente, se publicó un análisis genómico completo de 115 pares de muestras de cérvix normal y carcinomas cervicouterinos, estudio en el que se incluyeron 15 muestras de pacientes mexicanas **(Ojesina, et al., 2014)** y se encontraron mutaciones ya reportadas previamente, particularmente en PI3K, PTEN y STK11 en el 14%, 6% y 4%, respectivamente. Entre las mutaciones somáticas previamente no conocidas, se encontraron: la sustitución E322K en el gen MAPK1 (8%), mutaciones inactivadoras en el gen HLA-B (9%), y mutaciones en los genes EP300 (16%), FBXW7 (15%), NFE2L2 (4 %), TP53 (5%) ELF3 (13%) y CFBF (8%). De forma notable, se encontró un 6% de mutaciones somáticas en HER2 y tres de las seis mutaciones encontradas ya están caracterizadas demostrándose que dichas mutaciones son del tipo ganancia de función (S310F, S310Y y V842I) **(Weigelt 2013; Acharyya 2013)**.

3.2 Expresión de HER2 en carcinoma cervicouterino.

Se ha reportado que en el carcinoma de cuello uterino la expresión de la proteína HER2 oscila desde 0% hasta en el 59% de los casos, sin embargo, la amplia variabilidad en los resultados puede ser debido a la metodología y el anticuerpo utilizados. La información se resume en el siguiente cuadro.

Tabla 2. Frecuencia de alteraciones reportadas de HER2 en carcinoma cervicouterino.

IHQ (no Hercep Test)	IHQ Hercep Test	Amplif Gen (FISH)	Amplif Gen no FISH	Referencia
59 %	--	--	--	Perez-Regadera 2009
7.9 %	--	0.6%	--	Leskinova 2009
--	--	--	14 %	Mitra 1994
43 %	--	--	--	Niibe 2003
13 %			--	Yamashita 2009
	0%	0%		Conessa-Zamora 2013
	0.3%			Chavez-Blanco 2004
		8.7 %		Mark 1999

4. JUSTIFICACIÓN

Con base en todos los datos mencionados anteriormente y por la disponibilidad de agentes terapéuticos contra receptores de la familia EGFR, como anticuerpos monoclonales o inhibidores de estos receptores así como su éxito en el tratamiento de cáncer de mama y gástrico, es importante evaluar las alteraciones de ErbB2 en el cáncer cervicouterino para la potencial aplicación de terapias anti-HER2 en este tipo de patología.

5. HIPÓTESIS

Las mutaciones S310F, S310Y y V842I así como la amplificación y la hiper-expresión de HER2 se encuentran en por lo menos el 10% de los casos de carcinoma cervicouterino.

6. OBJETIVO GENERAL

Determinar la frecuencia de mutaciones, amplificación génica e hiper-expresión proteica de HER2 en muestras de carcinoma cervicouterino

7. OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la frecuencia de hiper-expresión HER2 en muestras de carcinoma cérvicouterino.
- Determinar la frecuencia en la amplificación génica de HER2.
- Detectar la frecuencia de las mutaciones S310F, S310Y y V842I en el gen *HER2*.
- Correlacionar la información obtenida de las alteraciones detectadas en las tres pruebas.

8. METODOLOGÍA

Se seleccionaron un total de 100 muestras del archivo de patología con diagnóstico previo de carcinoma cervicouterino durante el año 2013. Los casos seleccionados fueron consecutivos.

8.1 Inmunohistoquímica con HERCEP-TEST

HercepTest™ (Dako, USA) N° de catálogo K5204. Este Test utiliza un anticuerpo policlonal (AO485), elegido por su alta afinidad por HER-2 en material procesado rutinariamente. La técnica se realizó en material procesado de forma rutinaria con fijación en formaldehído e inclusión del material en parafina. La técnica se llevó a cabo siguiendo de manera estricta el protocolo del proveedor. El protocolo se desarrolló en dos etapas: un primer paso consistió en la desparafinación y rehidratación a través de baños graduales de xilol a etanol 70%. El siguiente paso fue la incubación con la Solución de Recuperación de Antígenos en un baño de agua de 90-99°C durante 40 min, posterior a la incubación se dejaron secar los portaobjetos a temperatura ambiente y se enjuagaron los cortes en Buffer de lavado, se retiró el exceso de buffer y se agregaron de 1 a 3 gotas (dependiendo el tamaño del tejido) de la Solución Bloqueadora de Peroxidasa y se incubó durante 5 min, se realizó un lavado con agua destilada y se procedió a cubrir el tejido con 1 a 3 gotas de Anti-HER2 Protein y se incubó durante 30 min, posterior a la incubación se aclararon los portaobjetos con Buffer de lavado y se incubaron nuevamente por 30 min con Reactivo de Visualización, se aclararon los cortes nuevamente con Buffer de lavado y se eliminó el exceso de este, se cubrió el tejido con 1 a 3 gotas de la solución Substrato-Cromogeno (DAB) y se incubó durante 10 min, se realizó un lavado más con agua destilada y se procedió a llevar a cabo la contra-tinción con hematoxilina de Harris. Los tejidos fueron deshidratados hasta Xilol y posteriormente se montaron con la resina Entellan (Merck, Cat. 107961). Las laminillas fueron evaluadas por dos médicos Patólogos

8.2 Hibridación Fluorescente *in situ* (FISH).

La amplificación de HER2 se evaluó usando el sistema "PathVysion HER2 DNA Probe Kit" (Vysis), que utiliza dos sondas para determinar el número de copias del gen *HER2*, una naranja para HER2 y una verde CEP17 que hibrida con una secuencia satélite alfa localizada en el centrómero del cromosoma 17 (17p11.1-q11.1). La técnica se utilizó siguiendo de manera estricta el protocolo del proveedor.

Preparación de los portaobjetos. Se realizaron secciones de 2-3 μm de espesor y se dejaron incubar a 55°C una noche antes de la hibridación, se eliminó la parafina en tres cambios de xilol durante 10 min cada uno, se deshidrataron las muestras en dos cambios de etanol 100% durante 5 min cada cambio, se incubaron las muestras durante 20 min en HCl 0.2 N, se lavaron los portaobjetos y posteriormente se incubaron en SSC 2X durante 5 min, este paso se repitió una vez más, el siguiente paso fue incubar durante 30 min los portaobjetos en una solución de NaSCN 1M la cual fue previamente calentada a 80°C, la siguiente incubación se realizó con SSC 2X durante dos minutos y se procedió a incubar con la proteasa a 37°C durante 30 min, se enjuagaron los portaobjetos con agua destilada y posteriormente en dos cambios de SSC 2X, los portaobjetos se sumergieron brevemente en agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente, se incubaron en formalina 10% durante 15 min y se enjuagaron nuevamente en agua destilada, se dejaron secar a temperatura ambiente. Se aplicaron 10 μL de sonda DNA-FISH al área seleccionada y se cubrió con el portaobjetos, las muestras fueron incubadas por 20 horas en una cámara húmeda a 37°C protegiendo de la luz directa. Los lavados poshibridación se realizaron con SSC

2X durante 20 min y posteriormente con NP40 0.3% y 0.1% durante 5 min cada uno, se dejó secar un poco las muestras y se agregaron 10 µL de DAPI/Antifade al área hibridada y se cubrió con un portaobjetos. La visualización e interpretación de la señal se llevó a cabo con un microscopio de epifluorescencia.

8.3 Análisis de mutaciones por secuenciación.

La extracción y purificación de DNA de tejido incluido en parafina se realizó de acuerdo a las instrucciones de QIAamp DNA FFPE Tissue Kit con número de catálogo 56404.

Se aisló el DNA de 3 cortes de 5µm de grosor del bloque de parafina de cada muestra mediante el siguiente protocolo: Se eliminó el exceso de parafina de cada corte agregando 1ml de xilol y posteriormente centrifugando a 11,000 rpm durante 5 min, se eliminó el sobrenadante y se repitió el proceso desparafinación dos veces más. Una vez que se eliminó la parafina se lavó el botón con 1ml de etanol 96-100% y se centrifugó nuevamente a 11,000 rpm durante 5 min, se eliminó el sobrenadante y se repitió este paso dos veces más, se dejó secar el pellet durante 10 min a 37°C, posteriormente se resuspendió en 180 µL de buffer ATL y 20 µL de proteinasa K. Se incubaron los tubos a 56°C y posteriormente a 96°C durante una hora hasta observar que el tejido se haya lisado por completo. Se añadieron 200 µL del buffer AL y 200 µL de etanol 96-100%, se transfirió el eluido a una columna QUIAmp elute dentro de un tubo de colección y se centrifugó a 8,000 rpm durante 1 min. Se pasó la columna a un tubo de colección limpio y se añadieron 500 µL de buffer AW1 y se centrifugó a 8,000 rpm durante 1 min, se eliminó el sobrenadante y se añadieron 500 µL del buffer AW2

y se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar la columna, por último se agregó de 20-100 µL de buffer ATE en el centro de la membrana y se centrifugó a 11,000 rpm durante 1 min, cuantificar en un nanodrop y almacenar a -20°C.

