

Julio José Lambea Sorrosal

Sobreexpresion de receptores de
tirosina kinasa y de fosfatasas de
la proteina tirosina en carcinoma
de células renales como diana
terapéutica

Director/es

Tres Sanchez, Alejandro
Mayordomo Cámara, José Ignacio

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

SOBREEXPRESION DE RECEPTORES DE
TIROSINA KINASA Y DE FOSFATASAS DE LA
PROTEINA TIROSINA EN CARCINOMA DE
CÉLULAS RENALES COMO DIANA TERAPEÚTICA

Autor

Julio José Lambea Sorrosal

Director/es

Tres Sanchez, Alejandro
Mayordomo Cámara, José Ignacio

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

2007

Tesis Doctoral

Sobreexpresión de Receptores de Tirosina Kinasa y de Fosfatasas de la
Proteína Tirosina en Carcinoma de Células Renales como Diana
Terapéutica

Autor

Julio José Lambea Sorrosal

Directores

Alejandro Tres Sánchez
Jose Ignacio Mayordomo Cámara

Facultad de Medicina de Zaragoza
Año 2006

A mis padres, por su sacrificio constante y por la educación que me han dado, por ayudarme en todo momento a ser lo que soy.

A mi mujer Pilar, por ser el centro de mi vida, por animarme cada día, siendo modelo en su capacidad de sacrificio, por todo el cariño que me da.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Alejandro Tres, por su incondicional apoyo en el desarrollo de mi trabajo investigador, dándome la oportunidad de realizar mi tesis en uno de los centros más prestigiosos del mundo y por generar en mí un estímulo constante de superación, así como por la confianza que me presta.

Al Dr. Jose Ignacio Mayordomo, por su disponibilidad absoluta para ayudar, por ese don innato que tiene para la investigación y que tan bien sabe transmitir y por su optimismo contagioso.

Al Dr. Walter Storkus, que tanta admiración me produce, por su sencillez y cercanía, que contrasta con su brillantez científica y con su inmensa creatividad investigadora y por todas las facilidades que puso a mi disposición durante la realización de mis experimentos.

A la Dra. Carmen Visus (Mamen) por enseñarme a disfrutar de la investigación y por ser como una hermana para mí durante mi estancia en Pittsburgh.

A la Dra. Amy Wesa y al Dr. Lazar Vujanovic por su supervisión y su apoyo diario en mi estancia en el laboratorio.

Al resto de mis compañeros del Laboratorio del Dr. Storkus por ayudarme con una sonrisa todos los días en la realización de los experimentos.

A Iñaki Ezpeleta por su apoyo diario durante mi estancia en Pittsburgh y por su amistad, que me hizo sentir como si estuviera en mi casa.

A mis nuevos amigos de Pittsburgh, que fueron tan generosos compartiendo una pequeña parte de sus vidas conmigo en el tiempo en que inicié este trabajo.

Al personal del Servicio de Oncología Médica del Hospital Clínico de Zaragoza, por ayudarme a desarrollarme como buen profesional y por su trabajo constante.

A las Dras. Milagros Bernal, Blanca Conde y Elena Sinués por haber dejado huella como profesoras y amigas desde el inicio de mi carrera.

A mis amigos del Hospital Arnau de Vilanova de Lleida que me vieron nacer como médico.

A todas las personas que me han dado aliento en la realización de este trabajo, compañeros, amigos y en especial a mi hermano Jesús y a María Pilar (la madre de Pilar) por su apoyo.

Un agradecimiento especial a los pacientes enfermos de cáncer, que tanto sufren y que tanta confianza depositan en nosotros, por su esperanza de curación que es el motor de nuestro esfuerzo investigador.

INDICE

	Página
INTRODUCCION	1
Carcinoma de Células Renales	2
Clasificación celular	4
Aspectos generales de las opciones de tratamiento	5
Tratamiento del cáncer de células renales no avanzado	6
Tratamiento del cáncer de células renales en estadio IV	7
Tratamiento del cáncer recurrente de células renales	9
Bases moleculares	11
Receptores de tirosina kinasa	11
Introducción	11
Historia	12
Función de los receptores de tirosina kinasa	13
Estructura de los receptores de tirosina kinasa	14
Ligandos	16
Señalización	17
A. Dimerización	17
B. Autofosforilación	18
C. Fosforilación de sustratos	18
Naturaleza de los sustratos de los receptores de tirosina kinasa	19
La Cascada de señalización	20
A. Fosfolípidos	21
B. Mapquinasas	21

C. Vía de la proteinasa STAT	23
Receptores de tirosina kinasa y enfermedad	25
Familias de receptores de tirosina kinasa	25
EGFR	29
Estructura del receptor	30
Cascada de señalización	31
Ligandos	32
Efectores	32
HER-2	35
La proteína erbB-2 y sus agonistas	36
Tumores humanos con sobreexpresión de erbB-2	39
VEGF-R	39
Receptor MET	41
Receptor RON BETA	42
Receptor AXL	42
Fosfatasas de la proteína tirosina	43
Historia	43
Función	43
Tipos de fosfatasas	44

Regulación global del proceso	45
Correlación fenotipo-clínica	46
OBJETIVOS	48
MATERIAL Y MÉTODOS	50
Western-blot	51
Base de la técnica	51
Lisis celular	53
Preparación de la muestra	55
Geles utilizados	55
Dispensación de las muestras	56
Electroforesis	57
Transferencia	58
Detección	60
Anticuerpos	62
Elección del sistema de anticuerpos	62
Anticuerpos primarios	62
Anticuerpos secundarios	65

Inmunoluminiscencia	66
Sistema de densitometría Labworks	69
Líneas celulares	72
Manejo de las células y de los residuos	74
Técnica de cultivo de líneas celulares	74
Experimentos realizados	77
Determinación de expresión de EGFR	77
Determinación de expresión de HER-2	80
Determinación de expresión de VEGFR-1	82
Determinación de expresión de VEGFR-2	84
Determinación de expresión de MET	86
Determinación de expresión de AXL	88
Determinación de expresión de RON-BETA	90
Determinación de expresión de PDGFR-ALFA Y BETA	92
Determinación de expresión de TIE-1 Y TIE-2	92
Determinación de expresión de SH-PTP1	93
Determinación de expresión de PTP-1b	95
Determinación de expresión de LMW-PTP	97

Registro de experimentos	99
Análisis estadístico	99
RESULTADOS	101
Expresión de receptores de tirosina kinasa	103
Expresión de EGFR	103
Expresión de HER-2	105
Expresión de VEGFR-1	108
Expresión de VEGFR-2	110
Expresión de MET	112
Expresión de AXL	114
Expresión de RON-BETA	116
Expresión de fosfatasas de la proteína tirosina	118
Expresión de PTP-1b	118
Expresión de SH-PTP1	120
Expresión de LMW-PTP	122
Análisis comparativo	124
Análisis de líneas celulares	129

Análisis estadístico	134
Limitaciones del estudio	137
DISCUSION	138
Mecanismos de disregulación de los receptores de tirosina kinasa	139
Estrategias para utilizar tirosina-quinasas como diana terapéutica	140
Fosfatasas de la proteína tirosina como diana terapéutica	141
Método de identificación de dianas terapéuticas	143
Selección de pacientes candidatos a tratamiento	144
Aplicación al carcinoma de células renales	145
CONCLUSIONES	149
BIBLIOGRAFIA	151

INTRODUCCIÓN

CARCINOMA DE CÉLULAS RENALES

Cada año se diagnostican 36000 nuevos casos de carcinoma de células renales y fallecerán 12000 personas al año en Estados Unidos por esta enfermedad. En España se observa una incidencia de 4.1 a 4.5 / 100.000 habitantes. El grupo de edad de mayor incidencia es de la 6ª a la 7ª década de la vida [1]. Su incidencia está en aumento en todos los grupos de edad, sobre todo a expensas de tumores localizados debido a la detección precoz y hallazgos incidentales. Sin embargo, la incidencia de tumores avanzados, con afectación regional o a distancia, también aumenta; en estos casos la supervivencia a 5 años es del 8,9% y no se ha modificado en los últimos 20 años. Desafortunadamente este tumor puede presentarse con metástasis antes del diagnóstico en un número nada despreciable de casos. Pueden encontrarse metástasis por examen radiológico en un 25% de pacientes de nuevo diagnóstico.

El cáncer de riñón es una enfermedad resistente a los tratamientos actuales. Sólo un subgrupo limitado de pacientes se benefician del tratamiento estándar inmunoterápico: interleucina-2 o interferón. Hasta el momento no existe un tratamiento estándar para aquellos pacientes que no responden, que no son candidatos o que recidivan después del tratamiento con citoquinas.

Muchas veces el tumor es asintomático y se detecta como hallazgo incidental en estudios radiológicos. En algunos casos se objetiva una tríada sintomática clásica que consiste en dolor costovertebral, masa palpable y hematuria. Sin embargo esta triada sólo está presente en un 10% de casos. En otros casos aparecen síntomas constitucionales como fiebre, astenia, pérdida de peso. Se considera clásicamente el “tumor del internista” por la cantidad de patologías que puede mimetizar y la cantidad de síntomas no atribuibles a la afectación del riñón que puede producir.

El cáncer de células renales, también llamado adenocarcinoma renal o hipernefroma, a menudo puede curarse si se diagnostica y se trata cuando todavía está localizado en el riñón y en el tejido circundante inmediato. La probabilidad de curación está directamente relacionada con el estadio o grado de diseminación del tumor. Aun cuando los ganglios linfáticos regionales o los vasos sanguíneos están afectados por el tumor, un número significativo de pacientes puede lograr supervivencia prolongada y probable curación [2]. Cuando hay metástasis a distancia, la supervivencia libre de enfermedad es precaria; sin embargo, algunos pacientes seleccionados sobrevivirán después de resección quirúrgica de todo el tumor conocido. Debido a que una mayoría de pacientes son diagnosticados cuando el tumor está todavía relativamente localizado y es susceptible de resección quirúrgica, aproximadamente el 40% de todos los pacientes con cáncer renal sobrevive cinco años. Algunos pacientes con enfermedad avanzada local o metastásica pueden presentar cursos indolentes que duran varios años. Sólo ocasionalmente ocurre recidiva tardía del tumor muchos años después del tratamiento inicial.

El cáncer de células renales es uno de los pocos tumores en los cuales hay casos bien documentados de regresión espontánea del tumor sin terapia, pero esto ocurre muy rara vez y quizás no produzca supervivencia a largo plazo. La resección quirúrgica es el tratamiento fundamental para esta enfermedad. Aun en los pacientes con tumor diseminado, las terapias locorregionales pueden desempeñar una función importante en el alivio de síntomas del tumor primario o de la producción ectópica de hormonas. La terapia sistémica ha mostrado sólo eficacia limitada.

Clasificación celular

Aproximadamente 85% de los cánceres de células renales son adenocarcinomas, en su mayoría de origen tubular proximal. La mayoría de los restantes son carcinomas de células de transición de la pelvis renal. Los adenocarcinomas pueden dividirse históricamente en carcinomas de células claras y carcinomas de células granulares; sin embargo, los dos tipos de células pueden ocurrir juntos en algunos tumores. Algunos investigadores han encontrado que los tumores de células granulares tienen un pronóstico peor, pero este resultado no es universal. La distinción entre adenocarcinomas renales bien diferenciados y adenomas renales puede ser difícil. El diagnóstico suele hacerse de forma arbitraria a tenor del tamaño de la masa, pero el tamaño no es lo único que debe influir en el método de tratamiento, ya que las metástasis pueden ocurrir en el caso de lesiones tan pequeñas como las de 0,5 centímetros. Actualmente se distinguen más tipos anatómo-patológicos: convencional (células claras), cromóforo, papilar, oncocitoma y carcinoma de tubo colector.

El sistema de clasificación para el cáncer de células renales se basa en el grado de propagación del tumor más allá del riñón [2-4]. La afectación de los vasos sanguíneos no tiene que ser un signo de pronóstico precario si, por lo demás, el tumor está limitado al riñón. Los resultados anormales del análisis de la función hepática pueden deberse a un síndrome paraneoplásico que es reversible con la resección del tumor y no representan necesariamente enfermedad metastásica. Excepto cuando el examen por tomografía computarizada (TC) es equívoco o cuando no puede utilizarse material yodado de contraste por estar contraindicado, la TC aporta igual efectividad diagnóstica o incluso mejor que la resonancia magnética (RNM), para detectar tumores renales.[4]

El Comité Estadounidense Conjunto sobre el Cáncer (AJCC, por sus siglas en inglés) designó un sistema de clasificación TNM común a la práctica totalidad de las neoplasias [6].

Aspectos generales de las opciones de tratamiento

El tratamiento actual cura a más del 50% de los pacientes con enfermedad en estadio I, mientras que los resultados para los pacientes con enfermedad en estadio IV son muy precarios. Por lo tanto, cuando sea posible, conviene considerar a todos los pacientes recién diagnosticados de cáncer de células renales como candidatos idóneos para los ensayos clínicos.

El tratamiento de elección en estadios precoces es la resección quirúrgica, a menudo curativa en estadio I. La resección puede ser simple en estadio I o radical en estadios II o III. Esta última operación incluye la resección completa del riñón, de la glándula suprarrenal, de grasa perirrenal y de la fascia de Gerota, con una disección de los ganglios linfáticos regionales o sin ella. Algunos cirujanos, aunque no todos, piensan que la operación radical produce resultados superiores para el estadio I. En los pacientes que no son candidatos para la cirugía, la radioterapia de haz externo o la embolización arterial puede ser paliativa. En los pacientes con neoplasias bilaterales en estadio I, II y III (concurrentes o subsecuentes), la nefrectomía bilateral parcial o la nefrectomía unilateral parcial con nefrectomía contralateral radical cuando sea factible técnicamente puede ser una opción preferible a la nefrectomía bilateral con diálisis o trasplante.[7] Cada vez hay más pruebas que indican que la nefrectomía parcial es curativa en casos escogidos. Un patólogo debería examinar la muestra macroscópica y la sección congelada del margen parenquimal de la excisión.[8]

Tratamiento del cáncer de células renales no avanzado:

1. Nefrectomía radical.[9]
2. Nefrectomía simple.[9]
3. Nefrectomía parcial antes o después de radioterapia de haz externo (pacientes escogidos).[7,9]
4. Radioterapia con haz externo (paliativa).[9]
5. Embolización arterial (paliativa).[9,10]
6. Ensayos clínicos.

No está claro el papel de la linfadenectomía en tumores localmente avanzados N negativos[11]. En los pacientes N positivos clínicamente se realiza dicha linfadenectomía. En los pacientes con tumores localmente avanzados se ha administrado radioterapia de haz externo antes de la nefrectomía o después de ella, sin prueba concluyente de que mejore la supervivencia en comparación con los resultados de la cirugía sola; sin embargo, puede ser beneficiosa para los pacientes con los tumores más extensos.

En estos pacientes con tumores localmente más agresivos sin ganglios afectados la cirugía se extiende para extraer toda la vena renal y una porción de la vena cava, según sea necesario.[12] En pacientes con tumor localmente más avanzado también la nefrectomía parcial puede ser preferible a la nefrectomía bilateral con diálisis o trasplante.[7,13,14]

Tratamiento del cáncer de células renales en estadio IV

Casi todos estos pacientes son incurables. La embolización del tumor, la radioterapia con haz externo y la nefrectomía pueden ayudar a paliar los síntomas causados por el tumor primario o relacionados con la producción ectópica de hormonas. Hay indicios mínimos que indican que la nefrectomía induce la regresión de las metástasis a distancia. Por lo tanto, la nefrectomía que se hace con la esperanza de que producirá una regresión espontánea de las metástasis, no se recomienda. Ocurren ocasionalmente las regresiones espontáneas; de hecho, una serie prospectiva de vigilancia de 73 pacientes con cáncer avanzado de células renales mostró una aparente regresión objetiva temporal en 5 pacientes (7%) sin nefrectomía u otra terapia.[15] Ciertos pacientes con una sola metástasis o con un número limitado de metástasis a distancia pueden lograr supervivencia prolongada con nefrectomía y resección quirúrgica de las metástasis. Aun los pacientes con metástasis cerebrales, tuvieron resultados similares.[16] La probabilidad de lograr un beneficio terapéutico con este enfoque parece ser mejor para los pacientes que han tenido un intervalo largo libre de enfermedad entre la nefrectomía inicial y el desarrollo de enfermedad metastásica.

En general, la respuesta a la quimioterapia citotóxica no excede el 10% de los pacientes en ninguno de los regímenes que se han estudiado en números adecuados. Debido a resultados iniciales favorables, se han administrado agentes progestacionales a pacientes con cáncer metastático de células renales, pero la frecuencia de respuesta es baja en forma decepcionante, y no hay justificación para su uso como terapia anticáncer. Sin embargo, estos agentes pueden ofrecer paliación subjetiva. Se han evaluado diversas terapias biológicas. Los interferones alfa tienen aproximadamente una tasa de respuesta objetiva de 15% en individuos seleccionados correctamente.[17,18] En general, estos pacientes tienen metástasis pulmonares no voluminosas o de tejido blando, o ambos,

con excelente estado general (ECOG 0-1) y sin pérdida de peso. En los estudios que han obtenido buenas tasas de respuesta, se han utilizado dosis de interferón alfa de un nivel intermedio, 6-20 millones de unidades - tres veces a la semana. Estas respuestas rara vez son completas o duraderas. Los tratamientos que emplean interleucina-2 (IL-2), son más prometedores.[19-22] La administración de la IL-2, parece tener una tasa de respuesta general similar a la del interferón alfa, pero aproximadamente 5% de los pacientes correctamente seleccionados tienen una remisión completa duradera. Se han estudiado las combinaciones de IL-2 e interferón pero no se ha mostrado que sean mejores que la IL-2 sola en dosis elevadas.[23] Se desconoce cuál debe ser la óptima dosis de IL-2. La terapia de altas dosis parece estar asociada con mayores tasas de respuesta pero con más efectos tóxicos. Los regímenes de dosis baja para los pacientes hospitalizados pueden mantener su eficacia con menos efectos tóxicos, especialmente hipotensión.[24] La administración subcutánea para los pacientes ambulatorios también ha mostrado respuestas con efectos tóxicos aceptables.[25] Debido al precario resultado general del tratamiento con fármacos, los pacientes con cáncer metastático de células renales deben ser considerados candidatos para ensayos clínicos, especialmente los experimentos de fase I y II, que tratan de evaluar nuevos fármacos quimioterápicos, biológicos como los interferones o la IL-2 y estrategias para modular el fenotipo de resistencia contra múltiples fármacos, que tiene un alto grado de expresión en los cánceres de células renales.[15,17-20]

Las opciones de tratamiento para el estadio IV pueden resumirse de la siguiente forma:

1. Interleucina-2.[19-21,23,26]
2. Interferón alfa.[15,17,18]

3. Radioterapia de haz externo (paliativa).
4. Nefrectomía paliativa.[9]
5. Nefrectomía radical (para lesiones T4).
6. Excisión quirúrgica de enfermedad metastásica con nefrectomía radical (para pacientes M1 selectos).[27]
7. Ensayos clínicos.

En este momento hay numerosos estudios clínicos acerca de fármacos con acción antitumoral, como son el bevacizumab (anti-VEGF), sorafenib (anti-receptor de VEGF), SU11248 (que actúa contra las proteínas c-Kit, PDGFR, FLT3, VEGFR), etc.

En el Congreso de la Sociedad Americana de Oncología del año 2006 se presentaron los datos de un ensayo clínico fase III con SU11248 en primera línea con resultados de eficacia en cuanto a respuestas e incremento de supervivencia libre de progresión de 6 a 11 meses. También se conocen datos de eficacia de sorafenib en segunda línea, aumentando de 3 a 6 meses la supervivencia libre de progresión.

Tratamiento del cáncer recurrente de células renales

El pronóstico para cualquier paciente con cáncer de células renales que ha sido tratado y cuya enfermedad progresa, recurre o reaparece es precario, independientemente del tipo de célula o del estadio. La oferta de tratamiento adicional y su selección depende de muchos factores, incluso el tratamiento previo, el sitio de recurrencia, y consideraciones individuales del paciente. Algunos pacientes cuidadosamente seleccionados pueden

beneficiarse de la resección quirúrgica de la enfermedad metastásica localizada, especialmente si el intervalo libre de enfermedad desde la terapia primaria ha sido prolongado.

En general, la respuesta a la quimioterapia citotóxica no excede el 10% de los pacientes en ninguno de los regímenes que se han estudiado. Se han evaluado diversas terapias biológicas. Sirven las recomendaciones hechas para los pacientes con cáncer metastático de células renales. Los pacientes con carcinoma de células renales recurrente deben considerarse candidatos para ensayos clínicos, especialmente los de fase I y II que evalúan agentes quimioterapéuticos, especialmente los nuevos fármacos antidiaria y productos biológicos como los interferones o la IL-2, y trasplantes alogénicos no mieloablativos de células madre.[17-20,28] Por tanto, podemos considerar tratamiento estándar la IL-2.[19-21,23,26,29] y el Interferón alfa.[17,18].

BASES MOLECULARES

El cáncer de riñón no es una única enfermedad, incluye diferentes tipos de tumores cada uno con diferente histología, evolución clínica, respuesta a tratamientos y causado por alteraciones genéticas diferentes. La identificación de genes y moléculas implicados en la patogénesis del cáncer de riñón permitirá desarrollar nuevos marcadores pronósticos y nuevas terapias dirigidas a vías moleculares alteradas específicamente. [30]

El carcinoma de células renales es resistente a la terapéutica convencional en fases avanzadas, como hemos visto, por lo que constituye un tumor muy atractivo para el estudio de nuevas aproximaciones en el tratamiento del cáncer. En la patogénesis del carcinoma de células renales intervienen alteraciones en las diferentes vías de transducción de la señal en la célula neoplásica.

RECEPTORES DE LA TIROSINA KINASA

Introducción

Todas las células deben tener capacidad para percibir e interpretar las condiciones del entorno que les rodea, es decir, descifrar o integrar las señales que se encuentran a su alrededor. Dichas señales son factores solubles generados localmente o a distancia, y moléculas de la superficie de otras células, o de la matriz extracelular. Para poder desarrollar respuestas adecuadas las células cuentan con sistemas de receptores de señales que interaccionan con las mismas. Por tanto, la célula puede responder de forma adecuada ante distintas situaciones.

Todos los sistemas de señalización se basan en una “señal” (un estímulo) que puede ser una molécula sintetizada por el propio organismo o procedente del exterior. También puede ser un estímulo físico. Un receptor en la célula percibe esta “señal” y la transmite hacia el interior de la célula. Una serie de moléculas intracelulares reciben la señal del receptor y la transmiten de unas a otras hasta que se genera la respuesta más adecuada.

Historia

La investigación sobre los factores de crecimiento se remonta al año 1952, cuando Rota Levi-Montalcini descubrió un factor secretado en tumores de ratón que promovía el crecimiento de neuritas en embriones de ratón. Esta proteína denominada factor de crecimiento nervioso (NGF), fue purificada por Stanley Cohen y por Levi-Montalcini, del veneno de serpiente y de extractos de glándulas salivales de ratón. Cinco años después, Montalcini y Come aislaron otra proteína, también de glándula salival de ratón, que inducía la apertura precoz de los ojos y la salida de los dientes cuando se inyectaba en ratones recién nacidos. Esta sustancia se llamó factor de crecimiento epidérmico (EGF) ya que estimulaba el crecimiento de células epiteliales. En 1975, Graham Carpenter confirmó la presencia de sitios específicos de unión o receptores para EGF (EGFr) en la superficie de las células diana. Tres años más tarde, Cohen y colaboradores identificaron el EGFr como una glicoproteína de membrana, que respondía al EGF aumentando la incorporación de fósforo radioactivo en células de sarcoma epidermoide A431. No fue hasta mediados de la década de los 80 cuando se caracterizaron a nivel molecular los receptores de tirosina quinasa y las moléculas efectoras responsables de todo el proceso de señalización. Posteriormente, el desarrollo de las técnicas de biología molecular permitió la identificación de los cDNAs que codificaban un número importante de factores de crecimiento como son la insulina, el mismo EGF, el factor

relacionado con la insulina-2 (IGF-2), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento transformante alfa (TGF-alfa).

Función de los receptores de tirosina kinasa

Hay muchos tipos de receptores, los acoplados a proteínas G (GPCR), integrinas, canales iónicos, receptores de citoquinas y receptores de tirosina kinasa que son los que vamos a desarrollar. Son receptores que se asocian a una actividad de proteína kinasa específica para residuos de tirosina.

Los receptores de tirosina kinasa, también conocidos como receptores de factores de crecimiento, representan una gran familia de receptores de la membrana celular, muchos de los cuales se unen a factores de crecimiento y mediadores celulares de crecimiento, organización o señales de diferenciación celular [31,32,33]. Esta propiedad hace que sean muy importantes en los procesos neoplásicos. En resumen, los receptores de tirosina kinasa son receptores para factores estimuladores del crecimiento, la diferenciación y respuestas metabólicas.

La expresión de la práctica totalidad de los receptores de tirosina kinasa se limita a unos tipos celulares específicos. Concretamente depende de la naturaleza de los elementos reguladores en el promotor del gen del receptor de tirosina kinasa. La función del receptor en las células donde se expresa un determinado receptor de tirosina kinasa depende de los ligandos que se unen a su dominio extracelular, lo cual depende a su vez de la disponibilidad y distribución de dicho ligando en el organismo. La respuesta que

se obtiene al activarse el receptor depende de las proteínas intracelulares que son diana para fosforilación y regulación por el receptor activado.

Estructura de los receptores de tirosina kinasa

La estructura básica del receptor de tirosina kinasa genérico consta de un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular.

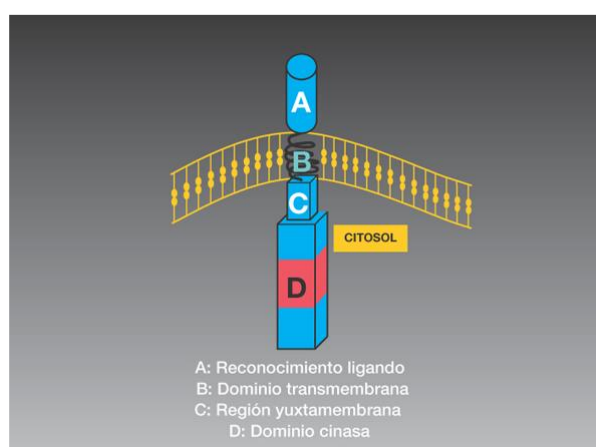


Figura 1. En el gráfico se describe: en el extremo *N*-terminal extracelular: dominio de reconocimiento del ligando. La región transmembrana: anclaje a la membrana en la orientación correcta. El dominio catalítico: región *C*-terminal intracelular.

El dominio extracelular [34, 35] se localiza en el extremo *N*-terminal de la proteína (figura 1), característica que los clasifica como proteínas transmembrana de tipo I. Es aquí donde se sitúa el péptido señal que los dirige a la vía secretora. El resto está compuesto por varios cientos de aminoácidos que configuran el dominio de reconocimiento del ligando. Los diferentes receptores de tirosina kinasa presentan distintos sitios conservados para el reconocimiento del ligando, dominios ricos en cisteína, dominios del tipo inmunoglobulina, repeticiones de fibronectina, etc. Estos

dominios son los que confieren al receptor especificidad para el ligando. Una vez que éste se une a ellos, se induce un cambio conformacional (figura 2) que lleva a la dimerización del receptor [36]. Es posible que haya regiones en el dominio extracelular de los receptores de tirosina kinasa que se encarguen de llevar a cabo la dimerización del receptor; o incluso otras funciones, como facilitar la interacción con otras células, favoreciendo la adhesión, la comunicación directa entre células o la interacción con la matriz extracelular, entre otras.

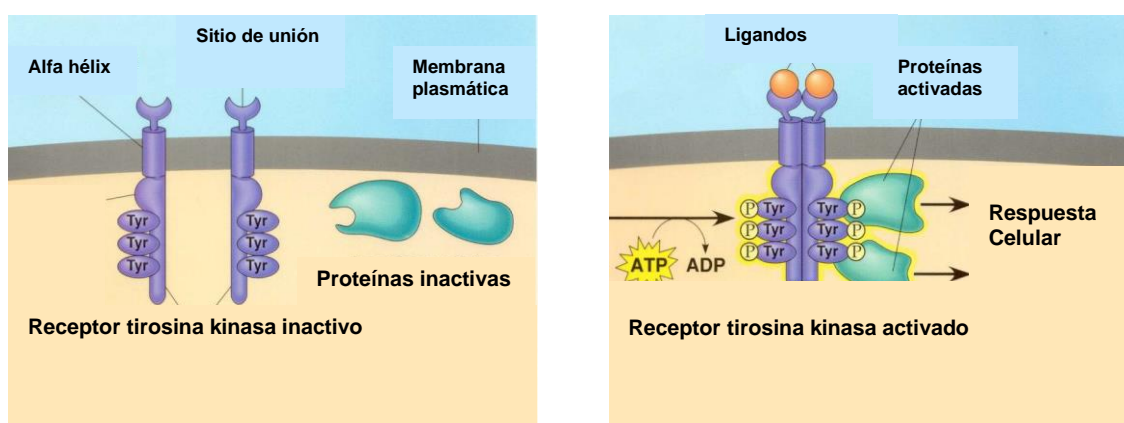


Figura 2. Activación de los receptores de tirosina-kinasa tras la unión con el ligando. Se produce una dimerización del receptor. La activación es mediada por fosforilación a partir de ATP.

– La región transmembrana de los receptores de tirosina kinasa es, básicamente, una hélice α . Está compuesta por una serie de residuos hidrofóbicos seguidos de varios residuos básicos y ancla la molécula en la orientación correcta respecto a la membrana celular. Diversas mutaciones descritas en los dominios transmembrana de los receptores FGFR y EGFR sugieren que el de los receptores de tirosina kinasa desempeña un

importante papel en la estabilización de la dimerización tras la unión del ligando [37-39].

– En la fracción intracelular de los receptores de tirosina kinasa hay una región inmediata a la membrana que precede al dominio catalítico propiamente dicho. Todas las proteintirosincinasas poseen un dominio catalítico conservado,[40] tanto en secuencia como en estructura. Básicamente se trata de una estructura en bucle. En la configuración inactiva el sitio de unión al ATP y el sustrato está bloqueado por ese bucle. Tras la autofosforilación de residuos tirosina en ese bucle los cambios conformacionales permiten su retirada del sitio de unión al sustrato, adquiriendo la conformación activa [41].

Ligandos

El siguiente paso en la enumeración de las características de estas moléculas sería la descripción de los ligandos que las activan, aunque debido a la rapidez con que se han ido descubriendo los distintos receptores de tirosina kinasa, hay algunos para los que no se conoce ligando. Al mismo tiempo, el análisis de la naturaleza de los ligandos descritos hasta ahora ha evidenciado que, al parecer, los mismos ligandos forman entre sí familias moleculares. Por lo tanto, es posible que los llamados receptores de tirosina kinasa “huérfanos” interaccionen con ligandos de familias concretas.

Los ligandos capaces de activar los receptores de tirosina kinasa son moléculas polipeptídicas normalmente denominadas factores de crecimiento, aunque también son capaces de activar determinadas proteínas de la membrana de otras células e incluso componentes de la matriz extracelular. La mayoría de los ligandos conocidos son proteínas solubles secretadas al medio extracelular.

Señalización

La acción en la cascada de señalización comienza cuando el ligando se une al receptor. A partir de ahí se producen una serie de acontecimientos escalonados que son iguales para todos los receptores tirosincinasa.

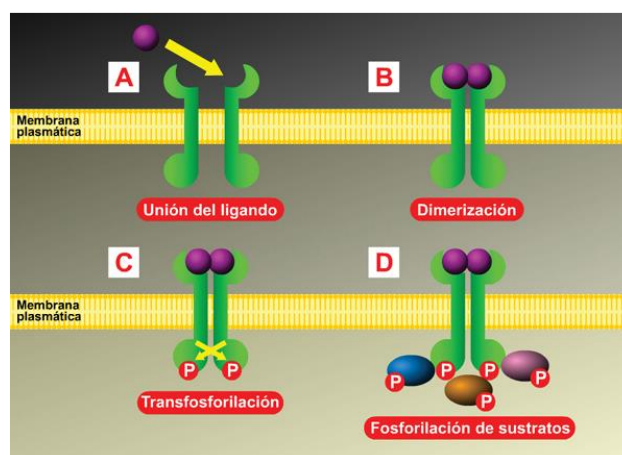


Figura 3. Activación de receptores de tirosina-kinasa . Tras la dimerización la señal activadora se transmite en forma de fosforilación a nivel intracelular.

La señalización comienza con la activación de los receptores de tirosina kinasa. Todos los receptores tirosincinasa siguen un proceso de tres pasos para transmitir la señal: dimerización, autofosforilación y fosforilación de sustratos (figura 3).

A. Dimerización

Una vez el ligando se une al receptor, éste dimeriza y se une a otra molécula de receptores de tirosina kinasa, lo que induce un cambio conformacional en la proteína. La evidencia sugiere que un solo ligando monomérico puede inducir la dimerización del receptores de tirosina kinasa, como en el caso del receptor de la hormona de

crecimiento. [41] Pero también hay ligandos que son dímeros a priori, como PDGF, de modo que la dimerización resulta en una molécula dimérica simétrica. Los ligandos monoméricos han de tener, por lógica, dos sitios de reconocimiento para el receptor, aunque sean ligeramente distintos entre sí, para permitir la unión de la segunda molécula de receptor. Este sería el caso, por ejemplo, de EGF.

B. Autofosforilación

El cambio conformacional inducido por la dimerización produce la autofosforilación del receptor. La unión de los dominios extracelulares provoca la unión global de las moléculas de los receptores. Es esta yuxtaposición de los dominios intracelulares la que, al parecer, induce otro cambio conformacional que activa la capacidad cinasa de la molécula, de modo que los dos receptores se fosforilan mutuamente en residuos tirosina exteriores al dominio catalítico (transfosforilación).

C. Fosforilación de sustratos

Una vez dimerizado el receptor y autofosforiladas las dos moléculas se produce otro cambio conformacional (figura 4), lo que permite al dominio catalítico del receptor fosforilar a los sustratos citoplasmáticos que han de continuar la transmisión de la señal.

El dímero “autofosforilado” no sólo puede fosforilar a otras moléculas, sino que se incrementa su afinidad por éstas . [34]

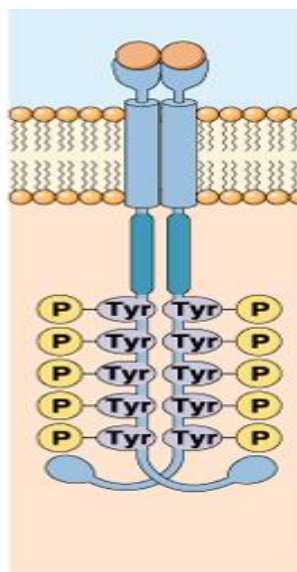


Figura 4. Cambio conformacional del receptor al dimerizarse y fosforilarse.

Naturaleza de los sustratos de los receptores de tirosina kinasa

Los sustratos de los receptores tirosincinasa se pueden clasificar [42,43] en tres grupos:

– Enzimas cuya actividad puede ser alterada directamente mediante una fosforilación o que pueden acceder más fácilmente a sus sustratos al ser translocadas a la membrana plasmática. En esta categoría están las fosfolipasas PLC, PLA₂ y PLD, la enzima fosfatidilinositol-3-cinasa, ciertas proteintirosinfosfatasas, tanto de membrana como citoplasmáticas, y la proteintirosincinasa de la familia Src, que presentan tanto dominios SH2 como SH3 en su estructura.

– Proteínas sin dominio catalítico propiamente dicho que poseen dominios SH2 y SH3 y que se conocen como “adaptadores” porque, según parece, sirven de intermediarios entre los receptores y las siguientes moléculas en la cascada de señalización. Los dominios SH2 (*Src-Homology 2*) [44] se unen específicamente a residuos tirosina fosforilados. Esta unión afecta a los receptores al menos en tres aspectos: a) facilita el acceso a la fosforilación por el receptor de las proteínas que contienen el dominio SH2;

b) puede resultar en la activación alostérica de la molécula diana; y c) porque también así se asegura la proximidad de estas moléculas a la cara interior de la membrana plasmática. Los dominios de tipo SH3 también participan en uniones proteína-proteína y se unen a sitios ricos en prolina de no más de diez aminoácidos en una maniobra específica de secuencia.

– Proteínas estructurales que podrían ser fosforiladas por estos receptores. Esta fosforilación explicaría la rápida estructuración de la membrana y el citoesqueleto que se produce tras la activación de un receptor tirosincinasa [34].

La cascada de señalización

Si reflexionamos sobre las características de los sustratos afectados por la activación de los receptores de tirosina kinasa resulta más sencillo introducirse en las cascadas de señalización que se desencadenan.

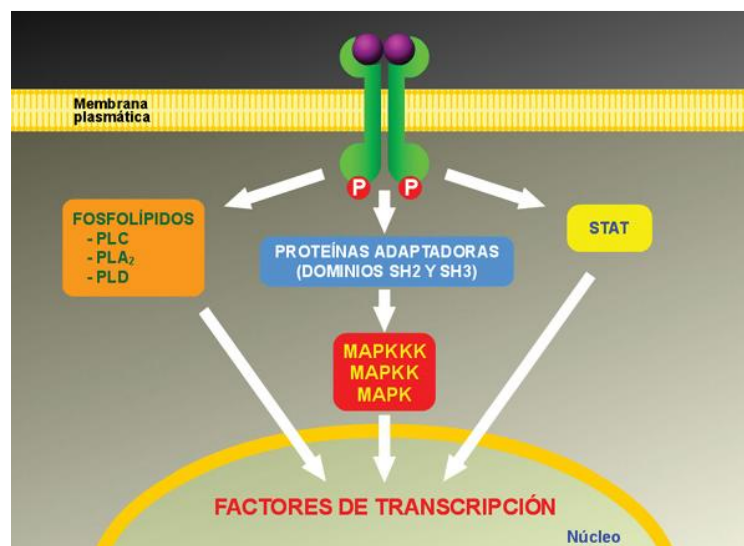


Figura 5. Cascada de Señalización. La señal se transmite por tres vías principales: Fosfolípidos, proteínas adaptadoras (MAPK) y STAT.

Tal y como se aprecia en la figura 5, los receptores de tirosina kinasa fosforilados pueden activar las cascadas de señalización de los fosfolípidos, cascadas de MAPK y las vías de señalización de la proteintirosincinasa STAT.

A. Fosfolípidos

A través de la activación de las correspondientes fosfolipasas, PLC, PLA₂ o PLD, se activan las cascadas clásicas de señalización que tienen como mensajeros a los fosfolípidos. La activación de la PLC, por ejemplo, lleva a un incremento de la movilidad celular, y la activación de las fosfolipasas PLA₂ y PLD conduce a la síntesis de fosfocolina y prostaglandinas, respectivamente.

B. Map-quinasas

En realidad, la vía de señalización más “importante” que se desencadena con la activación de los receptores de tirosina kinasa es la cascada de las MAP-quinasas, ya que termina en la modificación de la transcripción de determinados genes. De todos los efectos que produce, el que más nos interesa es la modificación de la proliferación celular.

Un esquema general de esta vía que se adapte a todos los receptores de tirosina kinasa sería el siguiente:

B. 1. Cascada de cinasas

B. 2. Proteínas adaptadoras

B. 3. Factores de transcripción

B. 1. Cascada de cinasas

La unidad principal de las vías de señalización de las MAPK es una cascada de cinasas de tres miembros [45]. La señalización comienza con la activación de una MAPK cinasa cinasa. Se trata de serintreonincinasas capaces de fosforilar y activar a otras cinasas, en este caso duales, ya que pueden catalizar la fosforilación de residuos tanto tirosina como treonina. Estas enzimas son, a su vez, MAPK cinasas, ya que se encargan de activar por fosforilación a la MAPK correspondiente de la cascada de señalización activada.

Hasta el momento se han descrito muchos miembros de la familia de las MAP-cinasas en mamíferos, que pueden clasificarse en subfamilias según homologías y funciones. Las diferentes enzimas de esta familia presentan una enorme diversidad de dominios reguladores, lo que permite una elevada flexibilidad en la respuesta a una amplia variedad de estímulos.

B. 2. Proteínas adaptadoras

Esta especificidad se debe, en parte, a la actuación de proteínas adaptadoras que coordinan la unión de las MAP-cinasas a los demás componentes de la cascada. Así es como son transportadas a las proximidades de los receptores de tirosina kinasa a través, principalmente, de las moléculas adaptadoras GRB2 y SOS.

GRB2 contiene un dominio SH2 localizado entre dos dominios SH3 [34] y es capaz de asociarse a receptores de tirosina kinasa fosforilados en residuos tirosina, como EGFR, PDGFR y CSF-1R. A continuación, GRB2 es fosforilada por el receptor fosfotirosinkinasa al que se ha asociado y esto le permite formar un complejo proteínico

con SOS, la otra molécula adaptadora ya mencionada. Ésta, al ser transportada a la cara interna de la membrana plasmática, puede actuar sobre una proteína G, Ras, que posee actividad GTPasa. Al unirse mediante un dominio SH2 a SOS cambia su afinidad por el GDP y pasa a unir GTP, y al hidrolizarlo activa a la primera de las proteínas del módulo de MAP-quinasas.

Ras se encuentra activada en numerosos tumores humanos [34] y se ha hallado que se activa mediante la activación de numerosos receptores de tirosina kinasa.

B. 3. Factores de transcripción

En el otro extremo de la vía se encuentran los sustratos de las MAP-quinasas. Al menos una de las cinasas es capaz de translocar al núcleo y activar factores de transcripción, como Elk-1 [45], c-Myc, c-Jun, etc... [46] que pueden modificar el crecimiento, la diferenciación o la supervivencia celular.

C. Vía de la proteincinasa STAT

Por último, otra vía de señalización citoplasma-núcleo activada por los receptores de tirosina kinasa es la vía de la proteintirosincinasa STAT.

Podríamos resumir todos estos aspectos en que la activación transitoria de los receptores se interpreta por la célula efectora con la generación de segundos mensajeros (inositoles, fosfatos, diacilglicerol, cAMP, cGMP, calcio iónico, regulación de flujos iónicos, alcalinización intracelular, etc...). La activación de este tipo de receptores

constituye en sí la base de la especificidad de las señales, pues cada factor presenta receptores específicos que se expresan sólo en las células susceptibles de ser estimuladas por cada factor. La generación de los segundos mensajeros se traduce, en última instancia en la activación de determinados enzimas, puntos clave en la regulación fisiológica de las funciones celulares, amplificándose la señal en el citoplasma celular, al producirse multitud de moléculas del segundo mensajero por cada receptor activado. El resultado final es la activación de factores de transcripción nuclear y la activación final de una batería de genes involucrados en la proliferación celular.

La regulación exquisita de los mecanismos involucrados en la cascada de transmisión de señales es susceptible de sufrir alteraciones que los activan o inactivan permanentemente, con consecuencias graves para el organismo. Las alteraciones se pueden producir en cualquiera de los eslabones de la cadena de señalización. Son los mecanismos utilizados por diversas familias de oncogenes para inducir la transformación celular o la alteración de los programas de diferenciación.

Receptores de Tirosina Kinasa y Enfermedad

El complejo control del crecimiento celular es fundamental para el correcto desarrollo del cuerpo humano. Cualquier desequilibrio en esta delicada red de factores puede inclinar la balanza hacia el desarrollo de enfermedades graves, como el cáncer o las malformaciones congénitas.

Los receptores tirosincinasa tienen una larga historia de implicación en el desarrollo de neoplasias humanas . [35] La amplificación del gen, la sobreexpresión o las mutaciones somáticas implicadas en el desarrollo de estas enfermedades se han observado en, al menos, diez familias de receptores de tirosina kinasa. Por ejemplo, las alteraciones en los miembros de la familia del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos se relacionan con síndromes como la craneosinostosis y el enanismo, y con el desarrollo de mielomas; el receptor RET participa en la génesis de enfermedades como la neoplasia endocrina múltiple, la ausencia congénita de ganglios entéricos, la enfermedad de Hirschprung, etc; MET, de la familia del receptor del factor de crecimiento de hepatocitos, se ha encontrado mutado en pacientes con predisposición hereditaria a desarrollar carcinomas multipapilares de células renales; la familia del receptor de insulina también está alterada en el leprecaunismo, la resistencia a la insulina de tipo A, el síndrome de Rabson-Mendenhall; VEGFR en la hiperlipidemia hereditaria; o TIE en síndromes de malformación, etc [40].

Familias de receptores de tirosina kinasa

La clasificación de los receptores de la familia de las proteintirosincinasas se ha llevado a cabo mediante el análisis de homología de secuencias. Las mayores diferencias se

encuentran en el dominio extracelular, en la región de reconocimiento para el ligando. De acuerdo con estos análisis de homología se ha construido un árbol filogenético en el que se pueden apreciar fácilmente las distintas subfamilias de receptores y la cercanía en la evolución de unos a otros. A continuación se exponen las distintas subfamilias de receptores:

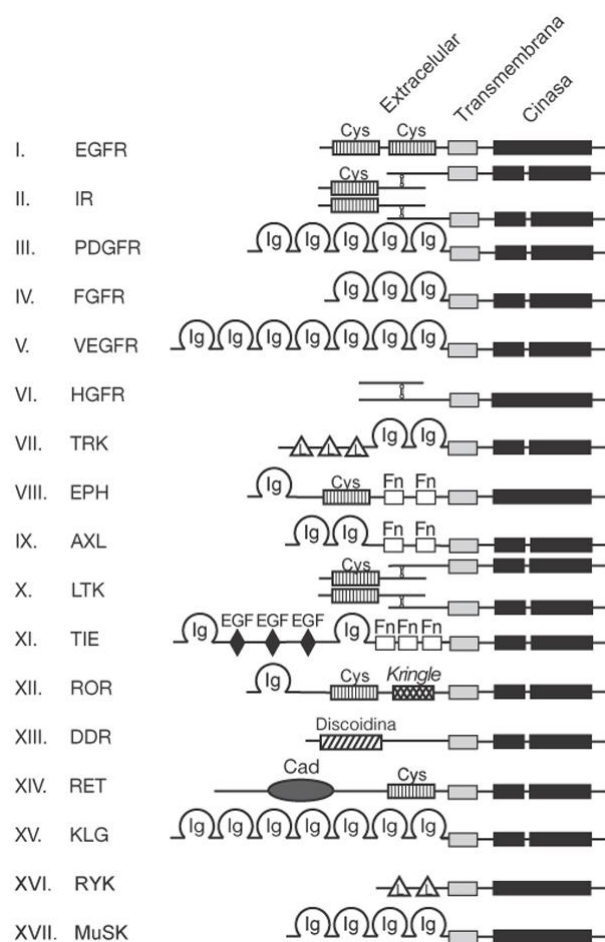


Figura 6. Subfamilias de receptores tirosina kinasa conocidas.

Existen al menos 17 subfamilias descritas de receptores de tirosina kinasa (figura 6). Las diferencias entre unas y otras están en la configuración del dominio extracelular,

donde pueden presentar motivos tipo inmunoglobulinas, dominios ricos en leucinas o cisteínas, dominios tipo discoidina, puentes disulfuro, etc.

1) Subfamilia del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR). Todos contienen un inserto grande en su dominio catalítico y poseen varios dominios de tipo inmunoglobulina en la región de unión al ligando. El inserto en el dominio cinasa parece ser necesario para el reconocimiento de sustratos y, de todos modos, es indispensable para la actividad catalítica [47]. Entre los factores de crecimiento que reconocen nos encontramos a PDGF A y B, VEGF y SCF, y otros.