8.3.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Se amplificaron los exones 12 y 25 del gen ERBB2, con oligonucleótidos diseñados para amplificar cada exón correspondiente así como una porción de las regiones intrónicas adyacentes. La secuencia de los oligonucleótidos es: E12 *Forward* 5'-AAT GCT GCT CAT GGT GGT-3', E12 *Reverse* 5'-AGG GTC TGA GGA AGG ATA GG-3', E25 *Forward* 5'-ACT CTT GCT GGG CAT GTG-3', E25 *Reverse* 5'- TTC TCC CAT GGG CTA GAC A-3'. La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 20 µl con 50 ng de DNA, 1 µmol/L de cada oligonucleótido (forward y reverse), 200 µmol/L dNTPs (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 0.25 U Taq polymerase (Applied Biosystems™, USA), y buffer 1X proporcionado por el proveedor. Las reacciones se llevaron a cabo en un 2700 Thermal Cycler (Applied Biosystems) siguiendo un protocolo de PCR-touchdown: desnaturalización inicial a 95°C por 5 min y una extensión final a 72°C por 7 min, desnaturalización a 95°C por 30 seg, alineamiento a 59.9-52.9°C disminuyendo 0.5°C por ciclo por 14 ciclos, seguido de 26 ciclos a 52.9°C, y polimerización a 72°C por 30 seg.

8.3.2 Secuenciación.

El producto de la PCR será purificado y secuenciado en ambas direcciones (sentido y antisentido) en al menos dos amplificaciones independientes para cada exón. Para la reacción de secuencia se utilizó el kit ABI BigDye Terminator kit v3.1 (ABI, Foster City, CA), en un volumen de reacción de 10 µl de acuerdo a las instrucciones del kit y con el siguiente protocolo de secuenciación: desnaturalización inicial a 95°C por 5 min y una extensión final a 60°C por 7 min, desnaturalización a 95°C por 10 seg, alineamiento a 55°C por 10 seg y polimerización a 60°C por 4 min, por 25 ciclos. Las reacciones se purificaron mediante precipitación con isopropanol y analizadas en un ABI3100 Genetic Analyzer. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con una secuencia de referencia (GenBank NG_007503.1).

9. RESULTADOS

Dado que no existe consenso sobre la evaluación de HER2 en cáncer cervicouterino, se llevó a cabo la evaluación de las muestras por FISH e Inmunohistoquímica siguiendo estrictamente los criterios de la guía de evaluación para HER2 en cáncer de mama (**Wolf, 2013**). Así mismo para la evaluación por Inmunohistoquímica también se llevó a cabo un análisis descriptivo de cada una de las muestras.

9.1 Evaluación de HER2 por Inmunohistoquímica

Se llevó a cabo el análisis de cien muestras con base en los criterios mencionados en la guía de evaluación publicada en 2013, los cuales se mencionan en la siguiente tabla.

Tabla 3. Criterios de evaluación de HER2 por Inmunohistoquímica

+++ Positivo	++ Indeterminado	+ Negativo	0 Negativo
Tinción completa de la membrana, así como tinción intensa en el citoplasma	Tinción incompleta de membrana y/o tinción leve a moderada, así como tinción en menos del 10% de las células	Tinción incompleta de la membrana	No se observa tinción
Tinción en por lo menos el 10% de las células	Tinción completa de la membrana e intensa pero se encuentra en menos del 10% de las células	Tinción débil apenas perceptible y que se encuentra en menos del 10% de las células	Manchas en la membrana, tinción muy débil apenas perceptible

Siguiendo estrictamente los parámetros antes mencionados, de las cien muestras analizadas, seis de ellas fueron consideradas +++, siendo la mayoría de ellas positivas en más del treinta por ciento del tejido, representando el 6% de las muestras. Por otro lado cuatro muestras fueron ++ positivas lo que se denomina como una muestra indeterminada, es decir, no se puede considerar del todo una muestra positiva para la hiper-expresión de HER2, ya que la tinción de proteína se observó sobre todo en el citoplasma y en algunos casos en el núcleo. El resto de las muestras resultaron negativas para la hiper-expresión de la proteína.

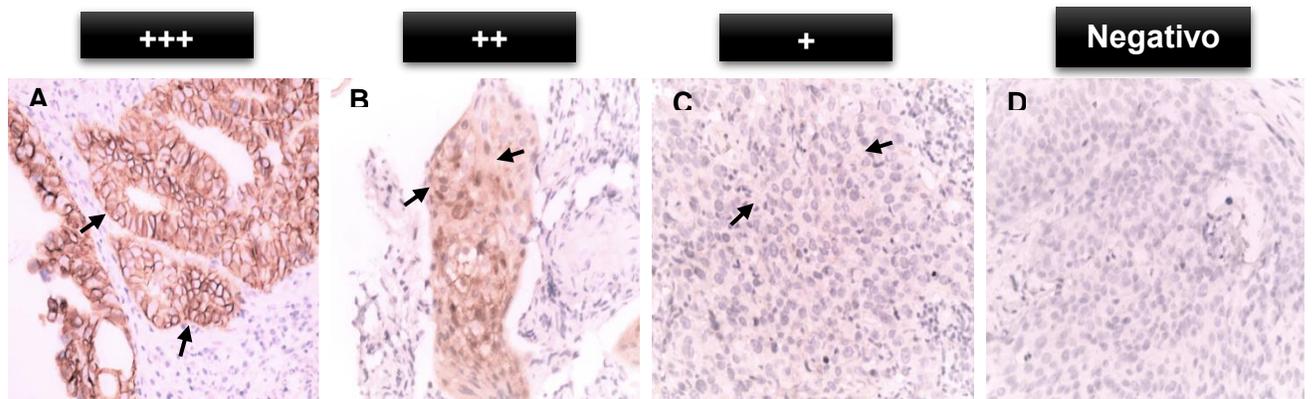


Figura 4. Imágenes representativas de los resultados obtenidos del análisis de las muestras siguiendo estrictamente los criterios establecidos en 2013. **A.** Muestra 13-10759. Considerada +++ Positiva, se puede observar tinción intensa y completa de la membrana. La tinción se encontró en más del 10% del tejido. **B.** Muestra 13-11503. Considerada ++ Indeterminada. Se observa tinción principalmente citoplasmática y se encontró en menos del 10% del tejido. **C.** Muestra 13-10527. Considerada como + Negativa. La tinción en membrana es apenas perceptible. **D.** Muestra 13-09105. Negativa.

Por otro lado se llevó a cabo un análisis descriptivo de cada una de las muestras en donde se tomó en cuenta la tinción en membrana, núcleo y citoplasma, ya que se consideró que la proteína puede tener un comportamiento diferente en una patología como el cáncer cervical.

Los resultados obtenidos en este análisis descriptivo arrojaron que 18 de las muestras presentaron hiperexpresión de + con tinción de manera focal, es decir, solo un grupo de células presentaron tinción (Figura 5) y esta fue con mayor frecuencia en membrana y citoplasma, y solo algunas de ellas presentaron tinción en el núcleo. Así mismo se pudo definir que 13 de las muestras presentaron hiperexpresión ++ con tinción igualmente en membrana y citoplasma y finalmente 7 de ellas presentaron hiper-

expresión con tinción +++ en membrana y solo una de ellas (13-14121) presentó tinción intensa en citoplasma y núcleo. En el resto de las muestras no se observó ningún tipo de tinción por lo que se consideraron como negativas, los resultados obtenidos en este análisis se resumen en la tabla 3.

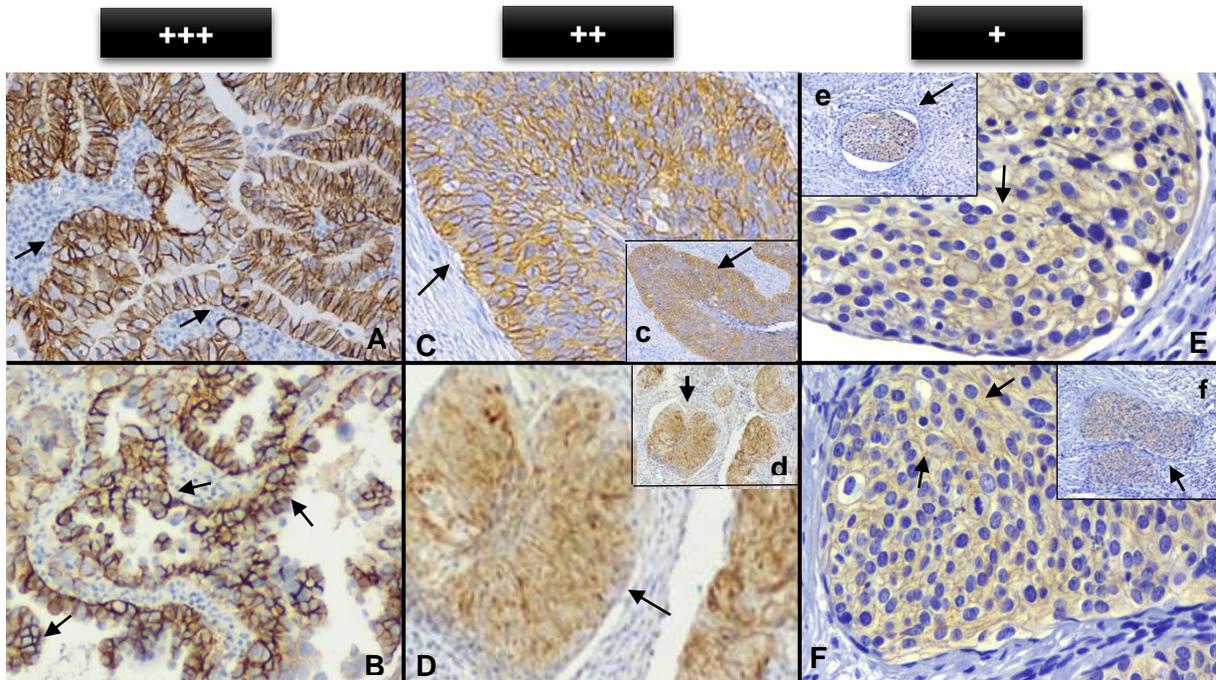


Figura 5. Imágenes representativas de los resultados obtenidos del análisis descriptivo. **A y B.** Muestras considerada +++ positivas, en ambas imágenes se puede observar tinción intensa y completa de la membrana. **C y D.** Muestras consideradas ++. En **C** se puede observar tinción completa en la membrana mientras que en **D** la tinción se observa principalmente en citoplasma (Flechas). **E y F.** Muestras consideradas como +. La tinción en membrana y citoplasma es apenas perceptible y se puede observar tinción focal en **c, d, e y f.**

Tabla 4. Resumen de los resultados del análisis descriptivo.

Muestra	Inmunohistoquímica
13-00330	+ Tinción en membrana, núcleo y citoplasma
13-00621	+ Focal; tinción en citoplasma y membrana
13-01214	+ Focal; tinción en citoplasma
13-01581	+ Focal; tinción en membrana y citoplasma
13-01916	+ 1 área focal; tinción en membrana y citoplasma
13-01917	+ Tinción en citoplasma
13-02228	+ Tinción en citoplasmica
13-02363	+ Tinción en membrana
13-02663	+ Focal; tinción en membrana y citoplasma
13-02794	++ Tinción en citoplasma
13-02848-1	+ Tinción en membrana y citoplasma
13-02939	+ Tinción en membrana y citoplasma
13-03148	+ Tinción en membrana y citoplasma
13-07206-1	+++ Positivo
13-07208-1	+++ Positivo
13-07753-2	++ Focal; membrana y citoplasma
13-08058-1	+ Tinción en membrana y citoplasma, varios focos
13-09041	+ Tinción en membrana y citoplasma
13-09108	++ Indeterminado

13-10584	+++ Positivo
13-10129	+++ Positivo
13-10759	+++ Positivo
13-12799	+++ Positivo
13-13115	++ Indeterminado
13-13467	+ Tinción en membrana y citoplasma
13-13885	++ Indeterminado
13-13945	+ Tinción en membrana y citoplasma
13-14121	+++ Focal; tinción en citoplasma y núcleo
13-14187	+ Tinción en membrana y citoplasma
13-14191	+ Tinción en membrana y citoplasma
13-14316	++ Tinción en membrana y citoplasma
13-14562	++ Foca; tinción membranal
13-14936	++ Tinción en membrana y citoplasma
13-14936-2	++ Tinción en membrana y citoplasma
13-14938	++ Tinción en membrana y citoplasma
13-14938-2	++ Tinción en membrana y citoplasma
13-14986	++ Tinción en membrana y citoplasma
13-14986-2	++ Tinción membrana y citoplasma

Por lo que con el análisis descriptivo, se pudo observar algún tipo de hiper-expresión de HER2 ya fuera +, ++ o +++, en por lo menos 18 de las muestras, lo que representa el 18%.

Con los resultados antes mencionados se pudo definir cuáles y cuantas de las muestras presentan tinción ya sea en membrana, citoplasma y núcleo, estos resultados se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 5. Numero de muestras con tinción en membrana, citoplasma y núcleo.

Resultados Inmunohistoquímica	No. de muestras
+ Tinción en citoplasma	4
+ Tinción en membrana	1
+ Tinción en membrana y citoplasma	12
+ Tinción en membrana, citoplasma y núcleo	1
++ Tinción en membrana	1
++ Tinción en membrana y citoplasma	11
++ Tinción en citoplasma	1
+++ Tinción en citoplasma y núcleo	1
+++ Tinción en membrana y citoplasma	6
Total general	38

9.2 Evaluación de HER2 por Hibridación Fluorescente in situ (FISH)

Al igual que para Inmunohistoquímica se realizó el análisis de la amplificación del gen *HER2* siguiendo los criterios de evaluación para cáncer de mama (Wolf, 2013), los cuales se mencionan en la siguiente tabla.

Tabla 6. Criterios de evaluación de HER2 por *Hibridación Fluorescente in situ*

HER2/CEP17	
Positivo	Negativo
Cociente > 2	Cociente ≤ 2
Promedio del número de copias de HER2 entre el número de señales del centrómero	Promedio del número de copias de HER2 entre el número de señales del centrómero

En este caso se llevó a cabo el análisis de noventa y cinco muestras siguiendo estrictamente los criterios antes mencionados. En esta evaluación se consideraron veinticinco muestras positivas para amplificación, es decir, presentaron un cociente >2 (Figura 6), por lo que con base en el resultado podemos considerar que estas muestras representan el 26.31% de los casos analizados.

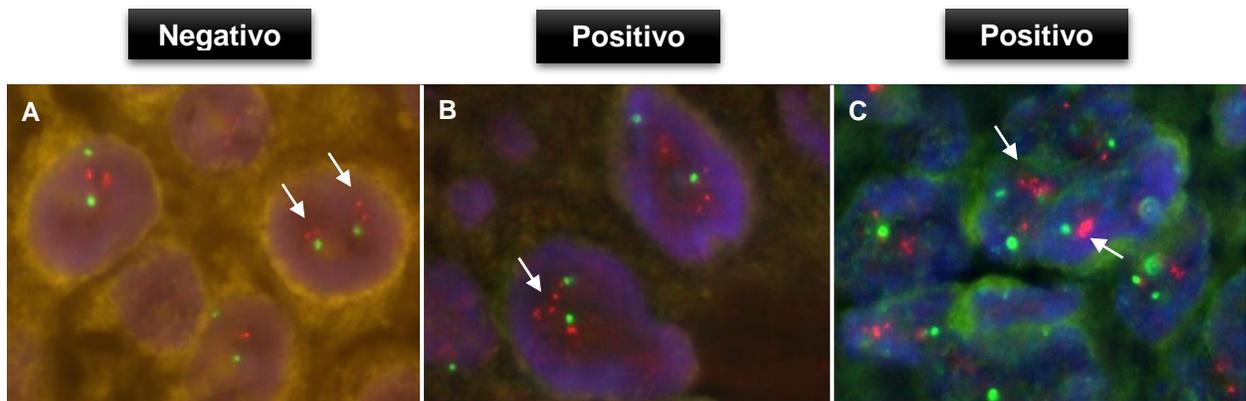


Figura 6. Muestras positivas para amplificación del gen *HER2*. **A.** Muestra negativa, se pudo observar en la mayoría de las células una expresión normal, es decir, se observaron dos señales en verde del centrómero y cuatro señales en rojo de *HER2* (flechas blancas). **B.** Muestra considerada como positiva, se puede observar dos señales del centrómero (verde) y más de cuatro señales de *HER2* (rojo) por lo que el cociente final es >2 . **C.** Muestra considerada como positiva, se pueden observar pequeños grupos (rojo), lo que indica múltiples señales de *HER2*.