2) Subfamilia del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR). Los miembros de esta familia también presentan repeticiones de tipo inmunoglobulina en su dominio extracelular, y están estrechamente relacionados con los miembros de la subfamilia de PDGFR.

3) Subfamilia del receptor de insulina (INSR). Los miembros de esta subfamilia se caracterizan porque el receptor maduro es un heterotetrámero y está constituido por dos subunidades alfa y dos beta unidas por puentes disulfuro.

4) Subfamilia del receptor del factor de crecimiento de nervio (NGFR). Esta familia está integrada por tres miembros que comparten estructura y similitudes en su secuencia, y se unen a ligandos de naturaleza similar. Como peculiaridad estructural presentan un dominio extracelular con regiones de tipo inmunoglobulina y un dominio rico en residuos leucina.

5) Subfamilia del receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (HGFR). Esta subfamilia está formada por receptores con una estructura similar a IGF1R que se sintetizan como un precursor que se subdivide proteolíticamente en dos. Estas dos

subunidades se unen entre sí mediante un puente disulfuro [48]. Este receptor media la respuesta a una citocina, HGF o factor *Scatter*, que inicialmente se definió como un factor de crecimiento para hepatocitos y otras células epiteliales [49], aunque también puede estimular el movimiento de estas células.

6) Subfamilia del receptor EPH. Esta subfamilia es la más numerosa de los receptores de tirosina kinasa. Consta de 12 miembros, muchos de los cuales se expresan sobre todo en cerebro adulto, lo que implica su participación en otros procesos, aparte de la mitogénesis o la diferenciación, aunque podrían tener una importante participación en ellos en estadios precoces del desarrollo. En su dominio de reconocimiento del ligando presentan repeticiones de fibronectina, regiones ricas en cisteína y, al menos, un dominio de tipo inmunoglobulina.

7) Subfamilia del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (o ErbB-1). Esta subfamilia de receptores proteintirosincinasa es la que más se ha investigado. Los demás miembros de esta familia son Her 2/neu (ErbB-2), Her 3 (ErbB-3) y Her 4 (ErbB-4). El dominio extracelular de cada uno de estos receptores está fuertemente glicosilado y compuesto por cuatro subdominios: dos ricos en cisteína y dos que se encargan de la unión del ligando [50].

También hay descritas otras familias de receptores de tirosina kinasa, más pequeñas, de dos o tres miembros como mucho, pero igualmente asociadas con algunos tipos de neoplasias, como las subfamilias AXL, relacionadas con ciertas leucemias [51], TIE, DDR, ROR, etc.

El avance en el conocimiento de estas moléculas es imparable, por lo que en poco tiempo es previsible que el número de subfamilias aumente.

Hemos visto que cada subfamilia contiene distintos tipos de receptores. En la figura 7 vemos descritos estos receptores.

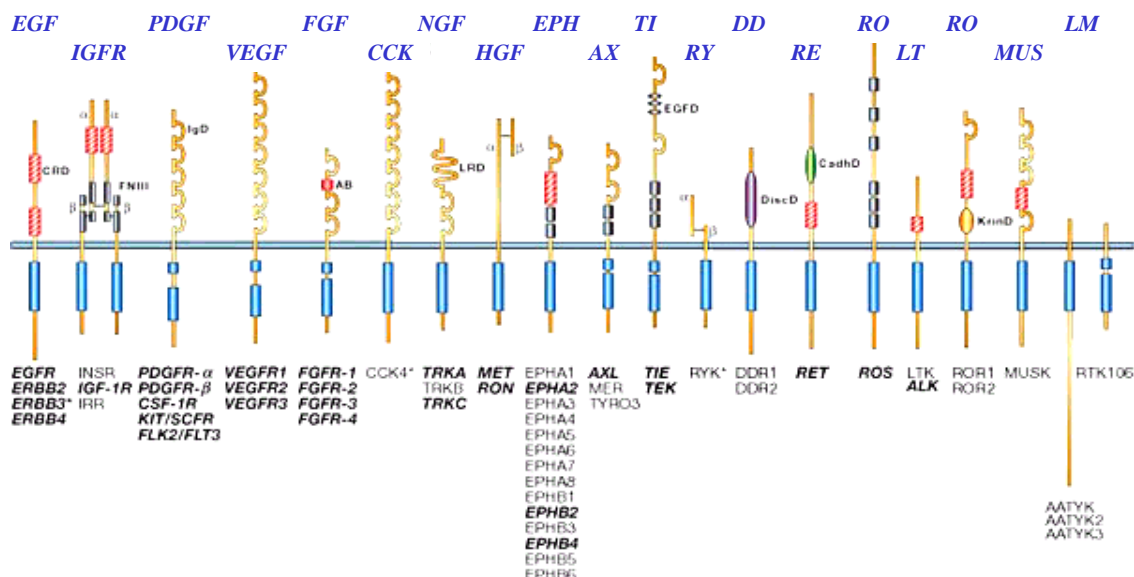


Figura 7. Receptores de las distintas subfamilias. Aparecen destacados aquellos que han sido más investigados y de los que más conocimiento se tiene en el momento actual.

Describiremos a continuación los tipos de receptores que han sido motivo de estudio en este trabajo.

EGFR

La subfamilia del receptor de crecimiento epidérmico tiene, como ya se ha señalado, cuatro miembros [34, 52]: EGFR, también llamado HER1 o c-erbB que fue el primero que se describió; ERBB2 o HER2, o también neu; ERBB3 o HER3; y ERBB4 o HER4. De los cuatro, ERBB2 es el único para el que, hasta el momento, no se ha descrito

ningún ligando. ErbB-3 y 4 actúan como receptores de herregulina y neuregulina, respectivamente, aunque como el 3 no tiene actividad cinasa parece que actúe más bien como agente para aumentar el espectro de respuesta de los receptores con que es capaz de dimerizar [52].

EGFR está presente en todas las células epiteliales y estromales, así como en células de la glía y de músculo liso. Esto le convierte en un buen candidato a marcador a la hora de detectar células circulantes en sangre periférica para la predicción del riesgo de metástasis. El gen que codifica este receptor se encuentra en el *locus* 7p11.2. El gen EGFR tiene 28 exones, ocupando cerca de 200 kilobases [51]. Anteriormente, se pensaba que este gen estaba compuesto por 26 exones a lo largo de 110 kilobases [53], pero al analizar su estructura completa y tras compararlo con las secuencias genómicas de sus homólogos en otras especies se ha demostrado que no es así [52].

Estructura del receptor

Estructuralmente, EGFR es el prototipo de la superfamilia de sensores que controlan las funciones celulares básicas [52], aunque, en cierto modo, posee una estructura inusual entre los RPTK en cuanto a que hay una sola isoforma que sirve como receptor para muchos ligandos diferentes. Se han descrito isoformas derivadas de *splicings* alternativos [51] pero se trata de proteínas truncadas que sólo poseen el dominio extracelular de la proteína. La expresión de estas formas truncadas en el tejido normal sugiere que, tal vez, sirvan como elementos reguladores de la función del EGFR.

La proteína completa es una glicoproteína transmembrana compuesta por 1210 aminoácidos y en el extremo aminoterminal se sitúa el dominio extracelular formado por 622 aminoácidos [51]. Contiene dos dominios ricos en cisteína que constituyen el

dominio de unión al ligando, a continuación la región transmembrana que, como ya se ha señalado al describir la estructura genérica de los RPTK, sólo está compuesta por una hélice α y, por último, la región intracelular formada por 542 aminoácidos. En la zona intracelular se distinguen tres dominios.

Cascada de señalización

La vía de señalización mediada por este receptor sigue las pautas generales que se aplican a todos los RPTK. En primer lugar dimeriza cuando llega el ligando. EGFR es capaz de interactuar con la mayoría de los miembros de la subfamilia a que pertenece y dimerizar con ERBB2 y 3, pero no con ERBB4 [54].

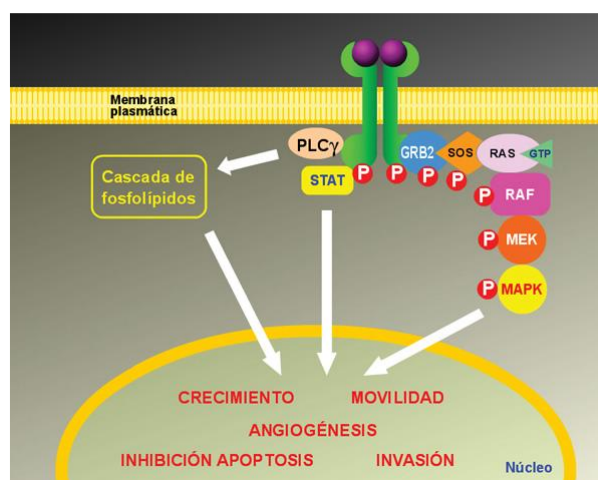


Figura 8. Vías de señalización que parten desde el receptor EGFR. Responde al modelo explicado anteriormente para los receptores tirosina kinasa.

El EGFR activado genera respuestas mediante tres tipos de vías de señalización: la vía de la fosfolipasa C gamma, las cascadas de MAPK y la activación de varias isoformas

de STAT (figura 8). Estas cascadas transportan la señal al núcleo, desde donde se generan respuestas activadoras del crecimiento, la proliferación y la migración celular.

EGFR activa varias cascadas de señalización muy similares a las del resto de los RPTK y receptores ligados a tirosincinasas.

Ligandos

Hasta el momento se han identificado diez genes que codifican para los ocho miembros de la familia de ligandos del EGFR. Estos ligandos son EGF, TGF- α , anfirregulina, HB-EGF, betacelulina, epirregulina, epigenina y la subfamilia de las neuregulinas. Aunque pueden unirse al mismo receptor, lo más seguro es que induzcan una respuesta diferente a través de una estimulación distinta de las cascadas de señalización que se activan [54].

Efectores

EGFR es un señalizador pleiotrópico. La respuesta biológica que puede generar varía desde la mitogénesis a la apoptosis, pasando por la migración, diferenciación, desdiferenciación, etc., incluso en la misma célula, siempre dependiendo del contexto en que se encuentre. Entre las cascadas que activa se encuentran las generadas por la fosfolipasa C gamma (PLC γ) y sus vías de señalización mediadas por calcio y la proteincinasa C. La cascada de MAPK que se activa empieza por la activación de ras, aunque también se activan otras GTPasas pequeñas, como rho y rac. Asimismo, se activan diversas isoformas de STAT (traductor de la señal y de la transcripción), así como algunas proteínas G heterotriméricas, y en menor medida otras cascadas como las

derivadas de la fosfatidilinositol-3-quinasa, la fosfolipasa D y la activación del protooncogén *src*, otra tirosincinasa citoplasmática [52].

De todas estas cascadas activadas se ha podido ir dilucidando poco a poco lo siguiente:

- Varias cascadas pueden parecer suficientes para la generación de una respuesta, pero no por sí mismas para producirla, como ocurre en el caso de la motilidad mediada por este receptor. Mientras que la activación de proteínas modificadoras de la actina-miosina y la inducción de la hidrólisis del fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato mediado por PLC γ son necesarias para activarla, queda bloqueada si la MAP-quinasa cinasa MEK está inhibida [52].
- Algunas de las cascadas de señalización pueden producir varias respuestas diferentes, como en el caso de la activación de la MAP-quinasa erk, que produce tanto proliferación como migración.
- No sólo los factores de crecimiento activan o modulan la respuesta del EGFR, ya que también lo hacen otros estímulos físicos y biológicos. Las células epiteliales y del estroma sólo muestran respuestas biológicas cuando están unidas a un sustrato firme. La respuesta global generada por la activación del EGFR depende de las condiciones espaciales y temporales del sistema. La movilidad asociada a PLC γ inicia una autoatenuación mediada por la proteincinasa C que sólo inhibe ligeramente la activación de erk, que inclina la respuesta buscada de proliferativa a migratoria.
- La señalización mediada por estos receptores no es tan sencilla como la simple activación de varias cascadas de señalización por complejas que parezcan. También de la interacción entre distintas cascadas, como por ejemplo el caso de la transactivación de los receptores erbB mediada por la activación de receptores acoplados a proteínas G

se derivan distintas respuestas. Se ha descrito la fosforilación independiente de ligando de receptores EGFR inducida por receptores acoplados a proteínas tanto G_i como G_q [49], y se ha postulado este mecanismo como fundamental para la mitogénesis mediada por receptores acoplados a proteínas G.

Se han llevado a cabo muchos estudios para determinar el papel de toda esta cascada de señalización [52] y se ha llegado a la conclusión de que el principal cometido del EGF es promover la maduración de los tejidos epiteliales. Otras funciones que parece ejercer son las de promover la producción láctea postparto o la reparación de tejidos adultos. Todos estos efectos se suponen resultado de la acción mitogénica de esta cascada de señalización. Sin embargo, durante el desarrollo y la reparación de lesiones las células tienen que dividirse, migrar, diferenciarse y desdiferenciarse; muchas respuestas distintas que podemos atribuir no sólo a la variedad de vías que este receptor puede activar, sino a la capacidad de sus efectores de desarrollar distintas funciones.

Por supuesto, si se descontrolan estas respuestas a la activación del EGFR se explica bien el importante papel que desempeñan en la transformación maligna de las células neoplásicas.

Se ha demostrado sobreexpresión de EGFR en muchos tipos tumorales: principalmente en colorrectal, tumores de cabeza y cuello, páncreas, carcinoma de pulmón no microcítico, gástrico, ovario y mama. En carcinoma de células renales hay estudios que demuestran la sobreexpresión de EGFR así como de su ligando el TGF-alfa, lo que puede desencadenar un fenómeno de autoestimulación autocrino que conduce a la perpetuación celular [55] aunque el número de estudios es inferior a otras patologías.

HER-2

El protooncogén erbB-2/neu es el receptor de la herregulina/NDF y de una familia de factores de crecimiento de células gliales llamados GGF (*Glial cell Growth Factors*). Está amplificado o sobreexpresado en un 30% de cánceres de mama (Fig. 9), correlacionándose con las metástasis en ganglios linfáticos, el grado histológico y estadios más avanzados, siendo además un factor pronóstico independiente de menor supervivencia en pacientes con metástasis nodulares.

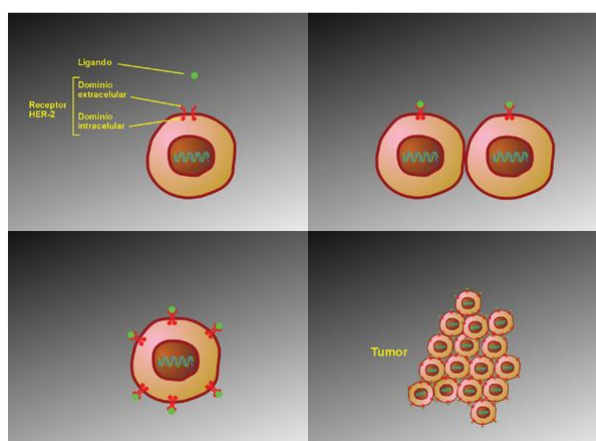


Figura 9. Célula que expresa niveles normales de erbB-2 y célula con sobreexpresión/amplificación de erbB-2.

Asimismo, se ha descrito la amplificación de erbB-2/neu en un pequeño porcentaje de otros tipos de cánceres, como el carcinoma de ovario, adenocarcinomas gástricos, de vejiga, microcítico de pulmón, y de cabeza y cuello, en los que su significación clínica resulta menos clara. También se ha detectado coexpresión de erbB-2/neu y sus ligandos GGF en algunos gliomas. Es interesante que erbB-2/neu puede activarse por mutación puntual en el dominio transmembrana, como se ha observado al tratar ratas con el carcinógeno químico etilnitrosourea, habiéndose postulado que dicha mutación (Val a

Glu) pudiera causar un cambio conformacional que condujera a la activación permanente del dominio tirosincinasa.

La proteína erbB-2 y sus agonistas

El gen erbB-2 humano codifica una proteína de 1255 aminoácidos y 185 kD perteneciente a la familia de los receptores tirosincinasas (*Receptor Tyrosine Kinase* [RTK]) [56-62] (Fig. 10). Esta proteína se denomina en ocasiones p185. El gen humano está localizado en el cromosoma 17q21 [58]. P185 es un miembro del subgrupo de los receptores del factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal Grow Factor Receptor* [EGFR]) dentro de la gran superfamilia de RTK, que incluye tanto a EGFR como a las proteínas codificadas por los genes *erbB-2* (neu/HER-2/p185), *erbB-3* (HER-3) [63,64] y *erbB-4* (HER-4) [54]. Estos cuatro genes codifican la proteína tirosincinasa con dominios de membrana sencillos y dos dominios extracelulares ricos en cisteínas.

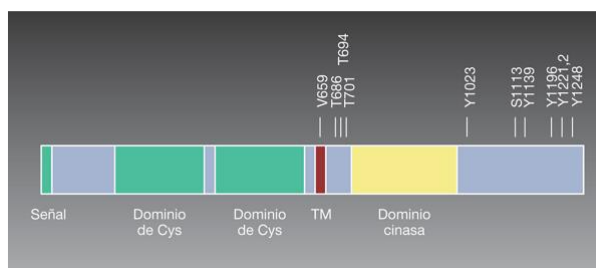


Fig. 10. Estructura de la proteína erbB-2.

Los cuatro receptores se coexpresan en distintas combinaciones (Fig. 11) y se pueden encontrar en una gran variedad de tejidos (excluido el sistema hematopoyético).

El receptor erbB-2 se expresa en la membrana celular de una gran variedad de tipos de células epiteliales, aunque se une a factores de crecimiento específicos, regula aspectos del crecimiento y la división de la célula. erbB-2/neu es un miembro de la familia de genes HER de receptores de factores de crecimiento y, como se ha comentado anteriormente, muestra una notable homología con otros miembros, incluido el receptor del factor de crecimiento epidérmico. El dominio intracelular que codifica este gen muestra una homología mayor que el extracelular.

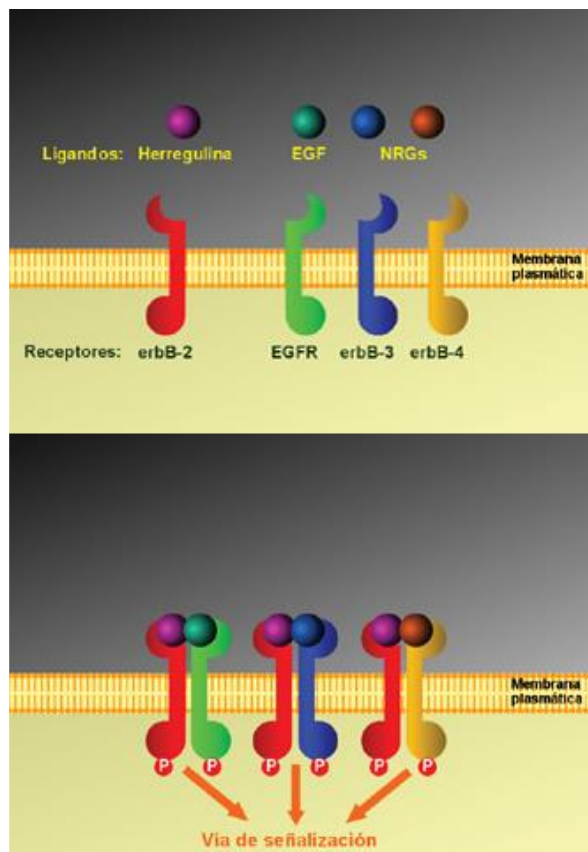


Fig. 10. Estructura de la proteína erbB-2. Pueden formarse heterodímeros entre los receptores erbB3 , erbB4, EGFR con HER-2.

La importancia biológica de *erbB-2/neu* estriba en que también es un miembro de un grupo de genes conocido como protooncogenes. Éstos codifican importantes proteínas involucradas en el crecimiento y diferenciación de células, como por ejemplo los factores de crecimiento, los receptores de factores de crecimiento, las proteínas apoptóticas, etc. Cuando los protooncogenes están alterados por unas mutaciones puntuales, las translocaciones o las amplificaciones genéticas, producen señales de crecimiento que pueden desembocar en una transformación celular y el desarrollo de cáncer. La forma mutada o alterada de un protooncogén se llama oncogén.

Mientras *erbB-2/neu* se expresa a concentraciones bajas en diversas células normales, en varios cánceres se sobreexpresa. La sobreexpresión de *erbB-2* es causada en muchos casos por la amplificación genética o un incremento del número de genes *erbB-2* en el núcleo celular. La sobreexpresión del receptor de este factor de crecimiento desempeña un papel en la progresión del tumor, produciendo títulos elevados de crecimiento celular y una transformación oncogénica. La sobreexpresión/amplificación genética del gen *erbB-2* se ha observado en una gran variedad de tipos de cáncer, incluyendo los de mama, ovario, endometrio, estómago, páncreas, próstata y glándulas salivares.

El cáncer de mama es el más común entre las mujeres. Aunque el número de casos de cáncer de mama se ha incrementado en los últimos años, el riesgo de mortalidad ha decrecido. Esta tendencia hacia una mejora de la supervivencia se debe a un incremento de la vigilancia, un progreso en el diagnóstico y mejores terapias adyuvantes.

Muchos estudios han mostrado que el gen *erbB-2* está sobreexpresado/amplificado en aproximadamente el 30% de los cánceres de mama [66-68]. La sobreexpresión de la oncoproteína *erbB-2* se correlaciona con un incremento de la actividad mitótica, mientras que no está asociada con el estado del receptor de estrógenos-progesterona.

Hay estudios que muestran que el estado de erbB-2 puede ser un marcador muy útil para la sensibilidad o resistencia a la quimioterapia [69-70]. Por otro lado, la proteína erbB-2 se ha utilizado como diana potencial para terapias dirigidas, como la inmunoterapia, específicamente a las células cancerosas que sobreexpresan esta proteína en particular.

Tumores humanos con sobreexpresión de erbB-2

Una vez realizados algunos estudios a pequeña escala para identificar cambios en erbB-2 en el cáncer humano [59, 71-74], se ha demostrado que erbB-2 está alterado por amplificación y sobreexpresión génica en un *array* de diversos carcinomas humanos. La sobreexpresión de erbB-2 se encuentra también en ciertas lesiones premalignas que ocurren en el colon [75], el riñón [76] y el esófago [77].

VEGF-R

Los efectos biológicos de VEGF están mediados por su unión a tres receptores específicos de la superficie celular relacionados de forma estructural: VEGF-R1 o Flt-1, VEGF-R2, KDR o Flk-1 y VEGF-R3 o Flt-4. Recientemente, se ha visto que neutropilina 1 (NP-1) es capaz de unir VEGF₁₆₅ y que potencia la migración celular inducida por VEGF a través de un mecanismo todavía no caracterizado. Estudios en embriones de ratones han demostrado que tanto VEGF-R1 como VEGF-R2 son esenciales en el desarrollo vascular. De los tres receptores, VEGF-R1 y VEGF-R2 se expresan principalmente en el endotelio vascular, mientras que VEGF-R3 se localiza en el endotelio linfático. Las concentraciones de oxígeno regulan la expresión de VEGF-

R1 y VEGF-R2, aunque sólo hay elementos de respuesta a hipoxia en el promotor de R129.

Los receptores están constituidos por un dominio extracelular formado por siete bucles similares a las Ig, un dominio transmembrana y un dominio intracelular con una región tirosincinasa dividida en dos subregiones por la inserción de una secuencia no catalítica de cien aminoácidos y una cola carboxiterminal [34] (Fig. 11). El dominio extracelular de VEGF-R3 presenta un puente disulfuro entre la cuarta región Ig y el resto del receptor.