Es importante mencionar que en algunas muestras se observó amplificación de alto nivel, es decir, en el análisis se determinó que la relación *HER2*/centrómero $17 > 2$ (Figura 7), ya que en pequeños grupos de células se observaron múltiples señales de la sonda (rojo) que pertenecen a *HER2*. Este comportamiento se observó en por lo menos diez de las positivas para amplificación.

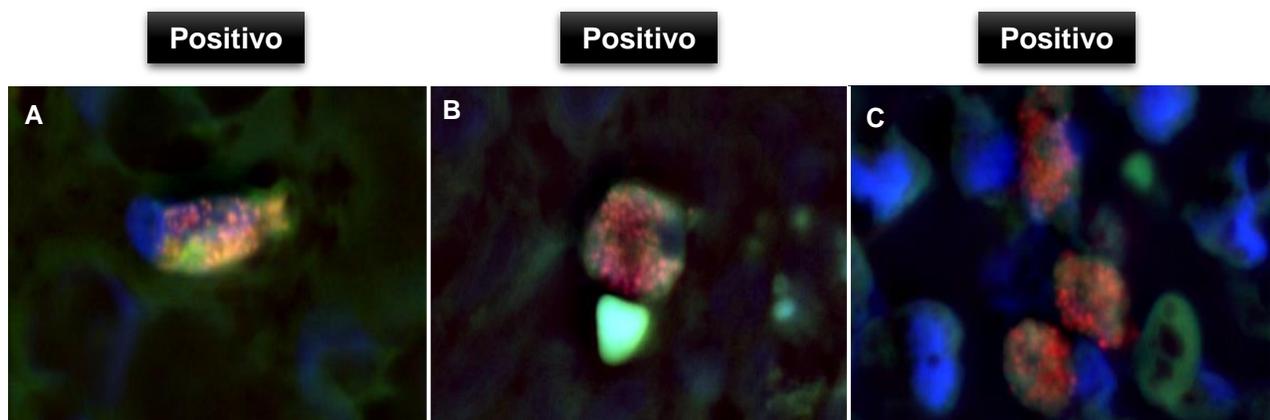


Figura 7. Muestras positivas para amplificación del gen *HER2*. En las tres muestras se puede observar múltiples señales de *HER2* (rojo), por lo que se consideraron como muestras con amplificación.

Por otro lado y una vez teniendo los resultados de ambas técnicas se llevó a cabo una comparación (Tabla 7) para determinar si existe alguna correlación entre la amplificación génica y la hiper-expresión de la proteína en cada una de las muestras. Únicamente seis de ellas fueron positivas para ambas, amplificación e hiper-expresión de *HER2*.

Tabla 7. Comparación de resultados de Inmunohistoquímica y FISH

HER2 POSITIVAS		
Muestra	Inmunohistoquímica	FISH
13-07206	+++ Positivo	Cociente >2 Amplificado
13-07208	+++ Positivo	Cociente >2 Amplificado
13-07753-2	++ Indeterminado	Cociente >2 Amplificado
13-10759	+++ Positivo	Cociente >2 Amplificado
13-13115	++ Indeterminado	Cociente >2 Amplificado
13-14562	++ Indeterminado	Cociente >2 Amplificado

Así mismo se llevó a cabo un análisis dirigido a investigar la discordancia o concordancia entre los resultados obtenidos en Inmunohistoquímica y FISH respectivamente (Tabla 8).

Para este análisis se tomaron en cuenta 90 muestras, ya que se descartaron las laminillas que no pudieron ser evaluadas por alguna de las dos pruebas IHQ y FISH. Obteniendo discordancia en el 50% de las muestras que fueron +++ positivas en IHQ y en el 27.02% de las muestras que fueron FISH positivas.

Tabla 8. Comparación de los resultados de IHQ y FISH.

	FISH + (n=26)	FISH - (n=64)	Concordancia IHQ	Discordancia IHQ
HER2 +++ (n=6)	3	3	(3/6) 50%	(3/6) 50%
HER2 ++ (n=10)	3	7	(3/10) 30%	(7/10) 70%
HER2 +,0 (n=74)	20	54	(54/74) 72.98%	(20/74) 27.02%

9.3 Análisis de mutaciones por secuenciación

Con el objetivo de determinar la presencia de mutaciones en cada una de las muestras de cáncer cervicouterino se realizó la extracción de DNA de tejido incluido en parafina de 34 muestras, del cual se realizó la amplificación por PCR del exón 12 (Figura 8). Para la amplificación se consideró a un donador sano como control positivo.

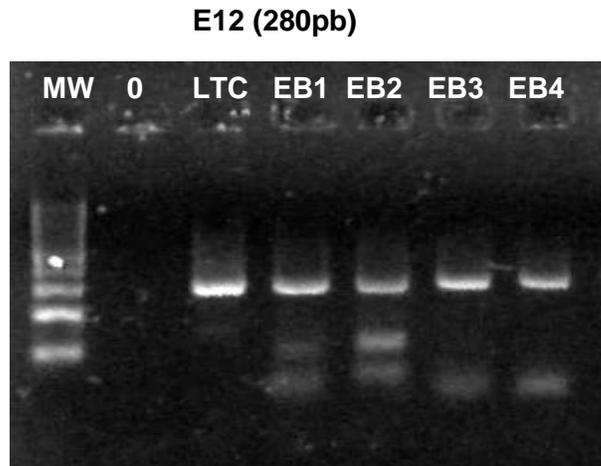
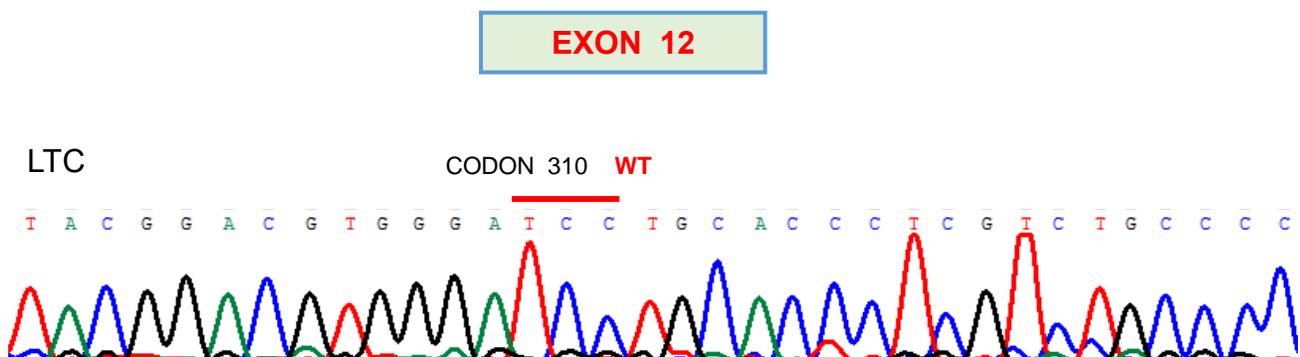


Figura 8. Electroforesis del PCR de los exones 12 y 25 del gen *HER2*. **MW.** Marcador de peso molecular. **0.** Control negativo. **LTC.** Donador sano (control positivo). **EB1.** Muestra 13-00011. **EB2.** Muestra 13-00330. **EB3.** Muestra 13-00621. **EB4.** Muestra 13-01214

Una vez obtenidos los productos de PCR se llevó a cabo la secuenciación del exón 12 en el cual se analizaron las mutaciones S310F TCC> TTC, S310Y TCC> TAC (Figura 9). Las secuencias obtenidas se compararon con la secuencia de referencia del GenBank NG_007503.1.

Todas las muestras resultaron negativas para las mutaciones antes mencionadas, es decir, todas las muestras son silvestres.



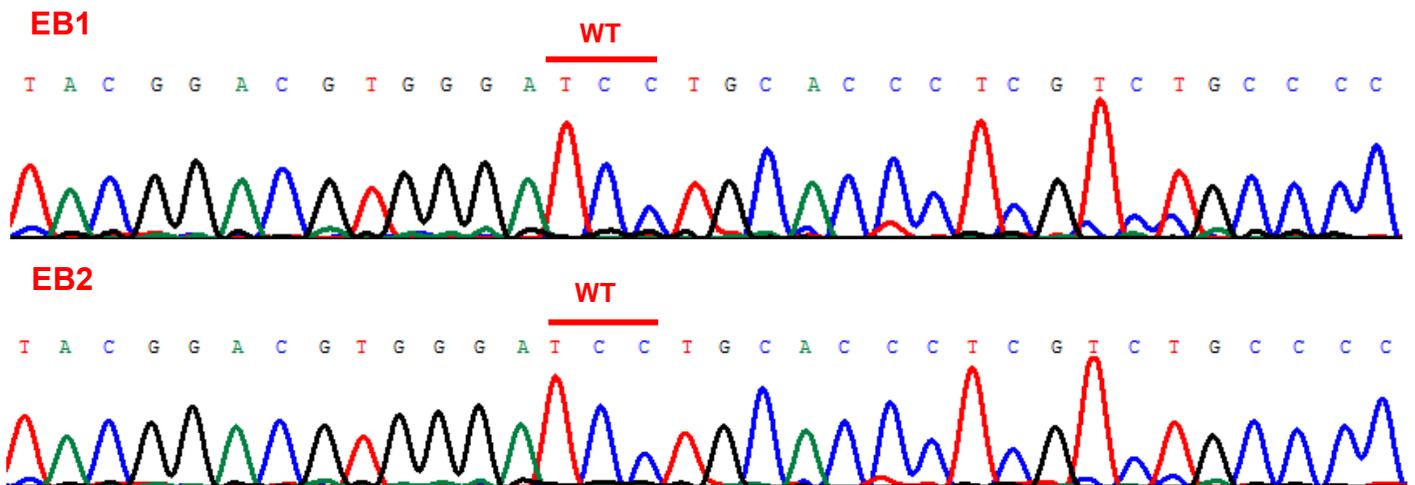


Figura 9. Electroferogramas obtenidos para el exón 12. **LTC.** Donador sano (control positivo). **EB1.** Muestra 13-00011 codón wild type. **EB2.** Muestra 13-00330 codón wild type.

Si bien ninguna de las 34 muestras presentó las mutaciones antes mencionadas, en las muestras 13-01838-2 y 13-05297, se identificaron los siguientes polimorfismos:

- **13-01838-2:** ACC>ACT Thr 312 Thr
- **13-05297:** GTG>GTC Val 334 Val

Así mismo se encontraron dos mutaciones missense (Tabla 9. Muestras 13-01838-2 y 13-02939), ambas mutaciones fueron analizadas en el software POLYPHEN, el cual predice el posible impacto de las sustituciones de aminoácidos en la estabilidad y función de las proteínas. Este software indicó que las mutaciones identificadas no son patológicas.

Tabla 9. Comparación de los resultados de las tres técnicas

Muestra	IHQ	FISH (Her2/ cent7)*	SECUENCIA DEL EXON 12
13-00011	Negativo	Negativo	WT
13-00330	+ Negativo	Negativo	WT
13-00621	+ Negativo	Negativo	WT
13-01214	+ Negativo	Negativo	WT
13-01326	Negativo	Negativo	WT
13-01581	+ Negativo	Negativo	WT
13-01834	Negativo	Amplificado	WT
13-01838-2	Negativo	No evaluable	WT + ACC>ACT Thr312Thr + AAG>AAT Lys 336 Asn + CCC>ACC Pro 337 Thr
13-01916	+ Negativo	Negativo	WT + A>G IVS12+55
13-01917	+ Negativo	Negativo	WT
13-02047	Negativo	Negativo	WT + T>C IVS12-28
13-02228	+ Negativo	Negativo	WT
13-02363	+ Negativo	Negativo	WT
13-02663	+ Negativo	Negativo	WT
13-02668	Negativo	Amplificado	WT
13-02795-1	Negativo	Negativo	WT
13-02848-1	+ Negativo	Negativo	WT

13-02939	+ Negativo	Negativo	WT + AAG>AAT Lys 336 Asn + CCC>ACC Pro 337 Thr
13-03148	+ Negativo	Amplificado	WT
13-03396	Negativo	Amplificado	WT
13-04128-2	Negativo	Negativo	WT
13-05199	Negativo	Amplificado	WT
13-05297	Negativo	Negativo	WT + GTG>GTC Val 334 Val
13-05302-2	Negativo	Negativo	WT
13-05395	Negativo	Negativo	WT
13-05489-1	Negativo	Negativo	WT
13-05570	Negativo	Negativo	WT
13-06478	Negativo	Amplificado	WT
13-06529	Negativo	Negativo	WT
13-06870	Negativo	Negativo	WT
13-06872	Negativo	Negativo	WT
13-07206-1	+++ Positivo	Amplificado	WT
13-07208-1	+++ Positivo	Amplificado	WT
13-08663	Negativo	Negativo	WT

10. DISCUSIÓN

El gen *HER2* está localizado en el brazo largo del cromosoma 17, que codifica una glicoproteína de 185 kDa, la cual es un receptor tirosina cinasa que en condiciones patológicas se ha asociado con la activación de múltiples vías de señalización relacionadas con la supervivencia y proliferación celular.

Se ha identificado que las pacientes con cáncer de mama que son positivas para amplificación y para hiper-expresión de HER2 se vinculan con un mal pronóstico, por lo que la evaluación del estado de HER2 es esencial para determinar a los pacientes que pueden ser beneficiados con los tratamientos anti-HER2. La evaluación clínica de HER2 se realiza habitualmente en muestras embebidas en parafina y se utilizan kits avalados por la FDA para el diagnóstico de los pacientes HER2 positivos, en esta evaluación se realiza un análisis por Inmunohistoquímica para determinar la hiper-expresión de la proteína o FISH (*Hibridación Fluorescente in situ*) para determinar la amplificación génica.

Se ha reportado que la mayoría de los carcinomas de mama (90%-95%) que hiper-expresan HER2 es resultado de la amplificación del gen localizado en el cromosoma 17 (**Nassar, 2014**). En los resultados obtenidos en el presente trabajo se pudo determinar que únicamente seis de las muestras presentan la correlación antes mencionada (Tabla 7), el resto de ellas fueron positivas para amplificación pero negativas para hiper-expresión.

Sin embargo y a pesar de que en cáncer de mama se tiene una correlación bien definida entre amplificación e hiper-expresión existen casos de carcinomas con hiper-expresión en ausencia de amplificación génica, lo que representa aproximadamente el 3% de los casos **(Nassar, 2014)**.

El alto porcentaje en la correlación entre la amplificación génica y la hiper-expresión de HER2 en cáncer de mama dejan a un lado los casos que presentan hiper-expresión sin amplificación.

Hasta el momento son pocos los estudios que han intentado dilucidar estos resultados y se ha planteado que los pacientes que son positivos para la amplificación de *HER2* por FISH pero negativos para IHQ tienen una peor supervivencia que los pacientes que hiper-expresan el receptor en ausencia de amplificación ya que la amplificación génica se relaciona con la progresión lo que indica que este fenómeno puede ser un factor importante en el desarrollo de la enfermedad **(Slamon, 1987)**. Por otro lado la hiper-expresión proteica sin amplificación génica es clínicamente relevante ya que evita que los pacientes puedan recibir una terapia dirigida contra HER2.

Al igual que en cáncer de mama recientemente se aprobó el uso de Trastuzumab en cáncer gástrico ya que numerosos estudios han reportado que HER2 puede estar amplificado o hiperexpresado en esta patología.

En cáncer gástrico algunos estudios observaron amplificación de *HER2* en el 12% de 131 adenocarcinomas gástricos **(Tanner, et al. 2005)** y 24% en 100 tumores gastroesofágicos **(Takehana, et al. 2002)** , así como el 27% en otro estudio donde

analizaron 200 tumores **(Yano, et al. 2004)** en el segundo estudio Takehana determinó que la presencia de amplificación de *HER2* se asoció significativamente con una peor supervivencia ya que la mediana de supervivencia de los pacientes con cáncer *HER2* negativo fue dos veces mayor que la de los pacientes con amplificación génica.