Los receptores presentan distinta afinidad por el ligando. Los principales ligandos de VEGF-R1 son VEGF-A, VEGF-B y PlGF; los de R2 son VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E y los de R3 son VEGF-C y VEGF-D.

Estos receptores, al igual que otros receptores tirosincinasa, tras la unión del ligando se activan, dimerizan y se autofosforilan en residuos tirosina (Tyr) altamente específicos presentes en el dominio intracelular.

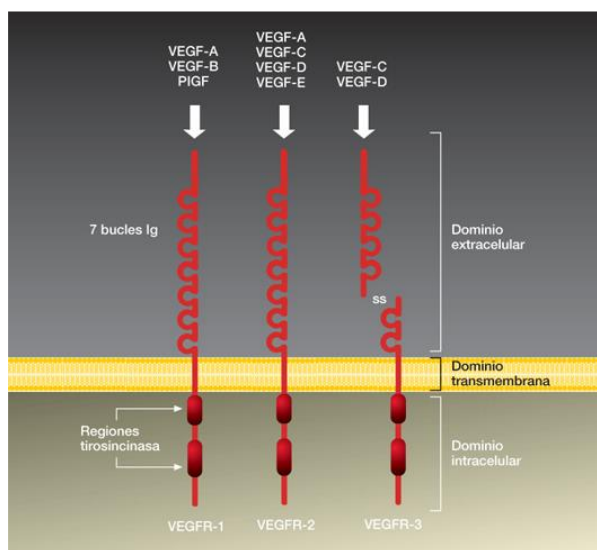


Fig. 11. Estructura de los receptores del factor de crecimiento del endotelio vascular.

RECEPTOR MET: Factor de crecimiento de hepatocitos

El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) se identificó inicialmente como un potente mitógeno para los hepatocitos. Es un heterodímero constituido por una subunidad alfa de 34 kD y una subunidad beta de 34 kD. Posteriormente, se describió una proteína secretada por fibroblastos y células de músculo liso que se denominó *scatter factor* (SF) y que promovía la movilidad de células epiteliales. A continuación se comprobó que SF y HGF eran idénticos, y por esto se denomina HGF/SF a este factor. HGF/SF pertenece a la familia de los factores de crecimiento relacionados con plasminógeno (PRGF) [78].

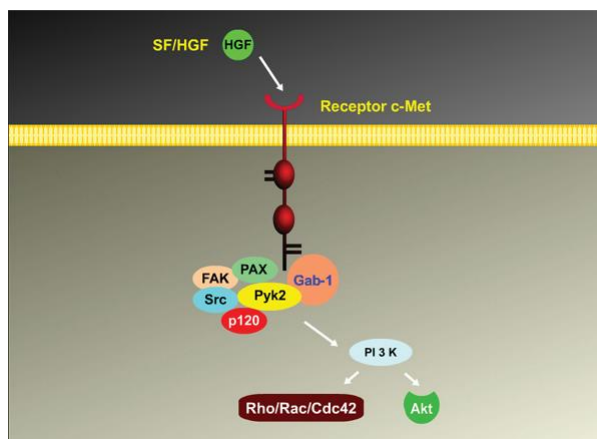


Fig. 12. Vía de señalización inducida por la unión de SF/HGF a su receptor c-Met.

HGF/SF es una potente molécula angiogénica que actúa directamente sobre las células endoteliales induciendo migración, proliferación, producción de proteasas, invasión y organización tubular de los capilares [79]. También puede promover la expresión de factores angiogénicos por las células tumorales. Estos fenómenos están mediados por la unión de HGF/SF a su receptor c-Met al poner en marcha vías de señalización a través

de MEK y fosfatidilinositol-3-cinasa, gracias a proteínas adaptadoras, como Grb2, SHC, Gab1 y Crk/CRKL [80]. C-Met tiene un gran número de efectos biológicos relacionados con el citoesqueleto debido a su capacidad de interactuar con integrinas y cadherinas (Fig. 12).

RECEPTOR RON-BETA

El producto del oncogen Ron es el receptor para la proteína estimuladora de los macrófagos, induce un fenotipo invasivo a la célula. Ha sido poco estudiado en comparación con otros receptores.

Ron está sobreexpresado tanto en oncocitoma como en carcinoma cromóforo a pesar de que en otros estudios parece un rasgo diferencial de los oncocitomas [81].

RECEPTOR AXL

Axl es un receptor de tirosina kinasa implicado en la leucogénesis mieloide. Parece ser capaz de transformar varios tipos celulares por sobreexpresión [82-84].

También parece tener un papel en la génesis del carcinoma de pulmón no microcítico. Su ligando, Gas6 parece ser un componente muy importante de la proliferación de las células mesangiales.

FOSFATASAS DE LA PROTEÍNA TIROSINA

Historia

La primera fosfatasa de la proteína tirosina fue purificada [85] y clonada [86] 10 años después de la primera proteína tirosina kinasa [87]. Importantes descubrimientos han dirigido el reconocimiento emergente de que las fosfatasa de la proteína tirosina juegan papeles específicos y activos en los niveles de fosforilación de las células y la regulación de muchos procesos fisiológicos [88-92].

Función

Hay una evidencia sustancial que es el aumento del potencial de crecimiento, proliferación y diferenciación por la fosforilación de las tirosina kinasas. Las fosfatasa de la proteína tirosina son necesarias para regular e inhibir la transducción de señales mediante la defosforilación. Las fosfatasa funcionan como anti-oncogenes o genes supresores del crecimiento. La pérdida de funcionalidad de estas fosfatasa puede promover señales que conducen al desarrollo de la neoplasia.

Las fosfatasa de las proteína tirosina defosforilan los receptores de tirosina kinasa tras haber sido activados y los receptores son reciclados a la superficie (figura 13). Hay un “turnover” constante entre receptores fosforilados y defosforilados en células normales. Es posible que en células neoplásicas este equilibrio esté alterado.

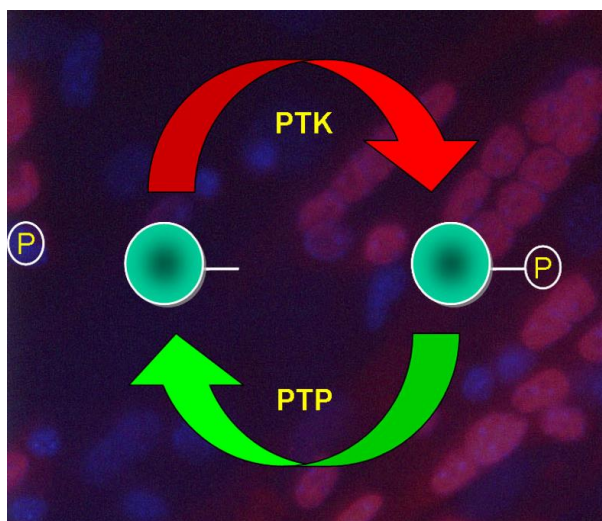


Fig. 13. Defosforilación de las tirosina kinasas activadas (PTK) por parte de las fosfatasas de la proteína tirosina (PTP).

Tipos de fosfatasas

Hay dos grandes grupos. Un tipo son enzimas transmembrana que contienen el dominio de actividad fosfatasa en la porción intracelular de la proteína. El otro tipo son enzimas intracelulares. La primera fosfatasa transmembrana descrita fue el antígeno leucocitario común (CD 45). Hay al menos seis subclases de fosfatasas transmembrana.

La segunda clase son las intracelulares. Se ha escrito mucho acerca de la proteína PTP-1B por su relación con la función de la insulina.

Se han realizado estudios genotípicos recientes habiéndose detectado 107 genes implicados en la síntesis de las fosfatasas de la proteína tirosina. Se ha realizado una clasificación muy reciente en cuatro familias cada una con una especificidad distinta para un sustrato determinado [93].

En nuestro trabajo realizamos el análisis de 2 tipos de fosfatasa de la subclase tipo I (PTP-1B y SH-PTP) y un tipo de la subclase II descrita en la referencia, que son las fosfatasa de la proteína tirosina de bajo peso molecular (LMW-PTP). Durante la realización de este trabajo se ha producido el avance en el conocimiento de estas proteínas, realizándose la detección de fosfatasa para las que existen anticuerpos con suficiente especificidad lo que permite su análisis de expresión con la técnica de Western-Blot.

REGULACION GLOBAL DEL PROCESO

Una vez que la señal de proliferación ha llegado al núcleo y se han expresado los genes necesarios para llevarla a cabo, la señal debe desactivarse, volviendo la célula a su estado de reposo. El proceso se realiza mediante la activación de determinadas enzimas específicas para cada caso. Dentro de este grupo se encuentran las fosfatasa de la proteína tirosina que eliminan el fosfato de los receptores tirosina kinasa activados y los devuelven a la superficie celular y el sistema de la ubiquitinación que permite eliminar los receptores internalizados activados uniéndose mediante una proteína llamada ubiquitina que los conduce hasta el proteasoma donde serán degradados. Posteriormente, los restos proteicos que se producen en el proteasoma son presentados al exterior en la membrana celular por moléculas HLA tipo I gracias a su ensamblaje en el retículo endoplásmico. Pueden actuar de esta forma de diana inmunológica para los linfocitos T CD8 citotóxicos.

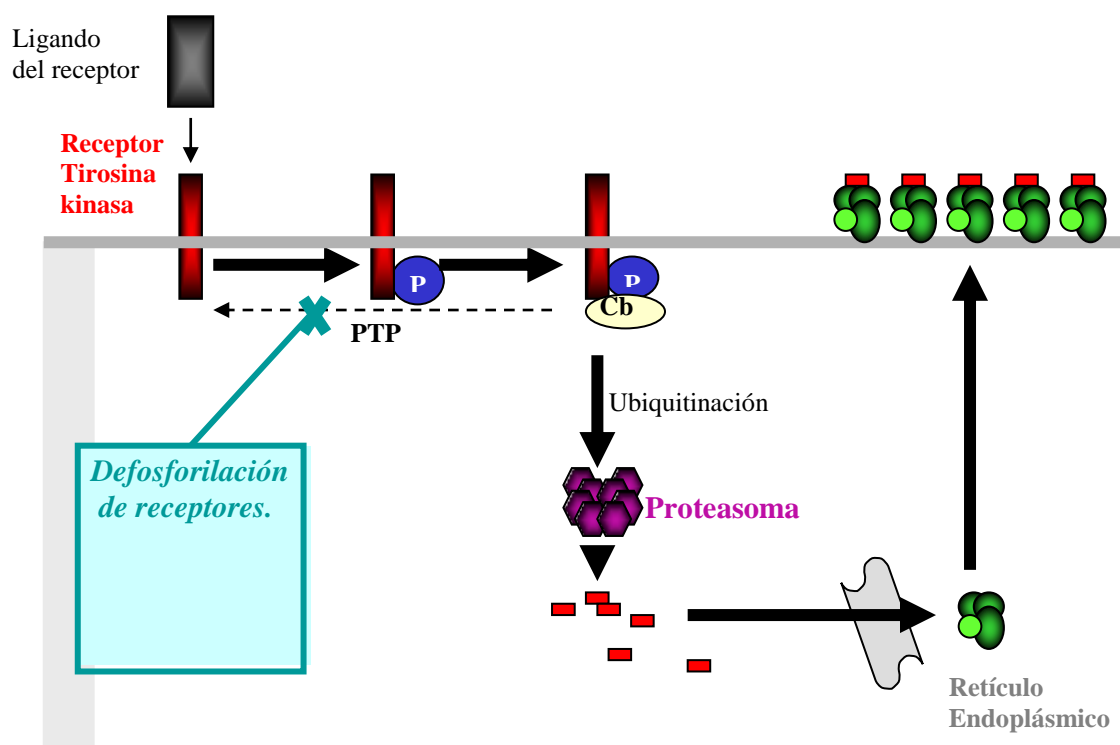


Figura 14. Regulación del proceso de señalización.

CORRELACIÓN FENOTIPO-CLÍNICA

Recientemente se ha descubierto que el hipernefroma sobreexpresa el Receptor de Tirosina Kinasa (RTK) Eph A2 en relación con el tejido renal normal. Este hecho se asocia con un fenotipo metastásico y un pronóstico clínico adverso. La activación de estas moléculas de Eph A2 o proteínas de fusión Ephrin A1-Ig resulta en la fosforilación, seguida de una internalización del receptor fosforilado, posteriormente una ubiquitinación y una degradación proteica en el proteasoma dando lugar a pequeños fragmentos peptídicos. Estas células tratadas con estos agonistas de Eph A2 adquieren un comportamiento más benigno y además los restos peptídicos del proteasoma son presentados como epítomos en la superficie de las células dentro de los complejos HLA

de clase I. Se ha demostrado que líneas celulares de linfocitos CD8 citotóxicos o linfocitos T CD8 citotóxicos clonados anti Eph A2 mejoran el reconocimiento y la destrucción de las células tumorales tratadas.

También se ha demostrado que mediante una inhibición farmacológica de las fosfatasa de la proteína tirosina (PTP) se consigue aumentar la fosforilación y la degradación proteasómica de forma que aumentará la expresión de antígenos derivados mediante HLA I. Puede establecerse la hipótesis de que agonistas de Eph A2 e inhibidores de PTPs pueden actuar de forma sinérgica aumentando el reconocimiento de las células tumorales por parte de CD8 citotóxicos. Teóricamente la inmunoterapia combinando linfocitos T específicos de EphA2 o vacunas basadas en Eph A2 que presenten el antígeno a linfocitos T citotóxicos, y activando la degradación de Eph A2 por la vía proteasómica mediante la administración de agonistas de Eph A2 o inhibidores de PTPs debería mejorar las tasas de regresión y el número de respuestas clínicas.

OBJETIVOS

El trabajo de investigación está centrado en la búsqueda de dianas terapéuticas en carcinoma de células renales.

OBJETIVOS PRIMARIOS

1. Evaluar líneas celulares de carcinoma de células renales analizando la expresión de Receptores de Tirosina Kinasa.: EGFR, erbB2, VEGFR-1, VEGFR-2, PDGFR-1, PDGFR-2, HGFR1, HGFR-2, TIE-1, TIE-2, AXL, MET, Ron Beta.
2. Evaluar líneas celulares de carcinoma de células renales analizando la expresión de Fosfatasa de la proteína Tirosina: LMW-PTP, PTP-Ib, SH-PTP-1.

OBJETIVOS SECUNDARIOS

1. Mediante el estudio de líneas celulares tumorales murinas pretendemos extrapolar nuestros resultados para el conocimiento del tumor de células renales en humanos.
2. Contribuir a la investigación de nuevas dianas terapéuticas en carcinoma de células renales.

MATERIAL Y MÉTODOS

La metodología de este trabajo de investigación se basa en la técnica de detección de expresión de los receptores de tirosina kinasa y de las fosfatasa de la proteína tirosina con el interés de poder utilizarlos como dianas terapéuticas en un tipo de cáncer con escasas posibilidades de tratamiento. La técnica utilizada es el Western-Blot (Figura 1).

Debemos resaltar que todos los materiales y medios utilizados han sido facilitados por el Profesor Walter Storkus (Jefe de Investigación del Laboratorio de Inmunología del Hillmann Cancer Center de la Universidad de Pittsburgh) y su equipo.

WESTERN BLOT

Base de la técnica

Se trata de una técnica inmunológica basada en la electroforesis de proteínas. Se trata de una técnica semicuantitativa que permite detectar de forma relativa la cantidad de antígeno que se estudia.

La transferencia de proteínas o 'blotting' supone la inmovilización de las proteínas sobre membranas sintéticas, seguido de la detección empleando sistemas especialmente diseñados para la tinción de 'blots'. El método más potente es el denominado 'Western blot' en el que las proteínas son separadas en primer lugar mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y posteriormente se transfieren (mediante la aplicación de un campo eléctrico perpendicular al gel) a una membrana. El procedimiento es análogo al desarrollado por el Prof. E. Southern ('Southern blotting') y por ello se le denominó 'Western'.

Todo procedimiento de 'blotting' consta de 5 etapas :

1. Inmovilización de proteínas sobre la membrana ya sea mediante transferencia (electroforética, aspiración, presión) o mediante aplicación directa.
2. Saturación de todos los lugares de unión de proteínas de la membrana no ocupados para evitar la unión no específica de anticuerpos, que son proteínas.
3. Incubación del 'blot' con anticuerpo primarios contra la/s proteína/s de interés.
4. Incubación del 'blot' con anticuerpos secundarios, o reactivos que actúan de ligando del anticuerpo primario unidos a enzimas u otros marcadores.
5. Las bandas de proteínas marcadas con enzimas se hacen visibles por incubación con los sustratos apropiados para formar productos coloreados o luminescentes insolubles en el lugar donde se encuentran las bandas de proteína.

En este método, descrito por Towbin, las proteínas son transferidas desde el gel a la membrana electroforéticamente. La ventaja de este proceso es su corta duración (de 30 minutos a pocas horas), lo que reduce notablemente el efecto de difusión de las bandas.

Se realiza la rotura de células o tejidos en un tampón apropiado (desnaturalización de proteínas) y posteriormente se realiza una electroforesis del extracto obtenido. El siguiente paso es realizar una electrotransferencia de proteínas a un soporte sólido que en este caso se trata de una membrana de nitrocelulosa, polivinilo o nylon mediante una diferencia de potencial.

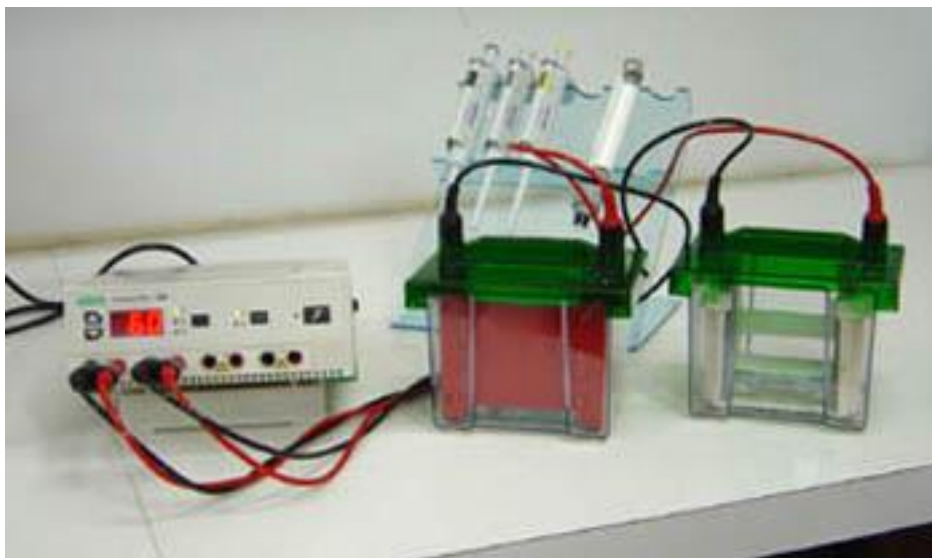


Figura 1. Equipamiento para realizar técnica de Western-Blot.

Lisis celular

Trabajamos con líneas celulares en cultivo obtenidas a partir de carcinoma de células renales producido en ratones. Para poder estudiar las proteínas el primer paso es realizar una lisis de las células para poder aislar las proteínas.

Se obtienen las células del frasco de cultivo T25 cuando existe un 90% de confluencia entre ellas (ver en “cultivos celulares”). Se añade PBS 2 veces (para obtener todos los detritus en suspensión) y se elimina el medio de cultivo quedando las células limpias de residuos adheridas al frasco de cultivo. Se añaden 500 microlitros de una solución tampón (x1 lysis buffer) al frasco.

Composición de la solución tampón x1 lysis buffer:

2% Triton X-100

1% NP-40 / Bartlettlab (1ml)

7.4mg SOV

300 mM de NaCl (1,75gr)

2mM EDTA (400 microlitros/0.5 M)

20 mM Tris (97ml Tris pH 7.15)

PBS (5ml)

1 tableta de inhibidor de proteínas.

El frasco se coloca en un recipiente con hielo para llevarlo a una cámara frigorífica en cuyo interior se encuentra el agitador. Se agita durante 30 minutos para que las células se mezclen bien con la solución lisante. Una vez obtenido el lisado se transfiere a un tubo eppendorf y se centrifuga durante 10 minutos a velocidad de 13500 revoluciones por minuto. El sobrenadante se transfiere a otro tubo eppendorf y se conserva entre -20° y -80°C hasta su utilización.

Preparación de la muestra

Se descongelan las muestras de una forma rápida aunque posteriormente deben manipularse en frío (en un recipiente con hielo). Se prepara un tampón con 5% de 2-

Mercaptoetanol y “laemmli-buffer”. Se diluyen las muestras en una proporción 1/1 y se mantienen en hielo. El siguiente paso es introducirlas en el termociclador a 100°C durante 10 minutos, de esta forma se procede a su ebullición.

Se prepara un tampón para la electroforesis (1x SDS running buffer): Se obtiene con la proporción 1/9 del siguiente tampón (10xSDS running buffer):

Tris-base 30gr

Glicina 144gr

SDS 10gr

Agua destilada 1 litro

Utilizamos para la técnica 300 ml de 1xSDS por lo que diluimos 30 ml del 10x SDS running buffer con 270 ml de agua destilada.

Geles utilizados

La separación de proteínas se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (10%) en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Se utilizaron patrones de peso molecular de rango amplio para la detección (Laboratorios Bio-Rad).

El grosor del gel es un factor que influye notablemente en la transferencia, siendo muy ineficiente a partir de geles de 2 mm de espesor, y tanto más eficiente cuanto más fino es el gel, con un límite debido a los problemas de manipulación en torno a los 0.4 mm.

Dispensación de las muestras

Se coloca el gel en la cubeta de Western Blot (ya va preparado en un cristal que presenta unos pocillos para cargar la muestra). Para la dispensación de las muestras (figura 2) primero se dispensan 10 microlitros de un marcador (kaleidoscope) que tiene un colorante determinado unido a una proteína determinada y conocida que marca distintos pesos moleculares con distintos colores, para poder seguir la migración de las proteínas de una forma sencilla. Según el color de la banda que ha migrado sabemos el peso molecular al que corresponde dicha banda, por lo que las bandas que obtengamos de nuestro análisis que se sitúen en esa misma horizontal tendrán ese mismo peso molecular.

En concreto utilizamos el kaleidoscope 99077 que presenta los siguientes colores:

Azul: Proteína miosina: 210 kilodaltons (kd)

Fucsia: Proteína beta-galactosidasa: 118 kd

Verde: Albúmina sérica bovina: 82 kd

Violeta: Anhidrasa carbónica: 40 kd

Naranja: Proteína inhibidora de tripsina: 31,85 kd

Rojo: Lisozima: 17,47 kd

Azul: Aprotinina: 6,96 kd

Posteriormente se administran 30 ó 40 microlitros de las muestras hervidas en los pocillos.

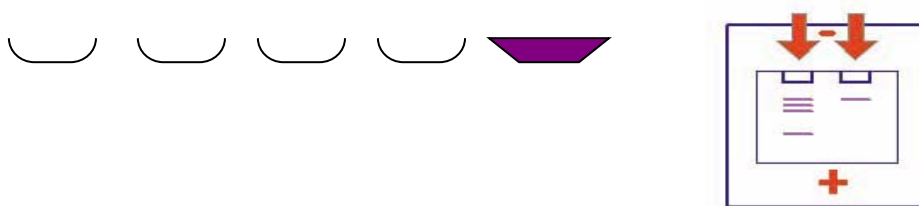


Figura 2. Llenado de los pocillos con las muestras.

Electroforesis

Consiste en conseguir la migración de las proteínas en función de sus distintos pesos moleculares mediante una diferencia de potencial (figura 3). Con un tampón de electroforesis se rellena la cubeta cuidadosamente, primero por la parte interna del gel y posteriormente por la parte externa.

Se establece una diferencia de potencial de 140 Voltios durante una hora.

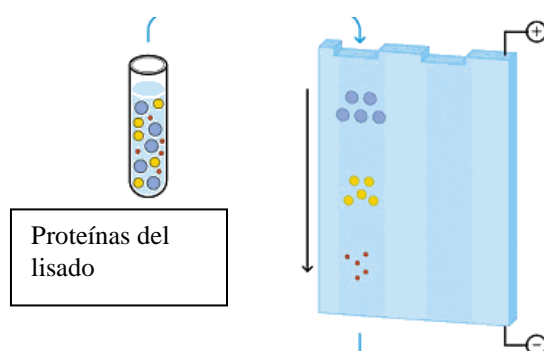


Figura 3. Electroforesis. Migración de las proteínas al establecer la diferencia de potencial

Transferencia

El objetivo de este paso es que las proteínas del gel se adhieran a una membrana de polivinilo sobre la que posteriormente añadiremos los anticuerpos específicos para la detección de las proteínas que nos interesen.

Todas las membranas son hidrofóbicas y requieren un tratamiento previo con metanol antes de sumergirlas en soluciones acuosas.

Una vez realizada la migración de las proteínas en el gel se desmonta el aparato y se separa el gel del cristal al que estaba adherido.

Previamente se ha preparado un tampón de transferencia (transfer buffer) de la siguiente composición:

Tris 25mM ó 3,03 gr

Glicina 102mM ó 14,4 gr

Metanol 20% 200ml

Agua destilada 800ml

El gel se sumerge en una pequeña cubeta con esta disolución para equilibrarlo durante 20 minutos.

Recortamos la membrana de polivinilo a la medida del gel e introducimos dicha membrana en otra pequeña cubeta con ME-OH (Hidroxido de metanol) durante 15 segundos para eliminar cualquier impureza y evitar la hidrofobia que por naturaleza tiene la membrana.

Posteriormente la introducimos en una segunda cubeta con el tampón de transferencia para equilibrarla durante 2 minutos.

Se prepara un apilado con los siguientes componentes en orden (figura 4):

- una esponjilla humedecida con tampón de transferencia
- un papel secante humedecido con tampón
- gel con las proteínas
- membrana de polivinilo
- papel secante humedecido con tampón
- esponjilla humedecida con tampón.

El orden es muy importante para realizar adecuadamente la transferencia, la membrana debe quedar próxima al polo positivo del cassette de transferencia y el gel próximo al polo negativo para realizar correctamente la transferencia del gel a la membrana (figura 5).

Se establece una diferencia de potencial de 100V durante una hora.

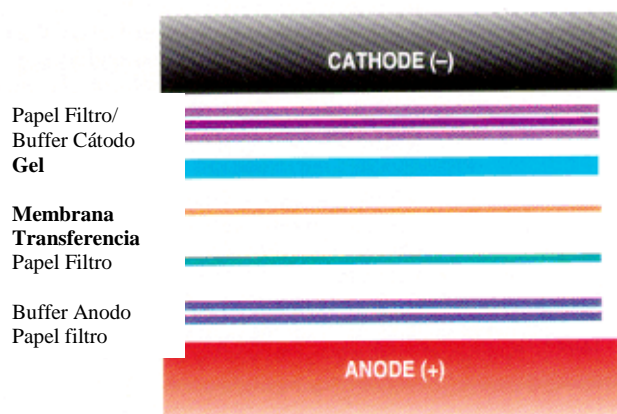


Figura 4. Orden de los componentes de la transferencia. Siempre el ánodo estará más cerca de la membrana y el gel más cerca del cátodo. De esta forma las proteínas se transfieren de polo negativo a positivo quedando adheridas a la membrana.

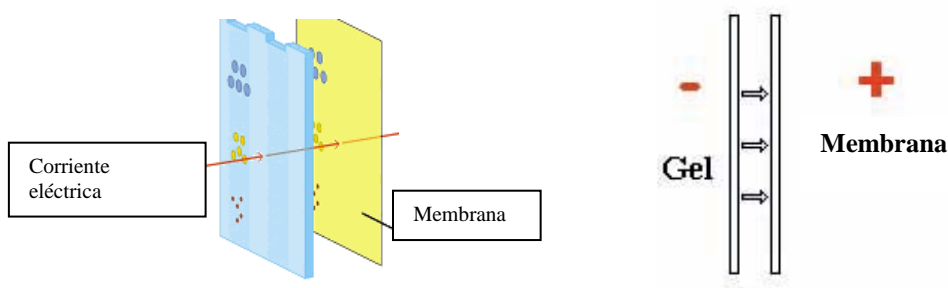


Figura 5. Transferencia y detalle de migración de polo negativo a positivo.

Detección

Tras la fase anterior se desmonta el apilado realizado y se lava la membrana brevemente con tampón de transferencia. Posteriormente se sumerge en Me-OH durante 10 segundos para eliminar las impurezas y se deja secar durante 15 minutos.

Una etapa común a todos los procedimientos de inmunodetección es el bloqueo de la membrana, para prevenir la unión no específica del sistema de detección (anticuerpos específicos) a la membrana, con el riesgo asociado de tener un elevado 'background' (ruido de fondo o interferencias) o falsos positivos. No debemos olvidar que los anticuerpos son proteínas y tienen capacidad de unirse a la membrana.

Se han descrito numerosas soluciones bloqueantes, y todas ellas son efectivas. El factor esencial a tener en cuenta es elegir un sistema de bloqueo compatible con el sistema de detección empleado. Por ejemplo, las soluciones de bloqueo que contienen leche desnatada contienen una gran cantidad de carbohidratos complejos, y por ello deben descartarse cuando se van a emplear anticuerpos que reconozcan determinantes en carbohidratos. En este caso se trata de proteínas. Las dos soluciones de bloqueo que son compatibles con casi cualquier sistema de detección son las soluciones de leche desnatada y las soluciones de albúmina sérica bovina (BSA). También se recomienda el bloqueo en Tween-20 si hay demasiado 'background'. Sin embargo es conveniente usar con cuidado los detergentes no iónicos como Tween-20 pues pueden solubilizar las proteínas transferidas al filtro.

Se procede al “bloqueo” de la membrana a la que se han adherido las proteínas con 50 ml de PBS, solución Tween 20 0.05% (PBS/Tween) y con un 2% de leche desnatada en polvo. Se deja en un recipiente durante 1 hora a temperatura ambiente o bien durante toda la noche a 4°C en función de cuando se vaya a continuar el experimento.

La solución PBS/Tween se prepara con:

1 litro de PBS

5 ml de polioxietileno-sorbitan-monolaurato

9 litros de agua destilada.

Para proseguir debe lavarse la membrana con PBS/Tween durante 5 minutos en el agitador tras haberse procedido al bloqueo.

Anticuerpos

Elección del sistema de anticuerpos.

El tipo de anticuerpos empleado en la detección de las proteínas transferidos a filtro no es determinante. Existen tanto excelentes anticuerpos policlonales con alta especificidad y sensibilidad como monoclonales. Sin embargo los monoclonales se pueden obtener en mayor cantidad y mantienen siempre sus propiedades de reconocimiento independientemente del lote.

Los anticuerpos han sido suministrados desde distintos laboratorios que los comercializan, las distintas empresas son AbCam, Santa Cruz, Exalpha, BioRad y Upstate.

Anticuerpos primarios

Para la determinación de EGFR se ha utilizado un anticuerpo policlonal IgG obtenido de conejo. Para HER-2 se utiliza un anticuerpo monoclonal obtenido de ratón. Para VEGFR-1 se emplea un anticuerpo IgG policlonal de conejo y para VEGFR-2 un

anticuerpo monoclonal obtenido de ratón. Para el resto de receptores de tirosina kinasa se utilizan anticuerpos obtenidos de conejo policlonales (Tabla 1)

RECEPTOR TIROSINA KINASA	ANTICUERPO 1º	ANTICUERPO 2º
EGFR	CONEJO / policlonal	CABRA anti-conejo
HER-2	RATON / monoclonal	CABRA anti-ratón
VEGFR-1	CONEJO / policlonal	CABRA anti-conejo
VEGFR-2	RATON / monoclonal	CABRA anti-ratón
TIE-1	CONEJO / policlonal	CABRA anti-conejo
TIE-2	CONEJO / policlonal	CABRA anti-conejo
PDGFR-ALFA	CONEJO / policlonal	CABRA anti-conejo
PDGFR-BETA	CONEJO / policlonal	CABRA anti-conejo
MET	CONEJO / policlonal	CABRA anti-conejo
AXL	CONEJO / policlonal	CABRA anti-conejo
RON BETA	CONEJO / policlonal	CABRA anti-conejo

Tabla 1. Anticuerpos utilizados para la detección de receptores de tirosina-kinasa.

Para las fosfatasas de la proteína tirosina se utilizaron, en el caso de PTP-1b un anticuerpo IgG policlonal obtenido de conejo, para SH-PTP1 un anticuerpo IgG monoclonal obtenido de ratón y para LMW-PTP se utilizó un anticuerpo policlonal IgG obtenido de oveja (Tabla 2)

FOSFATASA PROTEINA TIROSINA	ANTICUERPO 1°	ANTICUERPO 2°
PTP-1B	CONEJO / policlonal	CABRA anti-conejo
SH-PTP1	RATON / monoclonal	CABRA anti-ratón
LMW-PTP	OVEJA / policlonal	CONEJO anti-oveja

Tabla 2. Anticuerpos utilizados para la detección de fosfatasas de la proteína tirosina.

Utilizamos el primer anticuerpo comercial (figura 6) dirigido frente al antígeno (receptor de tirosina kinasa). Se diluye en 10 ml de PBS/Tween y un 2% de leche desnatada en polvo. Se introduce en un tubo cerrado de 50ml y se incuba durante 1 hora con agitación constante para que dicho anticuerpo se adhiera a las proteínas fijadas en la membrana.

Tras la incubación se procede a lavar 3 veces con PBS/Tween durante 10 minutos cada lavado.

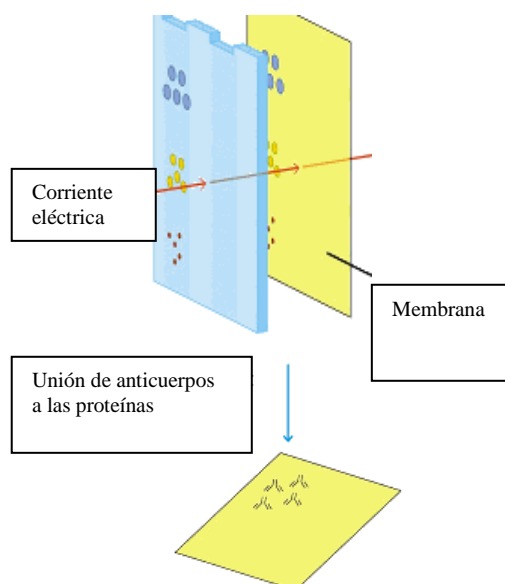


Figura 6. Adición del primer anticuerpo a la membrana quedando fijado a las proteínas.

Anticuerpos secundarios

Como anticuerpos secundarios se suelen emplear anticuerpos obtenidos inoculando en una especie distinta a la especie que ha originado el anticuerpo primario (tabla 1 y 2), inmunoglobulinas de la especie a detectar (anticuerpos anti-especie). También se emplean los fragmentos Fab2, producidos mediante digestión con pepsina de los anticuerpos puros, y que, al carecer de región Fc no interfieren con algunos componentes de los tejidos que pueden estar presentes en las muestras biológicas complejas, reduciendo el 'background'.

Tras el lavado añadimos el 2º anticuerpo que va dirigido contra el anterior anticuerpo de forma que se amplifica la reacción inmune. (figura 7) La adición del 2º anticuerpo se realiza de la misma forma que para el primero con idéntica dilución y el mismo tiempo de incubación.

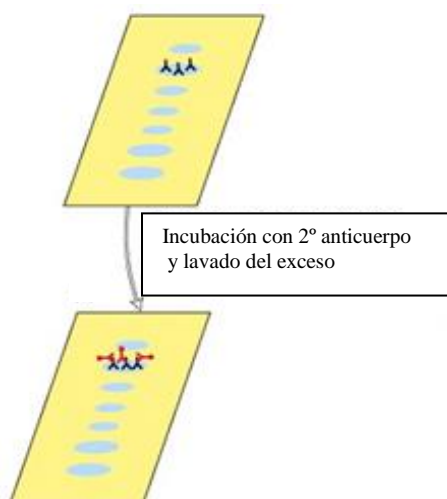


Figura 7. Adición del 2º anticuerpo que se une al primero con especificidad antiespecie.

Inmunoluminiscencia

La última fase de la detección es la que realmente nos hace ver la reacción inmune, puede realizarse de distintas formas, como por ejemplo con colorantes que marquen los anticuerpos unidos.

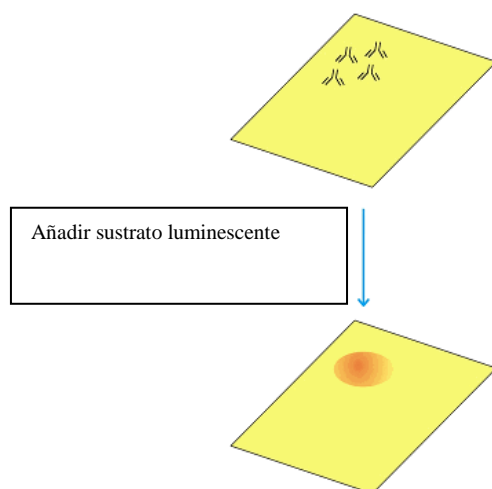


Figura 8. Adición de sustrato luminescente sobre la membrana de forma que quedan realizadas las bandas de Western-Blot.

Una manera más cuantitativa (por lo que veremos después) es el marcaje con un reactivo quimioluminescente (figura 8) que es el utilizado en nuestro experimento. Consta de 2 reactivos: 2 ml de reactivo oxidante y 2 ml de reactivo luminol que al reaccionar producen luminescencia (figura 9). Dicha mezcla se realiza sobre un papel plástico transparente y se pone en contacto con la cara de la membrana en la que están unidas las proteínas de forma que marcan con luminescencia las bandas en las que se aglutinan los anticuerpos. Para detectarlas y realizar la lectura se envuelve la membrana con el sobrante del papel plástico y se coloca en una placa fotográfica en contacto con papel radiográfico (en una sala oscura) para que se sobreimpresione durante 1 a 3 minutos en función de la cantidad de luminescencia, repitiendo las veces que sean necesarias la exposición ajustando el tiempo para que las bandas que se observan posteriormente sean de buena calidad (figura 10).

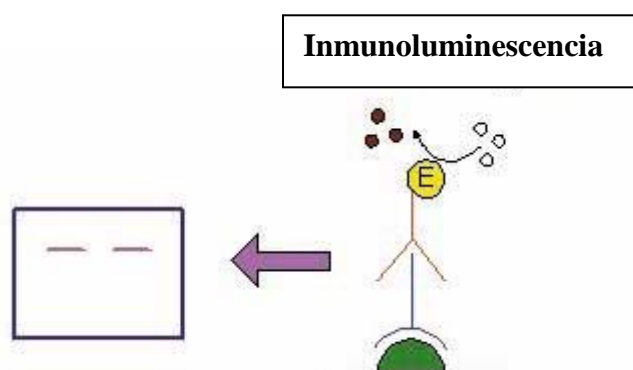


Figura 9. Transferencia y detalle de migración de polo negativo a positivo.

El resultado final es el de la visualización de bandas en un papel radiográfico o fotográfico:

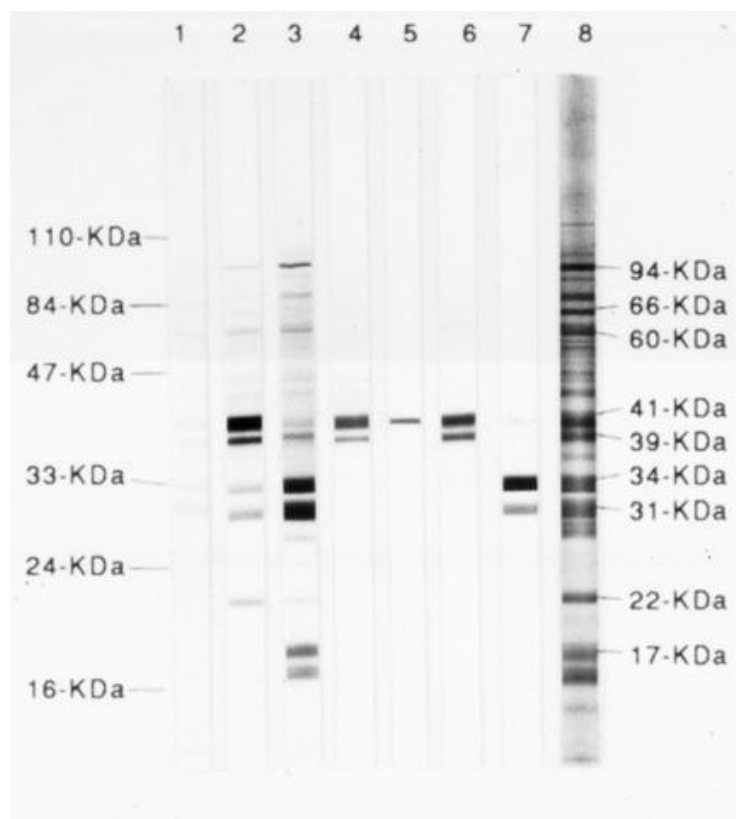


Figura 10. Ejemplo de resultado final de Western-Blot.

Hay que especificar que para cada antígeno cuya expresión estudiamos realizamos esta técnica en paralelo con un anticuerpo anti-beta actina que nos permitirá comparar las distintas densidades ópticas de las bandas. Ya sabemos que la beta-actina es una proteína que se encuentra en todas las células, de forma que es un buen control para el procedimiento.

Sistema de densitometría “Labworks”

La manera de cuantificar la expresión de la proteína estudiada es analizar la densidad de las bandas mediante un densitómetro óptico que capta las distintas densidades y las compara entre sí de forma que mediante una aplicación informática (Labworks 302) asigna un valor de expresión en función de la densidad de la banda. La ventaja es que utilizamos el propio papel radiográfico sobre el que se ha realizado la impresión lumínica.

Las imágenes obtenidas de cada Western-Blot se digitalizaron y analizaron mediante un equipo de densitometría digital (Labworks 302 Analysis Software). Se trata de un sistema de densitometría digital que capta la imagen a través de un transiluminador (figura 11) que emite luz blanca o luz ultravioleta en función del experimento que estemos realizando.



Figura 11. Transiluminador utilizado.

La imagen digital se capta mediante una videocámara (Figura 12) a una distancia focal de 20 cm aproximadamente, que está conectada a un ordenador en el que realizaremos un tratamiento informático de la imagen captada.



Figura 12. Videocámara utilizada.

El análisis digital de imagen permite realizar una cuantificación densitométrica de las bandas. Para ello, el densitómetro debe evaluar la intensidad de la luz reflejada en forma de densidad óptica. El programa (figura 13) calcula una ratio de densidad tras comparar las distintas bandas entre sí.

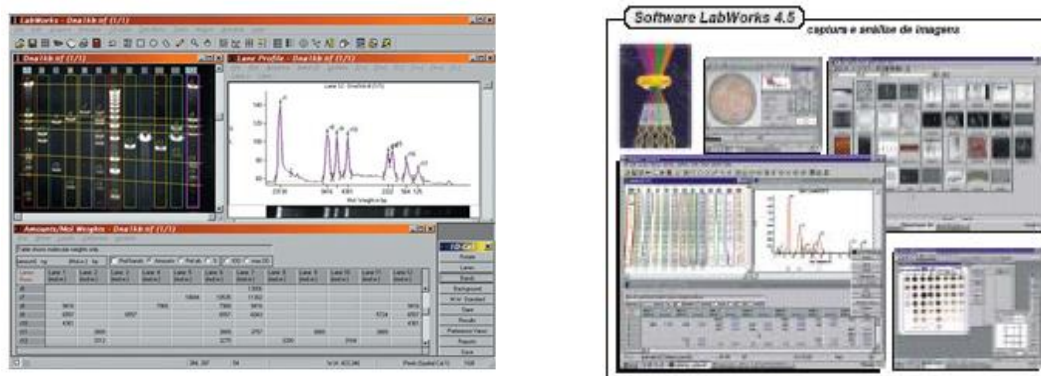


Figura 13. Detalle del programa de densitometría digital.

La técnica del Western-Blot es fácilmente reproducible, es costosa (en cuanto a tiempo se refiere) pero es muy objetiva, ya que, como ya hemos comentado tenemos un valor

de referencia que es la expresión de beta-actina (proteína presente en todas las células) con un peso molecular de unos 40kdaltons aproximadamente.

El Western-blot se presenta como una técnica adecuada para la determinación cuantitativa de la expresión de receptores de tirosina kinasa y de fosfatasa de la proteína tirosina. Es una técnica fácilmente reproducible, que requiere un adiestramiento básico y que no emplea una tecnología de altos costes salvo los anticuerpos sintéticos dirigidos contra las proteínas objeto de nuestro estudio. Puede ser un método objetivo de detección, válido para todos los tipos de neoplasia. Sus limitaciones pueden ser la falta de especificidad de algunos anticuerpos utilizados o las mutaciones que producen variaciones en los dominios de unión a dichos anticuerpos reactivos.

LINEAS CELULARES

Utilizamos líneas celulares de carcinoma de células renales obtenidas a partir de tumores inducidos en ratones y puestas en cultivo, que se mantienen congeladas en los laboratorios de la Universidad de Pittsburgh.

Tenemos acceso a cinco líneas celulares, con las que desarrollamos nuestros experimentos. Son carcinomas de células renales de células claras en los 5 casos y se denominan SLR 20, SLR 21, SLR 22, SLR 24, SLR 25. [94]

Una 6ª línea celular, HK-2, se asemeja al tejido renal normal por lo que nos sirve para comparación de expresión.

Las diferencias entre ellas pueden verse en el comportamiento de los cultivos, su morfología es distinta, aunque esto no tiene trascendencia. Sí es más importante su velocidad de crecimiento: SLR 20 y SLR 21 tienen un crecimiento más rápido en los cultivos obteniendo de forma más rápida una confluencia del 90%. SLR 25 tiene un crecimiento mucho más lento. SLR 22 y SLR 24 tienen una velocidad intermedia de crecimiento. No podemos sacar conclusiones en cuanto al fenotipo más o menos agresivo de estas líneas sólo por su comportamiento en cultivos pero podemos hacer una pequeña aproximación en cuanto a si se correlacionan las líneas de más rápida multiplicación con la mayor sobreexpresión de unas proteínas u otras.

Para utilizarlas procedemos a su descongelación y eliminación del conservante (DMSO) y a la inmediata adición de un medio de cultivo. EL DMSO (dimetil-sulfóxido: $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$) es un tóxico celular a temperatura ambiente, por ello se añade rápidamente medio de cultivo, de forma que el DMSO queda diluido y no resulta tan tóxico para las

células a esa concentración. Posteriormente se elimina la mezcla y se introducen las células en un medio RPMI-1640 suplementado con:

10% de suero fetal bovino inactivado por calor

100 U/ml de penicilina

100 microgramos de estreptomicina

10 milimoles de L-glutamina

Las sembramos en placas de cultivo, manteniéndolas en una estufa con atmósfera humidificada, bajo una presión de CO₂ del 5% y a 37°, de forma que pudieramos disponer de ellas en el momento en que presenten confluencia superior al 90%.

No existen muchas líneas celulares que asemejen al tejido renal normal humano. La línea celular HK-2 resulta de la exposición de células renales normales a la acción de un retrovirus que contiene los genes E6 y E7 del virus del papiloma humano con lo que adopta la capacidad de proliferar. Esta línea se obtuvo en 1993 por científicos del Fred Hutchinson Cancer Research Center de Seattle (Washington). [95]

Esta es la línea celular que utilizamos como control de comparación de expresión de receptores de tirosina kinasa. Tiene niveles de expresión asemejables al tejido renal no tumoral.