Esto es relevante ya que en los estudios antes mencionados se reportan porcentajes similares a los obtenidos en el presente estudio, ya que se obtuvo que el 26.31% de las muestras de cáncer de cérvix presentan amplificación de *HER2*, por lo que con base en los reportes esta amplificación podría estar participando en procesos de progresión celular.

Sin embargo 18 de las muestras fueron positivas para amplificación sin presencia de hiper-expresión de la proteína.

En cáncer de mama se ha mencionado en algunos reportes sobre la discordancia entre hiper-expresión y amplificación, pero la razón aún sigue siendo controversial. Esta discordancia puede deberse a múltiples factores incluidos el proceso de fijación del tejido, la variabilidad en las técnicas realizadas en estos estudios y diferencias en los criterios de puntuación con considerable variabilidad entre los observadores **(Singhai, 2011)**.

Para evitar la variabilidad en los resultados, en el presente estudio se llevó a cabo el análisis de las muestras con kits avalados por la FDA y en laboratorios certificados para el diagnóstico de las pacientes *HER2* positivas, sin embargo observamos

discordancia en el 50% de las muestras que fueron +++ positivas en IHQ y en el 27.02% de las muestras que fueron FISH positivas (Tabla 8), esto puede deberse a que los mecanismos moleculares que llevan a la hiper-expresión y amplificación en cáncer de mama y cáncer gástrico son diferentes a los mecanismos en cáncer de cérvix, por lo que se requiere un análisis en modelos de líneas celulares con concordancia y discordancia entre ambas técnicas con la finalidad de explicar por qué se tienen este tipo de comportamientos en cáncer cervical.

Por otro lado en el análisis de hiper-expresión por inmunohistoquímica se determinó que 32 de las muestras presentaron algún tipo de hiper-expresión, ya fuera +, ++ o +++ en ausencia de amplificación. En términos generales un aumento en los niveles de mRNA en ausencia de amplificación génica podría ser causado por un incremento en la transcripción o desregulación en los eventos post-transcripcionales, un cambio en el transporte citoplasma-núcleo o un cambio en la adición de la cola poli-A (**Miller, et al. 1995**).

En los resultados del análisis descriptivo de la hiper-expresión de HER2 se determinó que la expresión de la proteína estaba localizada en la membrana y en la mayoría de los casos en el citoplasma. Es importante recordar que HER2 es una proteína anclada a la membrana plasmática y que los tratamientos anti-HER2 están diseñados para unirse al dominio extracelular de la proteína, por lo que la localización citoplásmica del receptor es de poca relevancia clínica.

En la actualidad no hay datos disponibles sobre la función biológica de HER2 citoplásmico en cáncer de mama, sin embargo en cáncer colorrectal algunos reportes han sugerido que HER2 citoplásmico podría estar asociado con la supervivencia. Además es importante mencionar que se plantea la hipótesis de que la presencia de HER2 en el citoplasma puede ser un factor pronóstico ya que puede ser un marcador temprano en cáncer colorrectal **(Demirbas, 2006)**.

Se había sugerido que la presencia de HER2 en el citoplasma es gracias a la escisión del dominio extracelular, por lo que la proteína identificada en esta región era de 155 kDa, en contraste con la de 185 kDa encontrada en la membrana **(Blok, et al. 2013)**. Sin embargo hay observaciones de que el péptido de 185 kDa está localizado en ambas fracciones y además se detectaron residuos de tirosina fosforilados (activos) lo que indica que el receptor HER2 está activo intracelularmente **(Kapitanovic, 1997)**.

Half et al. analizaron la localización de HER2 mediante microscopia electrónica, localizando a HER2 en el retículo endoplásmico rugoso, lo que sugiere péptidos recién sintetizados y no internalizados.

También una posible teoría es que el mRNA de HER2 después de traducirse en proteína no se maneja adecuadamente el retículo endoplásmico lo que conduce a un mal plegamiento de la proteína, por lo que el aparato de Golgi no es capaz de madurar la proteína o no puede ser transportada al aparato de Golgi lo que provoca una acumulación de HER2 aberrante en el citoplasma **(Blok, et al. 2013)**.

La identidad de HER2 citoplásmico sigue sin estar clara y se necesita un estudio extenso que use técnicas estandarizadas en un gran número de tumores para dilucidar esta cuestión.

Finalmente para la evaluación de las mutaciones del gen *HER2* identificadas en el exón 12, se pudo determinar que los polimorfismos identificados en las muestras 13-01838-2 y 13-05297 y las mutaciones missense de las muestras 13-01838-2 y 13-02939, están presentes en muestras sin amplificación génica, lo que es algo esperado ya que la amplificación génica y las mutaciones son mutuamente excluyentes (Chmielecki, *et al.*, 2014).

11. CONCLUSIONES

Este es el primer estudio en la literatura que demuestra que las alteraciones de HER2 son comunes en el carcinoma cervicouterino, observándose algún nivel de hiper-expresión en el 38% de los casos, y que si bien esta expresión no se observó principalmente en la membrana plasmática, no podemos descartar que la presencia de HER2 en el citoplasma tenga alguna participación en la biología celular de esta patología.

En el caso de la amplificación de HER2 se observó que ocurre en el 26.31% de los casos, y que hay discordancia entre la hiper-expresión proteica y la amplificación de este gen.

Por otra parte, aunque nuestro análisis hasta el momento cubre el exón 12 en algunos de los casos analizados, demuestra que las mutaciones parecen ser raras ya que no

encontramos hasta el momento alguna mutación, y sugiere, como lo reportado en la literatura que las mutaciones y amplificación son mutuamente excluyentes ya que la mayoría de los casos amplificados fueron negativos para la mutación.

12. PERSPECTIVAS

Se contempla completar el análisis mutacional pero sobre todo, realizar la correlación clinicopatológica incluyendo el efecto de las alteraciones de HER2 con la supervivencia en este grupo de pacientes. Al completar este trabajo podremos conocer la significancia clínica de las alteraciones del gen, y nos permitirá proponer un estudio clínico utilizando alguna terapia anti-HER2 en pacientes con carcinoma cervicouterino, además permitirá diseñar estudios posteriores para analizar los mecanismos moleculares por los cuales existe discordancia entre la expresión proteica y amplificación del HER2 en esta neoplasia.

13. BIBLIOGRAFÍA

1. Acharya S. Activating mutations and senescence secretome: new insights into HER2 activation, drug sensitivity and metastatic progression. *Breast Cancer Res* 2013; 15:309-311.
2. Albertson, Donna G. Gene amplification in cáncer. *Trends in Genetics* Vol.22 No.8 August 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tig.2006.06.007>
3. American Cancer Society. Cáncer de Cuello Uterino. Información general sobre los tratamientos.
<http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdecuellouterino/guiadetallada> 15 de abril de 2016
4. Balz L.M., Bartkowiak K., Andreas A., Pantel K., Niggemann B., Zanker K.S., Brandt B.H., Dittmar T. The interplay of her2/her3/pi3k and egfr/her2/plc-gamma1 signalling in breast cancer cell migration and dissemination. *J. Pathol.* 2012; 227:234–244. doi: 10.1002/path.3991.
5. Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A, Lordick F, Ohtsu A, Omuro Y, Satoh T, et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet.* 2010; 376:687–697.
6. Bargmann CI, Hung MC & Weinberg RA 1986 The Neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. *Nature* 319 226–230.
doi:10.1038/319226a0

7. Barrera JB, González JM, Foncillas JG, Cardoso FP. (2007). Células madre y cáncer: dilucidando el origen de la célula madre tumoral. *Rev. Univ. Navarra*. 51:14-17.
8. Baselga José, Sandra M. Swain. Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. *Nature Reviews Cancer* 9, 463–475 (2009)
DOI: 10.1038/nrc2656
9. Blok Erik J, Peter JK Kuppen, Jeroen EM van Leeuwen, Cornelis FM Sier. Cytoplasmic Overexpression of HER2: a Key Factor in Colorectal Cancer. *Clin Med Insights Oncol*. 2013; 7: 41–51.
10. Chan Richard, William R. Hardy, Michael A. Laing, Sarah E. Hardy, William J. Muller. The Catalytic Activity of the ErbB-2 Receptor Tyrosine Kinase Is Essential for Embryonic Development. *Molecular and Cellular Biology*, Feb. 2002, p. 1073–1078. DOI: 10.1128/MCB.22.4.1073–1078.2002
11. Chavez-Blanco A, Perez-Sanchez V, Gonzalez-Fierro A, Vela-Chavez T, Candelaria M, Cetina L, et al. HER2 expression in cervical cancer as a potential therapeutic target. *BMC Cancer* 2004; 4:59-65.
12. Chmielecki J, Ross JS, Wang K, Frampton GM, Palmer GA, Ali SM, Palma N, Morosini D, Miller VA, Yelensky R, Lipson D, Stephens PJ. Oncogenic alterations in ERBB2/HER2 represent potential therapeutic targets across tumors from diverse anatomic sites of origin. *Oncologist* 2014; 20:7-12.
13. Citri Ami, Kochupurakkal Bose Skaria, Yosef Yarden. The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3. *Experimental Cell Research* 284 (2003) 54–65. doi:10.1016/S0014-4827(02)00101-5