Lo que podemos decir de estas líneas celulares es que tienen una velocidad distinta de crecimiento en las mismas condiciones de cultivo por lo que alcanzan la confluencia unas líneas antes que otras.

Manejo de las células y de los residuos

Toda la técnica en la que haya que manipular las células fuera de su medio de cultivo requiere condiciones de máxima asepsia y se realiza en el interior de una campana de flujo laminar.

Todos los materiales biológicos utilizados y los detritus celulares son eliminados en contenedores especiales. Los líquidos biológicos son mezclados con lejía y posteriormente se eliminan. Los utensilios utilizados (pipetas, placas de cultivo, etc) se desechan también en contenedores destinados a este uso. La campana de flujo laminar evita que los cultivos y las células se contaminen durante la manipulación gracias a que se obtiene un área de aire sin partículas mediante el barrido continuo por flujo descendente de aire ultrafiltrado en régimen laminar.

Técnica de cultivo de líneas celulares

La obtención de células para la realización de los experimentos se realiza a partir de las líneas celulares de carcinoma de células renales de ratón que se encuentran en cultivo a 37°C cuando presentan más de un 90% de confluencia.

La técnica es sencilla: consiste inicialmente en desechar el medio de la placa de cultivo de forma que solo quedan las células adheridas a la placa y detritus. Para eliminar los detritus realizamos lavado con PBS y agitamos suavemente para luego desechar el PBS con los detritus.

Una vez que las células quedan con la mínima cantidad de detritus posible se procede a separarlas de la placa de cultivo y a separarlas entre ellas mediante IX tripsina, una enzima que se encarga de romper los lazos intercelulares y entre las células y la placa.

Utilizamos 0.5 ml de tripsina y se añade a la placa homogeneizando suavemente y se deja durante unos 2 minutos a 37°C para que actúe. La limitación de este tiempo es fundamental para evitar que la tripsina pueda romper las membranas celulares. Se observa el microscopio periódicamente para ver la separación de las células.

Tras este tiempo añadimos medio de cultivo RPMI/FBS y se recoge todo el contenido de la placa en un tubo para centrifugarlo y eliminar el sobrenadante. Posteriormente se añaden 2 ml de medio al tubo y se resuspende el “pellet” o botón celular suavemente. Utilizaremos parte de estas células para realizar una nueva siembra en otra placa de cultivo para perpetuarlo y el resto lo utilizaremos para proceder a su lisado y su estudio por Western Blot.

Es importante la cantidad de células resuspendidas que se utilizan para perpetuar el cultivo, depende de la velocidad de crecimiento y de agregación de esas líneas celulares. A mayor velocidad de crecimiento y de confluencia sembraremos menor cantidad de células en el cultivo de forma que quedarán más diluidas en el medio.

El medio de cultivo utilizado es RPMI/FBS:

-RPMI 1640 450ml.

-Buffer HEPES 5ml.

-Penicilina y estreptomina 5ml

-L-Glutamina 5ml

-Suero fetal bovino 50ml

Todos estos productos fueron suministrados por GIBCO/Life Technologies, Grand Island, Nueva York al laboratorio de Investigación del Hillman Cancer Center.

Una vez finalizados los experimentos en lugar de mantener la línea en cultivo puede mantenerse congelada a -80°C , para ello previamente se resuspende en un medio de congelación. En concreto utilizamos una mezcla al 50% de FCS, 40% RPMI y un 10% de DMSO. La congelación se realiza de forma lenta y gradual mediante un congelador programado, para proteger las membranas celulares y no se debe alcanzar la temperatura máxima de congelado en un tiempo inferior a 2 horas.

El DMSO protege a la célula durante la congelación, evitando su cristalización y rotura de las membranas.

EXPERIMENTOS REALIZADOS

Determinación de expresión de EGFR

Muestras

A partir de las líneas celulares en cultivo SLR20, SLR21, SLR22, SLR24, SLR25 y HK obtenemos lisados celulares tras separación de las placas de cultivo mediante adición de 0.5ml de tripsina que actúa durante 2 minutos y tras este tiempo añadimos medio de cultivo RPMI/FBS y se recoge todo el contenido de la placa en un tubo para centrifugarlo y eliminar el sobrenadante. Posteriormente se añaden 2 ml de medio al tubo y se resuspende el “pellet” o botón celular suavemente. Utilizaremos parte de estas células para realizar una nueva siembra en otra placa de cultivo para perpetuarlo y el resto lo utilizaremos para proceder a su lisado. Se añade PBS 2 veces como solución de limpieza y se elimina el medio de cultivo quedando las células limpias de cualquier residuo. Se añaden 500 microlitros de una solución tampón (x1 lysis buffer) al frasco.

El frasco se coloca en un recipiente con hielo para llevarlo a una cámara frigorífica en cuyo interior se encuentra el agitador. Se agita durante 30 minutos para que las células se mezclen bien con la solución lisante. Una vez obtenido el lisado se transfiere a un tubo eppendorf y se centrifuga durante 10 minutos a velocidad de 13500 revoluciones por minuto. Se prepara un tampón con 5% de 2-Mercaptoetanol y “laemmli-buffer”. Se diluyen las muestras en una proporción 1/1 y se mantienen en hielo. Se introducen en el termociclador a 100°C durante 10 minutos.

Electroforesis

Utilizamos para la técnica 300 ml de 1xSDS (tampón para la electroforesis) por lo que diluimos 30 ml de 10x SDS running buffer con 270 ml de agua destilada.

La separación de proteínas se realizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (10%) en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Se utilizaron patrones de peso molecular de rango amplio para la detección (Laboratorios Bio-Rad).

Primero se dispensan 10 microlitros de un marcador (kaleidoscope 99077, Laboratorios BioRad) que tiene un colorante determinado que marca distintos pesos moleculares con distintos colores, para poder seguir la migración de las proteínas. Posteriormente se administran 30 microlitros de las muestras de cada línea celular en los pocillos.

Con el tampón de electroforesis se rellena la cubeta cuidadosamente, primero por la parte interna del gel y posteriormente por la parte externa y se establece una diferencia de potencial de 140 Voltios durante una hora.

Transferencia

Tras la migración, el gel se sumerge en una pequeña cubeta con tampón de transferencia para equilibrarlo durante 20 minutos. Se recorta la membrana de polivinilo a la medida del gel e introducimos dicha membrana en otra pequeña cubeta con ME-OH (Hidroxido de metanol) durante 15 segundos. Posteriormente la introducimos en una segunda cubeta con el tampón de transferencia para equilibrarla durante 2 minutos.

Se realiza la transferencia recordando que la membrana debe quedar próxima al polo positivo del cassette de transferencia y el gel próximo al polo negativo. Se establece una diferencia de potencial de 100V durante una hora.

Marcaje con anticuerpos

Posteriormente se sumerge en Me-OH durante 10 segundos para eliminar las impurezas y se deja secar durante 15 minutos.

Se procede al “bloqueo” de la membrana a la que se han adherido las proteínas con 50 ml de PBS, solución Tween 20 0.05% (PBS/Tween) y con un 2% de leche desnatada en polvo. Se deja en un recipiente durante toda la noche a 4°C.

Tras este paso, lavado de la membrana con PBS/Tween durante 5 minutos en el agitador. Se realiza marcaje con anticuerpo 1° de Conejo policlonal (Santa Cruz. USA) y el anticuerpo 2° es de cabra anticonejo (Santa Cruz. USA). Se diluye en 10 ml de PBS/Tween y un 2% de leche desnatada en polvo. Se introduce en un tubo cerrado de 50ml y se incuba durante 1 hora con agitación constante para que dicho anticuerpo se adhiera a las proteínas fijadas en la membrana. Tras la incubación se procede a lavar 3 veces con PBS/Tween durante 10 minutos cada lavado. La adición del 2° anticuerpo se realiza de la misma forma que para el primero con idéntica dilución y el mismo tiempo de incubación.

Detección y digitalización

Añadimos posteriormente 2 ml de reactivo oxidante y 2 ml de reactivo luminol que al reaccionar producen luminescencia sobre un papel plástico transparente y se pone en contacto con la cara de la membrana en la que están unidas las proteínas. Se envuelve la membrana con el sobrante del papel plástico y se coloca en una placa fotográfica en contacto con papel radiográfico (en una sala oscura) para que se sobreimpresione durante 2 minutos. Las imágenes obtenidas en papel radiográfico se digitalizaron y analizaron mediante un equipo de densitometría digital (Labworks 302 Analysis Software).

La banda detectada se corresponde con un peso molecular de 170 kda.

Determinación de expresión de HER-2

Muestras

Líneas celulares en cultivo SLR20, SLR21, SLR22, SLR24, SLR25 y HK.

Lisados celulares : se transfiere a un tubo eppendorf y se centrifuga durante 10 minutos a velocidad de 13500 revoluciones por minuto.

Dilución 1/1 en tampón con 5% de 2-Mercaptoetanol y “laemmli-buffer” y se mantienen en hielo.

Termociclador a 100°C durante 10 minutos.

Electroforesis

Tampón de electroforesis: 300 ml de 1xSDS (tampón para la electroforesis): 30 ml de 10x SDS running buffer con 270 ml de agua destilada.

Gel de poliacrilamida (10%) (Laboratorios Bio-Rad) en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

Marcador de peso molecular: 10 microlitros de Kaleidoscope 99077 (Laboratorios BioRad).

30 microlitros de las muestras de cada línea celular en los pocillos.

Con el tampón de electroforesis se rellena la cubeta y se establece una diferencia de potencial de 140 Voltios durante una hora.

Transferencia

Equilibrado 20 minutos del gel en una pequeña cubeta con tampón de transferencia.

Se recorta la membrana de polivinilo a la medida del gel e introducimos dicha membrana en otra pequeña cubeta con ME-OH (Hidroxido de metanol) durante 15 segundos. Posteriormente la introducimos en una segunda cubeta con el tampón de transferencia para equilibrarla durante 2 minutos.

Diferencia de potencial de 100V durante una hora.

Posteriormente se sumerge en Me-OH durante 10 segundos y se deja secar 15 minutos.

Marcaje con anticuerpos

Bloqueo de la membrana con 50 ml de PBS, solución Tween 20 0.05% (PBS/Tween) y con un 2% de leche desnatada en polvo. Se deja en un recipiente durante toda la noche a 4°C.

Lavado de membrana con PBS/Tween durante 5 minutos en el agitador.

Marcaje con anticuerpo 1° de Ratón monoclonal (Santa Cruz. USA) y el anticuerpo 2° es de cabra antiratón (Santa Cruz. USA). Se diluye en 10 ml de PBS/Tween y un 2% de leche desnatada en polvo en un tubo cerrado de 50ml y se incuba durante 1 hora con agitación constante.

Tras la incubación 3 lavados con PBS/Tween durante 10 minutos cada uno.

Adición del 2° anticuerpo se realiza de la misma forma que para el primero .

Detección y digitalización

2 ml de reactivo oxidante y 2 ml de reactivo luminol

Envoltura de la membrana en papel plástico y en una placa fotográfica en contacto con papel radiográfico con sobreimpresión durante 2 minutos.

Las imágenes obtenidas en papel radiográfico se digitalizaron y analizaron mediante un equipo de densitometría digital (Labworks 302 Analysis Software).

La banda detectada se corresponde con un peso molecular de 185 kda.

Determinación de expresión de VEGFR-1

Muestras

Líneas celulares en cultivo SLR20, SLR21, SLR22, SLR24, SLR25 y HK.

Lisados celulares : se transfiere a un tubo eppendorf y se centrifuga durante 10 minutos a velocidad de 13500 revoluciones por minuto.

Dilución 1/1 en tampón con 5% de 2-Mercaptoetanol y “laemmli-buffer” y se mantienen en hielo.

Termociclador a 100°C durante 10 minutos.

Electroforesis

Tampón de electroforesis: 300 ml de 1xSDS (tampón para la electroforesis): 30 ml de 10x SDS running buffer con 270 ml de agua destilada.

Gel de poliacrilamida (10%) (Laboratorios Bio-Rad) en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

Marcador de peso molecular: 10 microlitros de Kaleidoscope 99077 (Laboratorios BioRad).

30 microlitros de las muestras de cada línea celular en los pocillos.

Con el tampón de electroforesis se rellena la cubeta y se establece una diferencia de potencial de 140 Voltios durante una hora.

Transferencia

Equilibrado 20 minutos del gel en una pequeña cubeta con tampón de transferencia.

Se recorta la membrana de polivinilo a la medida del gel e introducimos dicha membrana en otra pequeña cubeta con ME-OH (Hidroxido de metanol) durante 15 segundos. Posteriormente la introducimos en una segunda cubeta con el tampón de transferencia para equilibrarla durante 2 minutos.

Diferencia de potencial de 100V durante una hora.

Posteriormente se sumerge en Me-OH durante 10 segundos y se deja secar 15 minutos.

Marcaje con anticuerpos

Bloqueo de la membrana con 50 ml de PBS, solución Tween 20 0.05% (PBS/Tween) y con un 2% de leche desnatada en polvo. Se deja en un recipiente durante toda la noche a 4°C.

Lavado de membrana con PBS/Tween durante 5 minutos en el agitador.

Marcaje con anticuerpo 1° de Conejo policlonal (Santa Cruz. USA) y el anticuerpo 2° es de cabra anticonejo (Santa Cruz. USA). Se diluye en 10 ml de PBS/Tween y un 2% de leche desnatada en polvo en un tubo cerrado de 50ml y se incuba durante 1 hora con agitación constante.

Tras la incubación 3 lavados con PBS/Tween durante 10 minutos cada uno.

Adición del 2° anticuerpo se realiza de la misma forma que para el primero .

Detección y digitalización

2 ml de reactivo oxidante y 2 ml de reactivo luminol

Envoltura de la membrana en papel plástico y en una placa fotográfica en contacto con papel radiográfico con sobreimpresión durante 2 minutos.

Las imágenes obtenidas en papel radiográfico se digitalizaron y analizaron mediante un equipo de densitometría digital (Labworks 302 Analysis Software).

La banda detectada se corresponde con un peso molecular de 180 kda.

Determinación de expresión de VEGFR-2

Muestras

Líneas celulares en cultivo SLR20, SLR21, SLR22, SLR24, SLR25 y HK.

Lisados celulares : se transfiere a un tubo eppendorf y se centrifuga durante 10 minutos a velocidad de 13500 revoluciones por minuto.

Dilución 1/1 en tampón con 5% de 2-Mercaptoetanol y “laemmli-buffer” y se mantienen en hielo.

Termociclador a 100°C durante 10 minutos.

Electroforesis

Tampón de electroforesis: 300 ml de 1xSDS (tampón para la electroforesis): 30 ml de 10x SDS running buffer con 270 ml de agua destilada.

Gel de poliacrilamida (10%) (Laboratorios Bio-Rad) en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

Marcador de peso molecular: 10 microlitros de Kaleidoscope 99077 (Laboratorios BioRad).

30 microlitros de las muestras de cada línea celular en los pocillos.

Con el tampón de electroforesis se rellena la cubeta y se establece una diferencia de potencial de 140 Voltios durante una hora.

Transferencia

Equilibrado 20 minutos del gel en una pequeña cubeta con tampón de transferencia.

Se recorta la membrana de polivinilo a la medida del gel e introducimos dicha membrana en otra pequeña cubeta con ME-OH (Hidroxido de metanol) durante 15 segundos. Posteriormente la introducimos en una segunda cubeta con el tampón de transferencia para equilibrarla durante 2 minutos.

Diferencia de potencial de 100V durante una hora.

Posteriormente se sumerge en Me-OH durante 10 segundos y se deja secar 15 minutos.

Marcaje con anticuerpos

Bloqueo de la membrana con 50 ml de PBS, solución Tween 20 0.05% (PBS/Tween) y con un 2% de leche desnatada en polvo. Se deja en un recipiente durante toda la noche a 4°C.

Lavado de membrana con PBS/Tween durante 5 minutos en el agitador.

Marcaje con anticuerpo 1° de Ratón monoclonal (Santa Cruz. USA) y el anticuerpo 2° es de cabra antiratón (Santa Cruz. USA). Se diluye en 10 ml de PBS/Tween y un 2% de leche desnatada en polvo en un tubo cerrado de 50ml y se incuba durante 1 hora con agitación constante.

Tras la incubación 3 lavados con PBS/Tween durante 10 minutos cada uno.

Adición del 2° anticuerpo se realiza de la misma forma que para el primero .

Detección y digitalización

2 ml de reactivo oxidante y 2 ml de reactivo luminol

Envoltura de la membrana en papel plástico y en una placa fotográfica en contacto con papel radiográfico con sobreimpresión durante 2 minutos.

Las imágenes obtenidas en papel radiográfico se digitalizaron y analizaron mediante un equipo de densitometría digital (Labworks 302 Analysis Software).

La banda detectada se corresponde con un peso molecular de 195 a 235 kda.

Determinación de expresión de MET

Muestras

Líneas celulares en cultivo SLR20, SLR21, SLR22, SLR24, SLR25 y HK.

Lisados celulares : se transfiere a un tubo eppendorf y se centrifuga durante 10 minutos a velocidad de 13500 revoluciones por minuto.

Dilución 1/1 en tampón con 5% de 2-Mercaptoetanol y “laemmli-buffer” y se mantienen en hielo.

Termociclador a 100°C durante 10 minutos.

Electroforesis

Tampón de electroforesis: 300 ml de 1xSDS (tampón para la electroforesis): 30 ml de 10x SDS running buffer con 270 ml de agua destilada.

Gel de poliacrilamida (10%) (Laboratorios Bio-Rad) en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

Marcador de peso molecular: 10 microlitros de Kaleidoscope 99077 (Laboratorios BioRad).

30 microlitros de las muestras de cada línea celular en los pocillos.

Con el tampón de electroforesis se rellena la cubeta y se establece una diferencia de potencial de 140 Voltios durante una hora.

Transferencia

Equilibrado 20 minutos del gel en una pequeña cubeta con tampón de transferencia.

Se recorta la membrana de polivinilo a la medida del gel e introducimos dicha membrana en otra pequeña cubeta con ME-OH (Hidroxido de metanol) durante 15 segundos. Posteriormente la introducimos en una segunda cubeta con el tampón de transferencia para equilibrarla durante 2 minutos.

Diferencia de potencial de 100V durante una hora.

Posteriormente se sumerge en Me-OH durante 10 segundos y se deja secar 15 minutos.

Marcaje con anticuerpos

Bloqueo de la membrana con 50 ml de PBS, solución Tween 20 0.05% (PBS/Tween) y con un 2% de leche desnatada en polvo. Se deja en un recipiente durante toda la noche a 4°C.

Lavado de membrana con PBS/Tween durante 5 minutos en el agitador.

Marcaje con anticuerpo 1° de conejo policlonal (Santa Cruz. USA) y el anticuerpo 2° es de cabra anticonejo (Santa Cruz. USA). Se diluye en 10 ml de PBS/Tween y un 2% de leche desnatada en polvo en un tubo cerrado de 50ml y se incuba durante 1 hora con agitación constante.

Tras la incubación 3 lavados con PBS/Tween durante 10 minutos cada uno.

Adición del 2° anticuerpo se realiza de la misma forma que para el primero .

Detección y digitalización

2 ml de reactivo oxidante y 2 ml de reactivo luminol

Envoltura de la membrana en papel plástico y en una placa fotográfica en contacto con papel radiográfico con sobreimpresión durante 2 minutos.

Las imágenes obtenidas en papel radiográfico se digitalizaron y analizaron mediante un equipo de densitometría digital (Labworks 302 Analysis Software).

La banda detectada se corresponde con un peso molecular de 140 kda.

Determinación de expresión de AXL

Muestras

Líneas celulares en cultivo SLR20, SLR21, SLR22, SLR24, SLR25 y HK.

Lisados celulares : se transfiere a un tubo eppendorf y se centrifuga durante 10 minutos a velocidad de 13500 revoluciones por minuto.

Dilución 1/1 en tampón con 5% de 2-Mercaptoetanol y “laemmli-buffer” y se mantienen en hielo.

Termociclador a 100°C durante 10 minutos.

Electroforesis

Tampón de electroforesis: 300 ml de 1xSDS (tampón para la electroforesis): 30 ml de 10x SDS running buffer con 270 ml de agua destilada.

Gel de poliacrilamida (10%) (Laboratorios Bio-Rad) en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

Marcador de peso molecular: 10 microlitros de Kaleidoscope 99077 (Laboratorios BioRad).

30 microlitros de las muestras de cada línea celular en los pocillos.

Con el tampón de electroforesis se rellena la cubeta y se establece una diferencia de potencial de 140 Voltios durante una hora.

Transferencia

Equilibrado 20 minutos del gel en una pequeña cubeta con tampón de transferencia.

Se recorta la membrana de polivinilo a la medida del gel e introducimos dicha membrana en otra pequeña cubeta con ME-OH (Hidroxido de metanol) durante 15 segundos. Posteriormente la introducimos en una segunda cubeta con el tampón de transferencia para equilibrarla durante 2 minutos.

Diferencia de potencial de 100V durante una hora.

Posteriormente se sumerge en Me-OH durante 10 segundos y se deja secar 15 minutos.

Marcaje con anticuerpos

Bloqueo de la membrana con 50 ml de PBS, solución Tween 20 0.05% (PBS/Tween) y con un 2% de leche desnatada en polvo. Se deja en un recipiente durante toda la noche a 4°C.

Lavado de membrana con PBS/Tween durante 5 minutos en el agitador.

Marcaje con anticuerpo 1° de conejo policlonal (Santa Cruz. USA) y el anticuerpo 2° es de cabra anticonejo (Santa Cruz. USA). Se diluye en 10 ml de PBS/Tween y un 2% de leche desnatada en polvo en un tubo cerrado de 50ml y se incuba durante 1 hora con agitación constante.

Tras la incubación 3 lavados con PBS/Tween durante 10 minutos cada uno.

Adición del 2° anticuerpo se realiza de la misma forma que para el primero .

Detección y digitalización

2 ml de reactivo oxidante y 2 ml de reactivo luminol

Envoltura de la membrana en papel plástico y en una placa fotográfica en contacto con papel radiográfico con sobreimpresión durante 2 minutos.

Las imágenes obtenidas en papel radiográfico se digitalizaron y analizaron mediante un equipo de densitometría digital (Labworks 302 Analysis Software).

La banda detectada se corresponde con un peso molecular de 140 kda.

Determinación de expresión de RON BETA

Muestras

Líneas celulares en cultivo SLR20, SLR21, SLR22, SLR24, SLR25 y HK.

Lisados celulares : se transfiere a un tubo eppendorf y se centrifuga durante 10 minutos a velocidad de 13500 revoluciones por minuto.

Dilución 1/1 en tampón con 5% de 2-Mercaptoetanol y “laemmli-buffer” y se mantienen en hielo.

Termociclador a 100°C durante 10 minutos.

Electroforesis

Tampón de electroforesis: 300 ml de 1xSDS (tampón para la electroforesis): 30 ml de 10x SDS running buffer con 270 ml de agua destilada.

Gel de poliacrilamida (10%) (Laboratorios Bio-Rad) en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

Marcador de peso molecular: 10 microlitros de Kaleidoscope 99077 (Laboratorios BioRad).

30 microlitros de las muestras de cada línea celular en los pocillos.

Con el tampón de electroforesis se rellena la cubeta y se establece una diferencia de potencial de 140 Voltios durante una hora.

Transferencia

Equilibrado 20 minutos del gel en una pequeña cubeta con tampón de transferencia.

Se recorta la membrana de polivinilo a la medida del gel e introducimos dicha membrana en otra pequeña cubeta con ME-OH (Hidroxido de metanol) durante 15 segundos. Posteriormente la introducimos en una segunda cubeta con el tampón de transferencia para equilibrarla durante 2 minutos.

Diferencia de potencial de 100V durante una hora.

Posteriormente se sumerge en Me-OH durante 10 segundos y se deja secar 15 minutos.

Marcaje con anticuerpos

Bloqueo de la membrana con 50 ml de PBS, solución Tween 20 0.05% (PBS/Tween) y con un 2% de leche desnatada en polvo. Se deja en un recipiente durante toda la noche a 4°C.

Lavado de membrana con PBS/Tween durante 5 minutos en el agitador.

Marcaje con anticuerpo 1° de conejo policlonal (Santa Cruz. USA) y el anticuerpo 2° es de cabra anticonejo (Santa Cruz. USA). Se diluye en 10 ml de PBS/Tween y un 2% de leche desnatada en polvo en un tubo cerrado de 50ml y se incuba durante 1 hora con agitación constante.

Tras la incubación 3 lavados con PBS/Tween durante 10 minutos cada uno.

Adición del 2° anticuerpo se realiza de la misma forma que para el primero .

Detección y digitalización

2 ml de reactivo oxidante y 2 ml de reactivo luminol

Envoltura de la membrana en papel plástico y en una placa fotográfica en contacto con papel radiográfico con sobreimpresión durante 2 minutos.

Las imágenes obtenidas en papel radiográfico se digitalizaron y analizaron mediante un equipo de densitometría digital (Labworks 302 Analysis Software).

La banda detectada se corresponde con un peso molecular de 185 kda.

Determinación de expresión de PDGFR-ALFA Y BETA

El experimento para ambas proteínas se realizó en idénticas condiciones que para los receptores de tirosina-kinasa ya descritos.

No se detalla el procedimiento ni se describirán los resultados ya que el anticuerpo primario utilizado para cada experimento carecía de la especificidad suficiente para detectar una banda válida que correspondiese con el peso molecular de las 2 proteínas: 185 y 180 kda respectivamente. Los anticuerpos primarios utilizados son policlonales de conejo.

No se debió a un error en el experimento ya que la banda correspondiente a la beta-actina se detectaba de forma objetiva.

Determinación de TIE-1 y TIE-2

Sirve lo comentado anteriormente para PDGFR-alfa y beta. Los anticuerpos primarios utilizados carecían de especificidad suficiente.

Determinación de expresión de SH-PTP1

Muestras

Líneas celulares en cultivo SLR20, SLR21, SLR22, SLR24, SLR25 y HK.

Lisados celulares : se transfiere a un tubo eppendorf y se centrifuga durante 10 minutos a velocidad de 13500 revoluciones por minuto.

Dilución 1/1 en tampón con 5% de 2-Mercaptoetanol y “laemmli-buffer” y se mantienen en hielo.

Termociclador a 100°C durante 10 minutos.

Electroforesis

Tampón de electroforesis: 300 ml de 1xSDS (tampón para la electroforesis): 30 ml de 10x SDS running buffer con 270 ml de agua destilada.

Gel de poliacrilamida (15%) (Laboratorios Bio-Rad) en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

Marcador de peso molecular: 10 microlitros de Kaleidoscope 99077 (Laboratorios BioRad).

30 microlitros de las muestras de cada línea celular en los pocillos.

Con el tampón de electroforesis se rellena la cubeta y se establece una diferencia de potencial de 140 Voltios durante 90 minutos.

Transferencia

Equilibrado 20 minutos del gel en una pequeña cubeta con tampón de transferencia.

Se recorta la membrana de polivinilo a la medida del gel e introducimos dicha membrana en otra pequeña cubeta con ME-OH (Hidroxido de metanol) durante 15 segundos. Posteriormente la introducimos en una segunda cubeta con el tampón de transferencia para equilibrarla durante 2 minutos.

Diferencia de potencial de 100V durante una hora.

Posteriormente se sumerge en Me-OH durante 10 segundos y se deja secar 15 minutos.

Marcaje con anticuerpos

Bloqueo de la membrana con 50 ml de PBS, solución Tween 20 0.05% (PBS/Tween) y con un 2% de leche desnatada en polvo. Se deja en un recipiente durante toda la noche a 4°C.

Lavado de membrana con PBS/Tween durante 5 minutos en el agitador.

Marcaje con anticuerpo 1° de Ratón monoclonal (Santa Cruz. USA) y el anticuerpo 2° es de cabra antiratón (Santa Cruz. USA). Se diluye en 10 ml de PBS/Tween y un 2% de leche desnatada en polvo en un tubo cerrado de 50ml y se incuba durante 1 hora con agitación constante.

Tras la incubación 3 lavados con PBS/Tween durante 10 minutos cada uno.

Adición del 2° anticuerpo se realiza de la misma forma que para el primero .

Detección y digitalización

2 ml de reactivo oxidante y 2 ml de reactivo luminol

Envoltura de la membrana en papel plástico y en una placa fotográfica en contacto con papel radiográfico con sobreimpresión durante 2 minutos.

Las imágenes obtenidas en papel radiográfico se digitalizaron y analizaron mediante un equipo de densitometría digital (Labworks 302 Analysis Software).

La banda detectada se corresponde con un peso molecular de 67 a 71kda.

Determinación de expresión de PTP-1B

Muestras

Líneas celulares en cultivo SLR20, SLR21, SLR22, SLR24, SLR25 y HK.

Lisados celulares : se transfiere a un tubo eppendorf y se centrifuga durante 10 minutos a velocidad de 13500 revoluciones por minuto.

Dilución 1/1 en tampón con 5% de 2-Mercaptoetanol y “laemmli-buffer” y se mantienen en hielo.

Termociclador a 100°C durante 10 minutos.

Electroforesis

Tampón de electroforesis: 300 ml de 1xSDS (tampón para la electroforesis): 30 ml de 10x SDS running buffer con 270 ml de agua destilada.

Gel de poliacrilamida (15%) (Laboratorios Bio-Rad) en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

Marcador de peso molecular: 10 microlitros de Kaleidoscope 99077 (Laboratorios BioRad).

30 microlitros de las muestras de cada línea celular en los pocillos.

Con el tampón de electroforesis se rellena la cubeta y se establece una diferencia de potencial de 140 Voltios durante 90 minutos.

Transferencia

Equilibrado 20 minutos del gel en una pequeña cubeta con tampón de transferencia.

Se recorta la membrana de polivinilo a la medida del gel e introducimos dicha membrana en otra pequeña cubeta con ME-OH (Hidroxido de metanol) durante 15 segundos. Posteriormente la introducimos en una segunda cubeta con el tampón de transferencia para equilibrarla durante 2 minutos.

Diferencia de potencial de 100V durante una hora.

Posteriormente se sumerge en Me-OH durante 10 segundos y se deja secar 15 minutos.

Marcaje con anticuerpos

Bloqueo de la membrana con 50 ml de PBS, solución Tween 20 0.05% (PBS/Tween) y con un 2% de leche desnatada en polvo. Se deja en un recipiente durante toda la noche a 4°C.

Lavado de membrana con PBS/Tween durante 5 minutos en el agitador.

Marcaje con anticuerpo 1° de Conejo policlonal (Santa Cruz. USA) y el anticuerpo 2° es de cabra anticonejo (Santa Cruz. USA). Se diluye en 10 ml de PBS/Tween y un 2% de leche desnatada en polvo en un tubo cerrado de 50ml y se incuba durante 1 hora con agitación constante.

Tras la incubación 3 lavados con PBS/Tween durante 10 minutos cada uno.

Adición del 2° anticuerpo se realiza de la misma forma que para el primero .

Detección y digitalización

2 ml de reactivo oxidante y 2 ml de reactivo luminol

Envoltura de la membrana en papel plástico y en una placa fotográfica en contacto con papel radiográfico con sobreimpresión durante 2 minutos.

Las imágenes obtenidas en papel radiográfico se digitalizaron y analizaron mediante un equipo de densitometría digital (Labworks 302 Analysis Software).

La banda detectada se corresponde con un peso molecular de 50 kda.

Determinación de expresión de LMW-PTP

Muestras

Líneas celulares en cultivo SLR20, SLR21, SLR22, SLR24, SLR25 y HK.

Lisados celulares : se transfiere a un tubo eppendorf y se centrifuga durante 10 minutos a velocidad de 13500 revoluciones por minuto.

Dilución 1/1 en tampón con 5% de 2-Mercaptoetanol y “laemmli-buffer” y se mantienen en hielo.

Termociclador a 100°C durante 10 minutos.

Electroforesis

Tampón de electroforesis: 300 ml de 1xSDS (tampón para la electroforesis): 30 ml de 10x SDS running buffer con 270 ml de agua destilada.

Gel de poliacrilamida (15%) (Laboratorios Bio-Rad) en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

Marcador de peso molecular: 10 microlitros de Kaleidoscope 99077 (Laboratorios BioRad).

30 microlitros de las muestras de cada línea celular en los pocillos.

Con el tampón de electroforesis se rellena la cubeta y se establece una diferencia de potencial de 140 Voltios durante 90 minutos.

Transferencia

Equilibrado 20 minutos del gel en una pequeña cubeta con tampón de transferencia.

Se recorta la membrana de polivinilo a la medida del gel e introducimos dicha membrana en otra pequeña cubeta con ME-OH (Hidroxido de metanol) durante 15 segundos. Posteriormente la introducimos en una segunda cubeta con el tampón de transferencia para equilibrarla durante 2 minutos.

Diferencia de potencial de 100V durante una hora.

Posteriormente se sumerge en Me-OH durante 10 segundos y se deja secar 15 minutos.

Marcaje con anticuerpos

Bloqueo de la membrana con 50 ml de PBS, solución Tween 20 0.05% (PBS/Tween) y con un 2% de leche desnatada en polvo. Se deja en un recipiente durante toda la noche a 4°C.

Lavado de membrana con PBS/Tween durante 5 minutos en el agitador.

Marcaje con anticuerpo 1° de Oveja policlonal (Santa Cruz. USA) y el anticuerpo 2° es de conejo antioveja (Santa Cruz. USA). Se diluye en 10 ml de PBS/Tween y un 2% de leche desnatada en polvo en un tubo cerrado de 50ml y se incuba durante 1 hora con agitación constante.

Tras la incubación 3 lavados con PBS/Tween durante 10 minutos cada uno.

Adición del 2° anticuerpo se realiza de la misma forma que para el primero .

Detección y digitalización

2 ml de reactivo oxidante y 2 ml de reactivo luminol

Envoltura de la membrana en papel plástico y en una placa fotográfica en contacto con papel radiográfico con sobreimpresión durante 2 minutos.

Las imágenes obtenidas en papel radiográfico se digitalizaron y analizaron mediante un equipo de densitometría digital (Labworks 302 Analysis Software).

La banda detectada se corresponde con un peso molecular de 18 kda.

REGISTRO DE EXPERIMENTOS

Todos los experimentos fueron registrados en un libro de experimentos donde se anotaron los protocolos de realización de cada uno de ellos, para asegurar que las condiciones de realización fueran las idóneas.

En gran cantidad de casos, sobre todo al inicio, hubieron de desecharse experimentos por los problemas técnicos en cuanto a mala definición de las bandas, falta de especificidad de los anticuerpos. Incluso en el proyecto original se incluyó el estudio de PDGFR 1 y 2 y de TIE 1 y 2 que por la falta de especificidad de los anticuerpos no pudieron obtenerse resultados fiables.

El registro de densitometrías fue también informático y quedaron las imágenes digitalizadas registradas para poder comparar con otros experimentos.

Dentro del libro de experimentos se almacenaron las “radiografías” realizadas (las bandas sobreimpresionadas).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se trata de un estudio descriptivo. Se aplica una diferencia de valores de las diferentes variables que aparecen expresadas como ratios de expresión resultantes de la comparación de expresión de la proteína problema con la expresión de beta actina y posteriormente comparándolo con el valor de expresión del tejido normal (HK).

La expresión, como ya hemos visto se calcula en base a densidad óptica calculada por un densitómetro digital.

Se realiza comparación de niveles de expresión de receptores de tirosina kinasa de forma global y de fosfatasa de la proteína tirosina de forma global entre las distintas

líneas celulares utilizando T de Student para datos apareados. También se realiza comparación para la expresión de cada una de las proteínas comparada con la expresión del tejido normal.

Utilizamos la aplicación informática SPSS versión 14.0. N° de serie 9859953.

RESULTADOS

Se realiza el análisis de expresión de proteínas mediante la técnica de Western-Blot, tal como se ha explicado en material y métodos. Recordamos que la manera de cuantificar la expresión de la proteína estudiada es analizar la densidad de las bandas mediante un densitómetro óptico que asigna un valor de expresión en función de la densidad de la banda.

Las imágenes obtenidas de cada Western-Blot se digitalizaron y analizaron mediante un equipo de densitometría digital (Labworks 302 Analysis Software).

Describimos en forma de tablas los valores de expresión detectados, el sistema informático es el que realiza las comparaciones y asigna los valores.

Para cada receptor de tirosina kinasa se realiza una tabla con valores de expresión específicos y los de expresión de beta actina detectados en paralelo en cada experimento de Western-Blot. Se realiza el cociente entre la expresión de receptores y la de la beta-actina que se utiliza como valor de referencia para cada experimento individual para evitar variaciones interexperimento. El análisis comparativo se realiza entre los distintos cocientes. Las condiciones para cada experimento fueron idénticas por lo que los resultados pueden compararse entre sí gracias a la beta actina que sirve como control interno. Los valores no se expresan en unidades determinadas porque el sistema informático los expresa en forma de ratios de expresión.

Tras describir los resultados de los receptores de tirosina kinasa se describen las tres tablas descriptivas de la expresión de las fosfatasas de la proteína tirosina estudiadas.

Se realizan gráficos descriptivos de expresión en los que ya pueden analizarse a simple vista las diferencias de expresión entre las cinco líneas celulares de carcinoma de células renales y la expresión de la línea celular HK, que ya hemos comentado que tiene un fenotipo prácticamente superponible al del tejido renal normal.

EXPRESION DE RECEPTORES DE TIROSINA KINASA

EXPRESIÓN DE EGFR

EGFR	SLR 20	SLR 21	SLR 22	SLR 24	SLR 25	HK
RATIO DENSIDAD	1	0.95	0.53	2.3	2	0.029
B ACTINA	SLR 20	SLR 21	SLR 22	SLR 24	SLR 25	HK
RATIO DENSIDAD	1	1.1	1.4	1.4	1.3	1.3

	SLR 20	SLR 21	SLR 22	SLR 24	SLR 25	HK
EGFR / B-ACTINA	1	0.8636	0.3785	1.6428	1.5384	0.0223

Tabla 1. Expresión de EGFR.

Mostramos el resultado de Western-Blot tal como lo detecta el densitómetro a partir del papel radiográfico y una vez digitalizada la imagen.

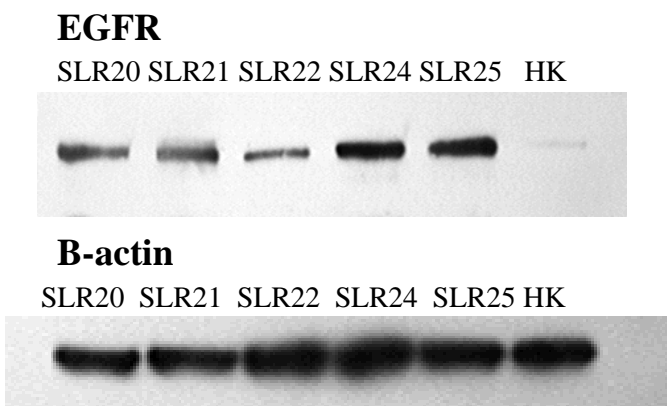


Figura 1. Western- Blot de EGFR.

Un primer análisis de estos resultados muestra mayor expresión de todas las líneas celulares en comparación con la línea HK. Veámos el gráfico comparativo.

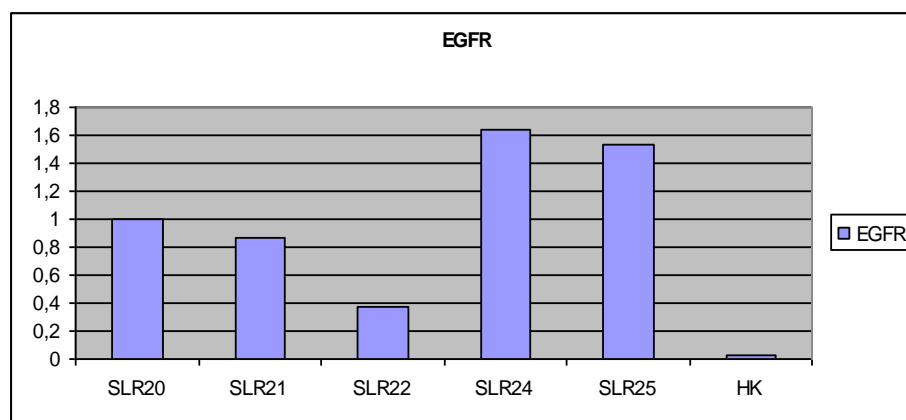


Gráfico 1. Expresión de EGFR en las distintas líneas celulares. En el eje de ordenadas se expresan los ratios de expresión.

EXPRESIÓN DE HER-2

HER2	SLR 20	SLR 21	SLR 22	SLR 24	SLR 25	HK
RATIO DENSIDAD	1	1.5	1.1	0.95	0.39	0.36
B ACTINA	SLR 20	SLR 21	SLR 22	SLR 24	SLR 25	HK
RATIO DENSIDAD	1	0.66	0.63	0.47	0.55	0.56
	SLR 20	SLR 21	SLR 22	SLR 24	SLR 25	HK
HER-2 / B-ACTINA	1	2.2727	1.7460	2.0212	0.7090	0.6428

Tabla 2. Expresión de HER-2.

En este caso la menor diferencia de expresión existe en SLR25, que es muy similar a la de la línea celular HK, pero vemos que hay mayor expresión en las 4 primeras líneas celulares.

Por tanto, en una primera aproximación podemos concluir que la expresión de EGFR y de HER-2 es mayor en las líneas celulares de carcinoma de células renales que en el tejido normal.

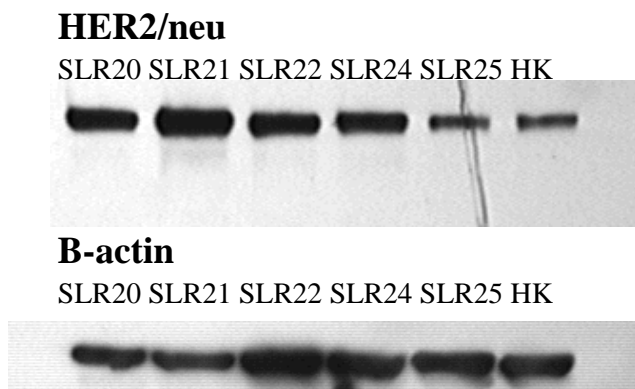


Figura 2. Western-Blot de HER-2

En el gráfico 2 podemos ver comparativamente la expresión destacando SLR 21, SLR 22 y SLR 24.

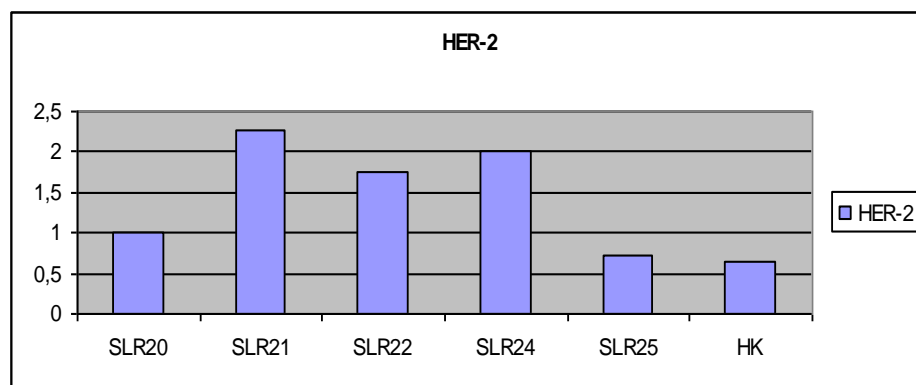


Gráfico 2. Expresión de HER-2 en las distintas líneas celulares.

En ambos experimentos no se produjeron problemas técnicos pudiéndose detectar claramente las bandas de expresión y se pudo realizar el análisis densitométrico sin apenas interferencias en la detección. Ayudó a ello la alta especificidad de los anticuerpos utilizados.

Podemos apreciar la mayor sobreexpresión de los dos tipos de receptores del factor epidérmico de crecimiento en comparación con el tejido renal normal.

Posteriormente veremos la comparación de expresión realizando el cociente con la expresión del tejido normal, que es tomada como referencia, por lo que podemos cuantificar de forma objetiva, evitando las variaciones interexperimento.

De esta forma podemos decir que la expresión de la proteína problema es “x” veces la expresión del tejido normal.

EXPRESIÓN DE VEGFR-1

VEGFR-1	SLR 20	SLR 21	SLR 22	SLR 24	SLR 25	HK
RATIO DENSIDAD	1	0.87	1.3	0.48	0.61	0.68
B ACTINA	SLR 20	SLR 21	SLR 22	SLR 24	SLR 25	HK
RATIO DENSIDAD	1	1.4	1.6	2	1.6	1.3

	SLR 20	SLR 21	SLR 22	SLR 24	SLR 25	HK
VEGFR-1 / B-ACTINA	1	0.6214	0.8125	0.24	0.3812	0.5230

Tabla 3. Expresión de VEGFR-1.

VEGFR-1

SLR20 SLR21 SLR22 SLR24 SLR25 HK



B-actin

SLR20 SLR21 SLR22 SLR24 SLR25 HK

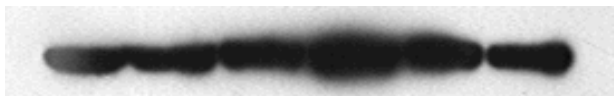


Gráfico 3. Western-Blot de VEGFR-1.

En este análisis resulta más difícil cuantificar la diferencia de expresión, como puede verse en el gráfico, incluso en algunas líneas celulares la expresión es menor que en el tejido normal.

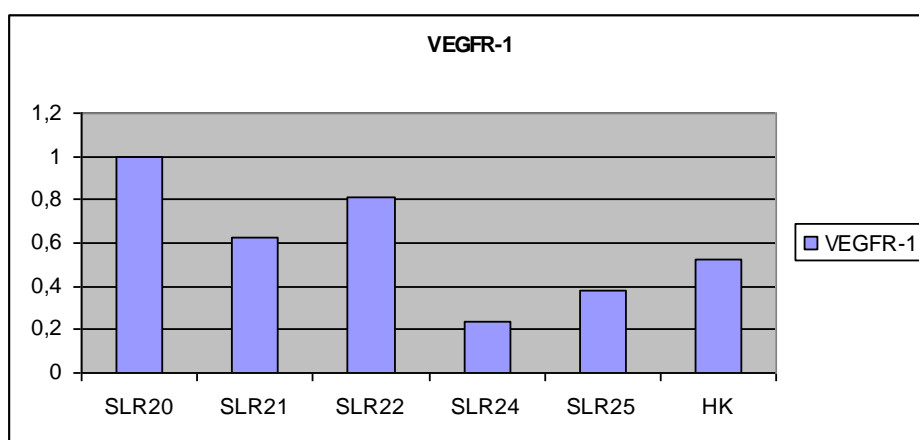


Gráfico 3. Expresión de VEGFR-1 en las distintas líneas celulares.

SLR 20 y SLR 22 son las 2 líneas que presentan mayor expresión de VEGFR-1, SLR 24 y SLR 25 presentan menor expresión que el tejido normal.

EXPRESIÓN DE VEGFR-2

VEGFR-2	SLR 20	SLR 21	SLR 22	SLR 24	SLR 25	HK
RATIO DENSIDAD	1	2.1	0.42	0.46	0.34	0.2
B ACTINA	SLR 20	SLR 21	SLR 22	SLR 24	SLR 25	HK
RATIO DENSIDAD	1	0.94	1.3	1.4	1.6	1.5
	SLR 20	SLR 21	SLR 22	SLR 24	SLR 25	HK
VEGFR-2 / B-ACTINA	1	2.2340	0.3230	0.3285	0.2125	0.133

Tabla 4. Expresión de VEGFR-2.