14. Conesa Zamora Pablo, Torres Moreno Daniel, Pérez Guillermo Miguel, Gene amplification and immunohistochemical expression of ERBB2 and EGFR in cervical carcinogenesis. Correlation with cell-cycle markers and HPV presence. *Experimental and Molecular Pathology* 95 (2013) 151–155
15. Coussens Lisa, Teresa L. Yang-Feng, Yu-Cheng Liao, Ellson Chen, Alane Gray, John McGrath, Peter H. Seeburg, Towia A. Libermann, Joseph Schlessinger, Uta Francke. Tyrosine Kinase Receptor with Extensive Homology to EGR Receptor Shares Chromosomal Location with neu Oncogene. *Science*. 1985 Dec 6;230(4730):1132-9
16. Demirbas S, Sucullu I, Yildirim S, Celenk T. Influencia de los marcadores de proteína c-erb B-2, nm23, bcl-2 y p53 en el cáncer colorrectal. *Turk J Gastroenterol*. 2006; 17 (1): 13-9.
17. Elizalde Patricia V, et al. ErbB-2 nuclear function in breast cancer growth, metastasis and resistance to therapy. *Endocrine-Related Cancer* (2016) 23, T243–T257.
18. Engelman JA. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer* 2009; 9:550–62.
19. Fleishman Sarel J, Joseph Schlessinger, Nir Ben-Tal. A putative molecular-activation switch in the transmembrane domain of erbB2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Dec 10; 99(25): 15937–15940. doi:10.1073/pnas.252640799.
20. Garee Jason P., Christopher D. Chien, Jordan V. Li, Anton Wellstein, Anna T. Regulation of HER2 Oncogene Transcription by a Multifunctional Coactivator/Corepressor Complex. *Mol Endocrinol*. 2014 Jun; 28(6): 846–859

21. Globocan 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx
22. Grushko TA, Filiaci VL, Mundt AJ, Ridderstrale K, Olopade OI, Fleming GF, et al. An exploratory analysis of HER-2 amplification and overexpression in advanced endometrial carcinoma: a gynecologic oncology group study. *Gynecol Oncol* 2008; 108:3–9.
23. Gullick WJ, Berger MS, Bennett PL, Rothbard JB, Waterfield MD. Expression of the c-erbB-2 protein in normal and transformed cells. *Int J Cancer* 1987; 40:246-54.
24. Half E, Broaddus R, Danenberg KD, Danenberg PV, Ayers GD, Sinicrope FA. HER-2 receptor expression, localization, and activation in colorectal cancer cell lines and human tumors. *Int J Cancer*. 2004; 108:540–8.
25. Hynes Nancy E., A. Lane Heidi, ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nature Rev. Cancer* 5, 341–354 (2005). doi:10.1038/nrc1609
26. Iqbal N, Iqbal N. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in cancers: overexpression and therapeutic implications. *Mol Biol Int* 2014; 2014:852748.
27. Izumi, Y., Xu, L., di Tomaso, E., Fukumura, D., Jain, R. K. Tumor biology: Herceptin acts as an anti-angiogenic cocktail. *Nature* 416, 279–280 (2002).
28. Kapitanovic S, Radosevic S, Kapitanovic M, et al. The expression of p185 (HER-2/neu) correlates with the stage of disease and survival in colorectal cancer. *Gastroenterology*. 1997;112 (4):1103–13.

29. Kavuri Shyam M., Naveen Jain et al., HER2 activating mutations are targets for colorectal cancer treatment. *Cancer Discov.* 2015 August; 5(8): 832–841. doi:10.1158/2159-8290.CD-14-1211.
30. Moriki, T., Maruyama, H., Maruyama, I.N. Activation of preformed EGF receptor dimers by ligand-induced rotation of the transmembrane domain. *J. Mol. Biol.* 2001; 311: 1011–1026
31. Landau Meytal, Sarel J. Fleishman, Nir Ben-Ta. A Putative Mechanism for Downregulation of the Catalytic Activity of the EGF Receptor via Direct Contact between Its Kinase and C-Terminal Domains. *Structure*, Vol. 12, 2265–2275, December, 2004. DOI 10.1016/j.str.2004.10.006
32. Le, X. et al. Anti-HER2 antibody trastuzumab inhibits CDK2-mediated nPAI and histone H4 expression via the PI3K pathway. *Cell Cycle* 5, 1654–1661 (2006).
33. Lee K.F, H. Simon, H. Chen, B. Bates, M.C. Hung, C. Hauser. Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development, *Nature* 378 (1995) 394–398
34. Lei YY, Huang JY, Zhao QR, Jiang N, Xu HM, Wang ZN, Li HQ, Zhang SB, Sun Z. The clinicopathological parameters and prognostic significance of HER2 expression in gastric cancer patients: a meta-analysis of literature. *World J Surg Oncol.* 2017 Mar 21;15 (1):68. doi: 10.1186/s12957-017-1132-5
35. Lesnikova I, Lidang M, Hamilton-Dutoit S, Koch J. HER2/neu (c-erbB-2) gene amplification and protein expression are rare in uterine cervical neoplasia: a tissue microarray study of 814 archival specimens. *APMIS* 2009; 117:737–45.

36. Lin WL, Kuo WH, Chen FL, Lee MY, Ruan A, Tyan YS, et al. Identification of the coexisting HER2 gene amplification and novel mutations in the HER2 protein overexpressed mucinous epithelial ovarian cancer. *Ann Surg Oncol* 2011; 18: 2388–94.
37. Longva, K. E., Pedersen, N. M., Haslekås, C., Stang, E., Madshus, I. H. Herceptin-induced inhibition of ErbB2 signaling involves reduced phosphorylation of Akt but not endocytic down-regulation of ErbB2. *Int. J. Cancer* 116, 359–367 (2005).
38. LoRusso Patricia M., Denise Weiss, Ellie Guardino, Sandhya Girish, Mark X. Sliwkowski. Trastuzumab Emtansine: A Unique Antibody-Drug Conjugate in Development for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Positive Cancer. *Clin Cancer Res*; 17(20) October 15, 2011. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-0762
39. Mark HF, Feldman D, Das S, Sun CL, Samy M, Lathrop J. HER-2/neu oncogene amplification in cervical cancer studied by fluorescent in situ hybridization. *Genet Test* 1999; 3:237-42.
40. Miller Susan J., Mien-Chie Hung. Regulation of HER2/neu gene expression (Review). *ONCOLOGY REPORTS* 2: 497-503, 1995.
41. Mitra AB, Murty VV, Pratap M, Sodhani P, Chaganti RS. ERBB2 (HER2/neu) oncogene is frequently amplified in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Cancer Res* 1994; 54:637-9.
42. Morrison C, Zanagnolo V, Ramirez N, Cohn DE, Kelbick N, Copeland L, et al. HER-2 is an independent prognostic factor in endometrial cancer: association

- with outcome in a large cohort of surgically staged patients. *J Clin Oncol* 2006; 24:2376–85.
43. Niibe Y, Nakano T, Ohno T, Suzuki Y, Oka K, Tsujii H. Prognostic significance of c-erbB-2/HER2 expression in advanced uterine cervical carcinoma with para-aortic lymph node metastasis treated with radiation therapy. *Int J Gynecol Cancer* 2003; 13:849-55.
44. Ogiso Hideo, Ryuichiro Ishitani, Osamu Nureki, Shuya Fukai, Mari Yamanaka, Jae-Hoon Kim, Kazuki Saito, Ayako Sakamoto, Mio Inoue, Mikako Shirouzu, Shigeyuki Yokoyama. Crystal Structure of the Complex of Human Epidermal Growth Factor and Receptor Extracellular Domains. *Cell*, Vol. 110, 775–787, September 20, 2002.
45. Ojesina AI, Lichtenstein L, Freeman SS, et al. Landscape of genomic alterations in cervical carcinomas. *Nature* 2014; 506 (7488):371-5.
46. Organización Mundial de la Salud. Datos y cifras. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
47. Ozcelik C, B. Erdmann, B. Pilz, N. Wettschureck, S. Britsch, N. Hubner, K.R. Chien, C. Birchmeier, A.N. Garratt. Conditional mutation of the ErbB2 (HER2) receptor in cardiomyocytes leads to dilated cardiomyopathy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002) 8880–8885.
48. Park Song-Kyu, Robert Miller, Ian Krane, Timothy Vartanian. The erbB2 gene is required for the development of terminally differentiated spinal cord oligodendrocytes. *J Cell Biol.* 2001 Sep 17; 154(6): 1245–1258.
doi: 10.1083/jcb.200104025

49. Pauletti Giovanni, Suganda Dandekar, HongMei Rong, Lillian Ramos, HongJun Peng, Ram Seshadri, Dennis J. Slamon. Assessment of Methods for Tissue-Based Detection of the HER-2/neu Alteration in Human Breast Cancer: A Direct Comparison of Fluorescence In Situ Hybridization and Immunohistochemistry. *Journal of Clinical Oncology*, Vol 18, No 21 (November 1), 2000: pp 3651-3664
50. Perez-Regadera J, Sanchez-Munoz A, De-la-Cruz J, Ballestin C, Lora D, Garcia- Martin R, et al. Negative prognostic impact of the coexpression of epidermal growth factor receptor and c-erbB-2 in locally advanced cervical cancer. *Oncology* 2009; 76:133–41.
51. Phillips Gail D. Lewis, Guangmin Li, Debra L. Dugger, Lisa M. Crocker, Kathryn L. Parsons, Elaine Mai, Walter A. Blattler, John M. Lambert, Ravi V.J. Chari, Robert J. Lutz, Wai Lee T. Wong, Frederic S. Jacobson, Hartmut Koeppen, Ralph H. Schwall, Sara R. Kenkare-Mitra, Susan D. Spencer, Mark X. Sliwkowski. Targeting HER2-Positive Breast Cancer with Trastuzumab-DM1, an Antibody–Cytotoxic Drug Conjugate. *Cancer Res* 2008; 68: (22). November 15, 2008
52. Quesnelle K.M., Boehm A.L., Grandis J.R. Stat-mediated egfr signaling in cancer. *J. Cell. Biochem.* 2007; 102:311–319. doi: 10.1002/jcb.21475.
53. Quirke P, Pickles A, Tuzi NL, Mohamdee O, Gullick WJ. Pattern of expression of c-erbB-2 oncoprotein in human fetuses. *Br J Cancer* 1989; 60:64-9.
54. Rad Ellie, James T. Murray, Andrew R. Tee. Oncogenic Signalling through Mechanistic Target of Rapamycin (mTOR): A Driver of Metabolic Transformation

- and Cancer Progression. *Cancers (Basel)*. 2018 Jan 3; 10(1). pii: E5. doi: 10.3390/cancers10010005.
55. Roskoski Jr R. RAF protein-serine/threonine kinases: structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 399:313–7.
56. Roskoski Jr R. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res* 2012; 66:105–43.
57. Roskoski Robert, The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cáncer. *Pharmacological Research* 79 (2014) 34–74
58. Ross Jeffrey S., Kai Wang, et al. *Clin Cancer Res*; 20(1) January 1, 2014. DOI: 10.1158/1078-0432
59. Sandhu Rupninder, MBBS, Joel S. Parker, MS, Wendell D. Jones, PhD, Chad A. Livasy, MD, William B. Coleman, PhD. Microarray-Based Gene Expression Profiling for Molecular Classification of Breast Cancer and Identification of New Targets for Therapy. *LabMedicine* Volume 41 Number 6 June 2010. DOI: 10.1309/LMLIKOVIE3CJK0WD
60. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 1987; 235:177–182.
61. Secretaría de Salud. Programa de Acción Específico Prevención y Control del Cáncer de la Mujer 2013 – 2018. Información Estadística. http://www.cnegsr.salud.gob.mx/contenidos/Programas_de_Accion/Cancerdel aMujer/CaCu/introduccion.html

62. Serrano-Olvera A, Duenas-Gonzalez A, Gallardo-Rincon D, Candelaria M, De la Garza-Salazar J. Prognostic, predictive and therapeutic implications of HER2 in invasive epithelial ovarian cancer. *Cancer Treat Rev* 2006; 32:180–90.
63. Shimobayashi, M.; Hall, M.N. Making new contacts: The mTOR network in metabolism and signalling crosstalk. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2014, 15, 155–162.
64. Siddiqui, N., Sonenberg, N. Signalling to eIF4E in cancer. *Biochem. Soc. Trans.* 2015, 43, 763–772.
65. Singhai Rajeev, VW Patil, AV Patil. Immunohistochemical (IHC) HER-2/neu and Fluorescent In-Situ Hybridization (FISH) Gene Amplification of Breast Cancer in Indian Women. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, Vol 12, 2011
66. Spector, N. L. et al. A study of the biological effects of lapatinib (GW572016), a reversible inhibitor of ErbB1 and ErbB2 tyrosine kinases, on tumor growth and survival pathways in patients with advanced malignancies. *J. Clin. Oncol.* 23, 2502–2512 (2005)
67. Stern Howard M. Improving Treatment of HER2-Positive Cancers: Opportunities and Challenges October 9, 2012 *Science Translational Medicine* 28 March 2012 Vol. 4
68. Takehana T, Kunimoto K, Kono K, et al. Status of c-erbB-2 in gastric adenocarcinoma: a comparative study of immunohistochemistry, fluorescence in situ hybridization and enzyme-linked immuno-sorbent assay, *Int J Cancer* , 2002, vol. 98 (pg. 833-837)

69. Tanner M, Hollmen M, Junttila TT, et al. Amplification of HER-2 in gastric carcinoma: association with topoisomerase IIa gene amplification, intestinal type, poor prognosis and sensitivity to trastuzumab, *Ann Oncol* , 2005, vol. 16 (pg. 273-278)
70. Vanhaesebroeck B, Stephens L, Hawkins P. PI3K signalling: the path to discovery and understanding. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; 13:195–203.
71. Weigelt B, Reis-Filho JS. Activating mutations in HER2: new opportunities and new challenges. *Cancer Discov* 2013; 3:145-7.
72. Wieduwilt MJ, Moasser MM. The epidermal growth factor receptor family: biology driving targeted therapeutics. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65:1566-84.
73. Wolf et al., Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol* 2013; 31:3997-40 2013.
74. Yano T, Ochiai A, Doi T, et al. Expression of HER2 in gastric cancer: comparison between protein expression and gene amplification using a new commercial kit, *J Clin Oncol* , 2004, vol. 22 pg. 14S (Abstr 4053)
75. Yarden Yosef, Gur Pines. The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology. *Nature Reviews Cancer* 12, 553–563 (2012). doi:10.1038/nrc3309
76. Yarden Yosef, Mark X. Sliwkowski. Untangling the ErbB signalling network. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 127–137 (2001)



Detección de alteraciones del gen *HER2* en muestras de pacientes con cáncer cervicouterino

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 28 del mes de febrero del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. JAVIER ESTEBAN JIMENEZ SALAZAR
DRA. ALMA DELIA CHAVEZ BLANCO
DR. JOSE DE LA LUZ DIAZ CHAVEZ
DRA. MARIA GUADALUPE ISABEL DOMINGUEZ GOMEZ



[Signature]
NORMA LETICIA MORENO SORIANO
ALUMNA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL
DE: NORMA LETICIA MORENO SORIANO

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

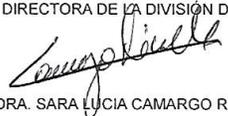
REVISÓ



LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS



DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE



DR. JAVIER ESTEBAN JIMENEZ SALAZAR

VOCAL



DRA. ALMA DELIA CHAVEZ BLANCO

VOCAL

JOSÉ DE LA LUZ DIAZ CH.
DR. JOSE DE LA LUZ DIAZ CHAVEZ

SECRETARIA



DRA. MARIA GUADALUPE ISABEL DOMINGUEZ GOMEZ