En este caso podemos apreciar claramente la importancia que tiene en este trabajo la comparación de los valores de expresión con los de beta actina, ya que aquí la expresión de VEGFR-2 es muy baja en tejido normal y podrían resultar exageradas las diferencias de expresión. Al ser los valores de expresión de beta actina más homogéneos pueden cuantificarse con mayor validez las diferencias de expresión.

VEGFR-2

SLR20 SLR21 SLR22 SLR24 SLR25 HK



B-actin

SLR20 SLR21 SLR22 SLR24 SLR25 HK

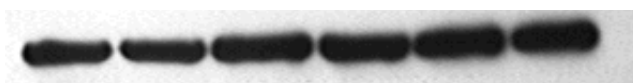


Gráfico 4. Western-Blot de VEGFR-2.

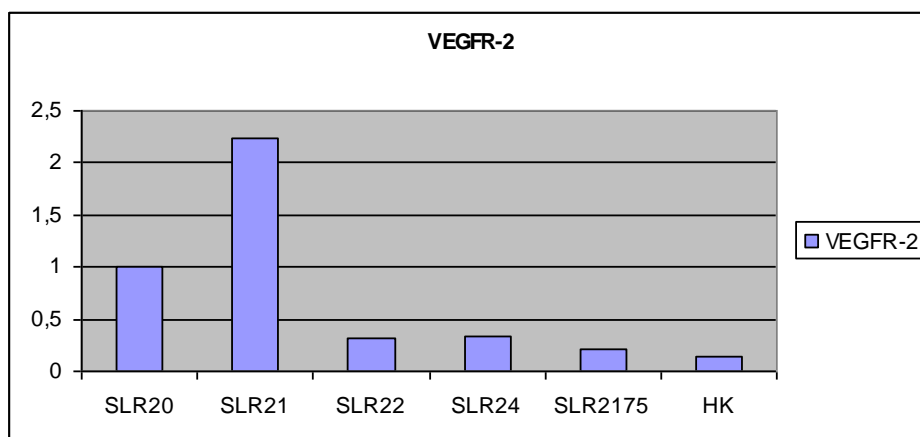


Gráfico 4. Expresión de VEGFR-2 en las distintas líneas celulares.

VEGFR-2 presenta claramente mayor expresión en las líneas celulares SLR20 y SLR21 que en tejido normal como puede apreciarse en el gráfico 4.

EXPRESIÓN DE MET (HGFR)

MET	SLR 20	SLR 21	SLR 22	SLR 24	SLR 25	HK
RATIO DENSIDAD	1	2.3	1.4	2.1	1.2	0.4
B ACTINA	SLR 20	SLR 21	SLR 22	SLR 24	SLR 25	HK
RATIO DENSIDAD	1	0.9	0.87	0.73	0.76	0.8

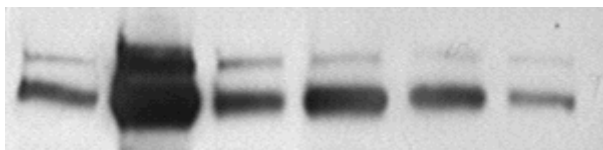
	SLR 20	SLR 21	SLR 22	SLR 24	SLR 25	HK
MET / B-ACTINA	1	2.5555	1.6091	2.8767	1.5789	0.5

Tabla 5. Expresión de MET.

La expresión de Met es mayor en todas las líneas celulares patológicas que en el tejido normal.

Met

SLR20 SLR21 SLR22 SLR24 SLR25 HK



B-actin

SLR20 SLR21 SLR22 SLR24 SLR25 HK

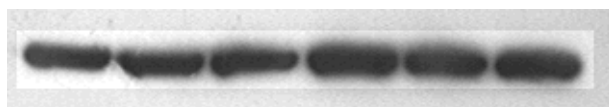


Figura 5. Western-Blot de MET.

En este Western Blot podemos apreciar una doble banda de positividad para la proteína Met que puede ser debida a la policlonalidad del anticuerpo. El densitómetro toma como válida la banda de mayor expresión, que además coincide con el peso molecular de la proteína que buscamos.

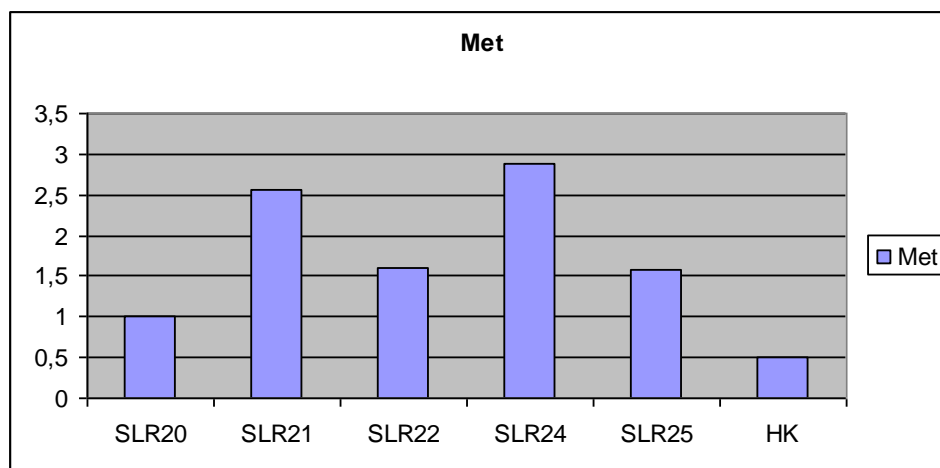


Gráfico 5. Expresión de Met en las distintas líneas celulares.

Met presenta una mayor expresión en las líneas celulares que en el tejido normal.

EXPRESIÓN DE AXL

AXL	SLR 20	SLR 21	SLR 22	SLR 24	SLR 25	HK
RATIO DENSIDAD	1	0.32	0.2	0.38	0.18	0.24
B ACTINA	SLR 20	SLR 21	SLR 22	SLR 24	SLR 25	HK
RATIO DENSIDAD	1	0.76	1.2	0.84	0.94	1.4
	SLR 20	SLR 21	SLR 22	SLR 24	SLR 25	HK
AXL / B-ACTINA	1	0.4210	0.1666	0.4523	0.1914	0.1714

Tabla 6. Expresión de Axl.

En este caso vemos que la expresión de SLR 20, SLR 21 y SLR 24 es mayor que la expresión del tejido renal normal.

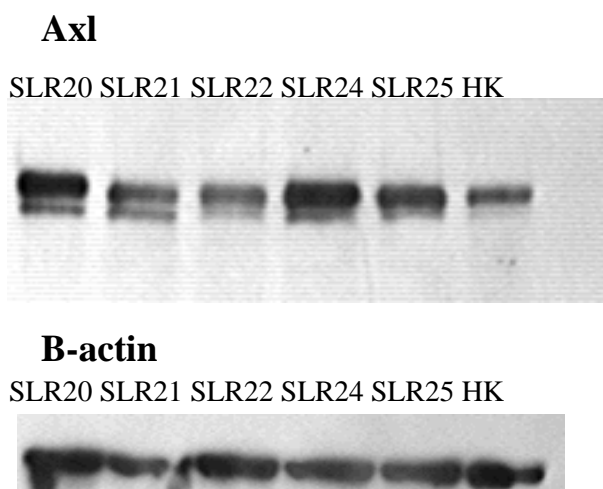


Figura 6. Western-Blot de AXL.

También en este experimento ocurre como en el anterior, que se aprecia una doble banda de positividad aunque la más inferior de mucha menor intensidad. Este fenómeno se atribuye a la policlonalidad del anticuerpo, no siendo absolutamente específico de la proteína problema.

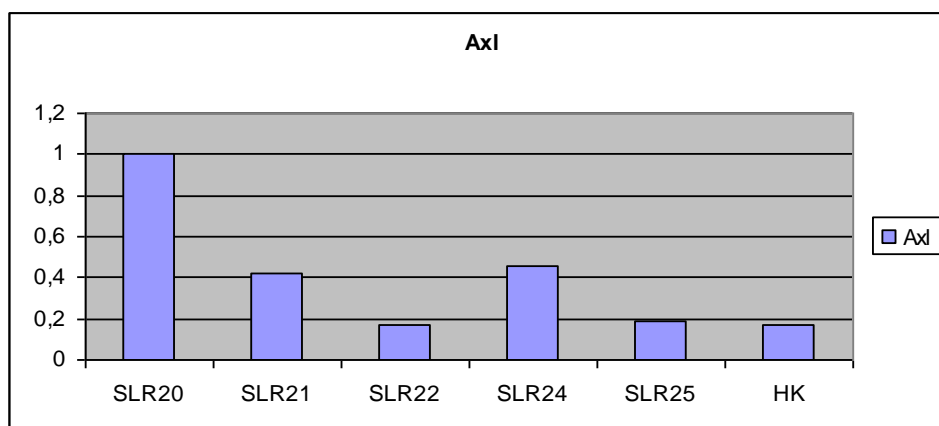


Gráfico 6. Expresión de Axl en las distintas líneas celulares.

EXPRESIÓN DE RON-BETA.

RON BETA	SLR 20	SLR 21	SLR 22	SLR 24	SLR 25	HK
RATIO DENSIDAD	1	5.7	0.082	0.6	0.45	0.17
B ACTINA	SLR 20	SLR 21	SLR 22	SLR 24	SLR 25	HK
RATIO DENSIDAD	1	1.1	1.4	1.2	1.3	1.3
	SLR 20	SLR 21	SLR 22	SLR 24	SLR 25	HK
RON BETA / B-ACTINA	1	5.1818	0.0585	0.5	0.3461	0.1307

Tabla 7. Expresión de Ron beta.

SLR 20, SLR 21 con diferencia y SLR 24 y SLR 25 presentan mayor expresión de la proteína Ron-beta que el tejido renal normal. Especialmente SLR20 y SLR 21.

Ron beta

SLR20 SLR21 SLR22 SLR24 SLR25 HK



B-actin

SLR20 SLR21 SLR22 SLR24 SLR25 HK



Figura 7. Western-Blot de Ron-beta..

Se aprecia de forma muy evidente la intensidad de luminescencia de la banda correspondiente a SLR 21.

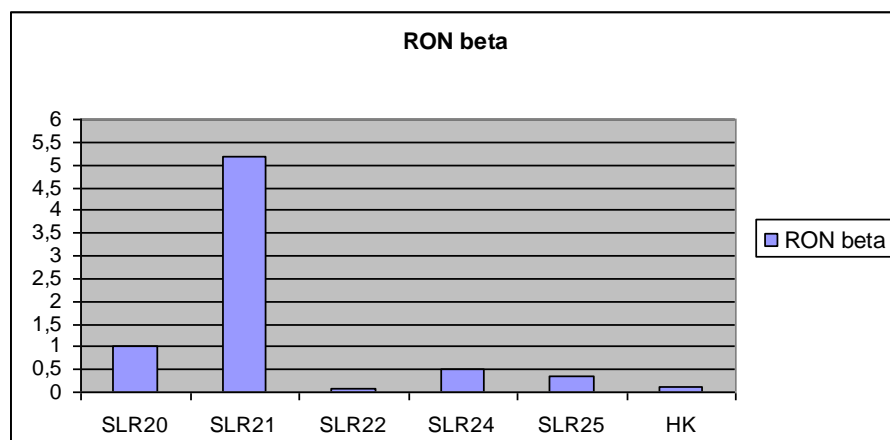


Gráfico 7. Expresión de Ron-beta en las distintas líneas celulares.

EXPRESIÓN DE FOSFATASAS DE LA PROTEÍNA TIROSINA

EXPRESIÓN DE PTP-1B

PTP-1B	SLR 20	SLR 21	SLR 22	SLR 24	SLR 25	HK
RATIO DENSIDAD	1	5.2	1.5	1.7	1.3	0.66
B ACTINA	SLR 20	SLR 21	SLR 22	SLR 24	SLR 25	HK
RATIO DENSIDAD	1	1	1.5	1.4	1.2	1

	SLR 20	SLR 21	SLR 22	SLR 24	SLR 25	HK
PTP-1B / B-ACTINA	1	5.2	1	1.2142	1.0833	0.66

Tabla 8. Expresión de PTP-1B.

Estos resultados son muy interesantes debido a la ausencia de estudios de este tipo, por lo que pueden servir como referencia para futuros estudios.

Observamos que la expresión de PTP-1B es mayor en todas las líneas celulares patológicas que en el tejido renal normal.

PTP-1b

SLR20 SLR21 SLR22 SLR24 SLR25 HK



B-actin

SLR20 SLR21 SLR22 SLR24 SLR25 HK

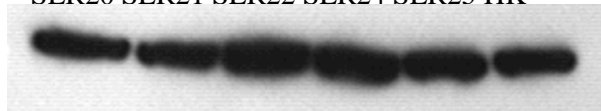


Figura 8. Western-Blot de PTP-1B

Ocurre el mismo fenómeno de duplicidad de la banda de Western-Blot debido a la policlonalidad del anticuerpo.

Destaca la expresión de PTP-1b en la línea SLR 21, como puede verse claramente en el gráfico 8.

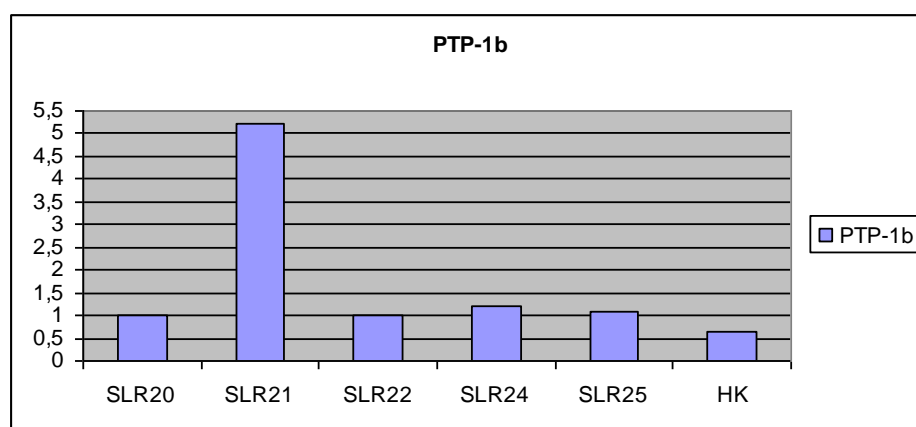


Gráfico 8. Expresión de PTP-1B en las distintas líneas celulares.

EXPRESIÓN DE SH-PTP

SH-PTP	SLR 20	SLR 21	SLR 22	SLR 24	SLR 25	HK
RATIO DENSIDAD	1	0.74	0.54	0.13	0.065	0.1
B ACTINA	SLR 20	SLR 21	SLR 22	SLR 24	SLR 25	HK
RATIO DENSIDAD	1	1.1	1.3	1.2	1.1	0.53

	SLR 20	SLR 21	SLR 22	SLR 24	SLR 25	HK
SH-PTP / B-ACTINA	1	0.6727	0.4153	0.1083	0.059	0.1886

Tabla 9. Expresión de SH-PTP.

SLR 20, SLR 21 y SLR 22 superan en nivel de expresión de fosfatasa SH.PTP al tejido renal normal.

SH-PTP

SLR20 SLR21 SLR22 SLR24 SLR25 HK



B-actin

SLR20 SLR21 SLR22 SLR24 SLR25 HK



Figura 9. Western-Blot de SH-PTP-1.

Se aprecia la mayor expresión en las 3 primeras líneas celulares.

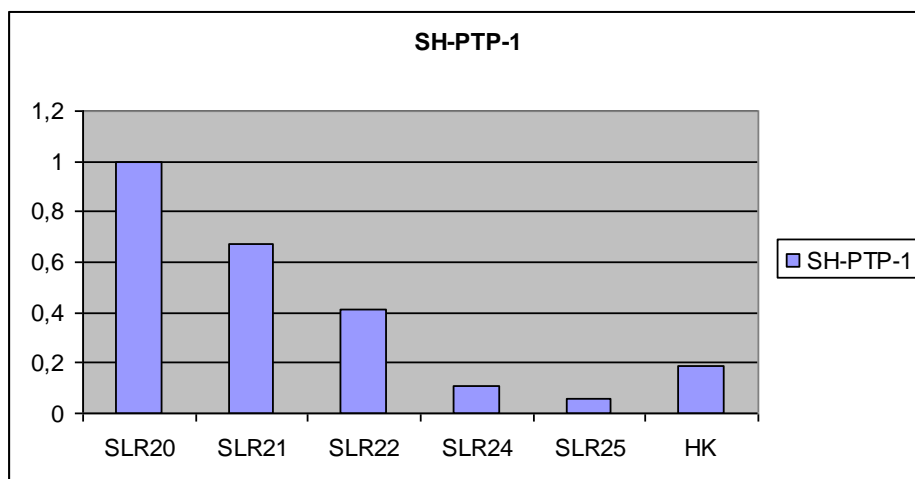


Gráfico 9. Expresión de SH-PTP-1 en las distintas líneas celulares.

EXPRESIÓN DE LMW-PTP

LMW-PTP	SLR 20	SLR 21	SLR 22	SLR 24	SLR 25	HK
RATIO DENSIDAD	1	2.2	1.9	2.3	1.5	0.9
B ACTINA	SLR 20	SLR 21	SLR 22	SLR 24	SLR 25	HK
RATIO DENSIDAD	1	0.85	1.1	0.98	1	1

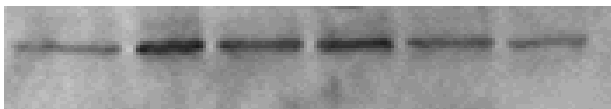
	SLR 20	SLR 21	SLR 22	SLR 24	SLR 25	HK
LMW-PTP / B-ACTINA	1	2.5882	1.7272	2.3469	1.5	0.9

Tabla 10. Expresión de LMW-PTP.

La expresión es mayor en las líneas SLR 21, SLR 22, SLR 24 y SLR 25, especialmente en SLR 21 y SLR 24.

LMW-PTP

SLR20 SLR21 SLR22 SLR24 SLR25 HK



B-actin

SLR20 SLR21 SLR22 SLR24 SLR25 HK



Figura 10. Western.blot de LMW-PTP.

Puede apreciarse en el gráfico 10 que salvo la línea SLR 20 todas presentan mayor expresión de LMW-PTP.

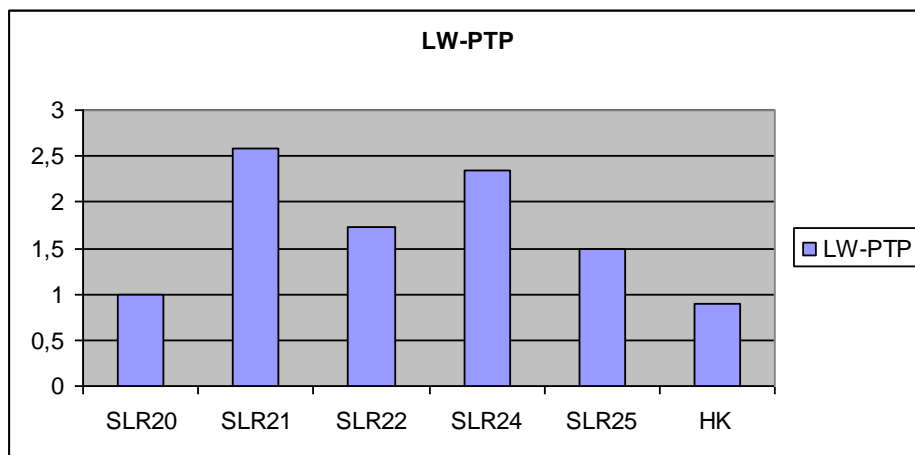


Gráfico 10. Expresión de LMW-PTP en las distintas líneas celulares.

ANÁLISIS COMPARATIVO

EXPRESIÓN CARCINOMA CELULAS RENALES / B-ACTINA

	SLR20	SLR21	SLR22	SLR24	SLR25	HK
EGFR	1	0,863636	0,378571	1,642857	1,538462	0,022308
HER-2	1	2,272727	1,746032	2,021277	0,709091	0,642857
VEGFR-1	1	0,621429	0,8125	0,24	0,38125	0,523077
VEGFR-2	1	2,234043	0,323077	0,328571	0,2125	0,133333
Met	1	2,555556	1,609195	2,876712	1,578947	0,5
Axl	1	0,421053	0,166667	0,452381	0,191489	0,171429
RON beta	1	5,181818	0,058571	0,5	0,346154	0,130769
PTP-1b	1	5,2	1	1,214286	1,083333	0,66
SH-PTP-1	1	0,672727	0,415385	0,108333	0,059091	0,188679
LW-PTP	1	2,588235	1,727273	2,346939	1,5	0,9

Tabla 11. Comparativa de expresión tal como la calcula el densitómetro digital.

EXPRESIÓN RATIO (RCC / B-ACTINA) / TEJIDO NORMAL

	SLR20	SLR21	SLR22	SLR24	SLR25	HK
EGFR	44,82759	38,71473	16,97044	73,64532	68,96552	1
HER-2	1,555556	3,535354	2,716049	3,144208	1,10303	1
VEGFR-1	1,911765	1,188025	1,553309	0,458824	0,72886	1
VEGFR-2	7,5	16,75532	2,423077	2,464286	1,59375	1
Met	2	5,111111	3,218391	5,753425	3,157895	1
Axl	5,833333	2,45614	0,972222	2,638889	1,117021	1
RON beta	7,647059	39,62567	0,447899	3,823529	2,647059	1
PTP-1b	1,515152	7,878788	1,515152	1,839827	1,641414	1
SH-PTP-1	5,3	3,565455	2,201538	0,574167	0,313182	1
LW-PTP	1,111111	2,875817	1,919192	2,60771	1,666667	1

Tabla 12. Comparativa de expresión referenciada a la del tejido normal

Comparando los ratios podemos sacar conclusiones evidentes en cuanto a la sobreexpresión de receptores de tirosina kinasa.

En las cinco líneas celulares hay una sobreexpresión de EGFR muy llamativa, con una gran diferencia con respecto al tejido normal. Para poder observar la comparativa en la gráfica utilizaremos un detalle de la gráfica aumentado de tamaño en el que no reflejamos el valor de EGFR que es muy elevado (gráfico 12).

En el caso de HER-2 la sobreexpresión es 1.5 veces mayor al menos en las 4 primeras líneas celulares.

Para VEGFR-1 obtenemos sobreexpresión 1.5 veces mayor en SLR20 y SLR 22, mientras que para VEGFR-2 es 1.5 veces mayor en todas las líneas estudiadas. Por tanto VEGFR-2 está más sobreexpresado que VEGFR-1.

Los estudios con PDGFRalfa y PDGFRbeta fueron imposibles técnicamente de realizar, por la falta de especificidad de los anticuerpos utilizados. Las bandas del Western Blot eran múltiples y no pudieron interpretarse. No podemos concluir en este sentido nada acerca de estos receptores, en cuanto a su expresión en las líneas celulares.

Lo mismo ocurrió con Tie-1 y Tie-2. Es difícil en ocasiones encontrar un anticuerpo de detección adecuado, por lo que tampoco hemos podido sacar conclusiones acerca de la expresión de estos receptores. Tanto para PDGFR como para Tie se modificaron las condiciones del tipo de gel, tiempo de exposición de los anticuerpos marcados con luminescencia, etc, sin conseguir unas bandas que resultaran interpretables.

El receptor Met presenta una sobreexpresión en las 5 líneas celulares estudiadas superior a 1.5 veces la expresión del tejido normal.

La expresión de Axl fue mayor en SLR20, SLR22 y SLR 24, siendo en las 2 líneas celulares restantes muy similar a la del tejido normal.

En el caso de Ron solo SLR22 presentó una expresión incluso menor de la del tejido normal, para el resto de las líneas la expresión fue significativamente mayor.

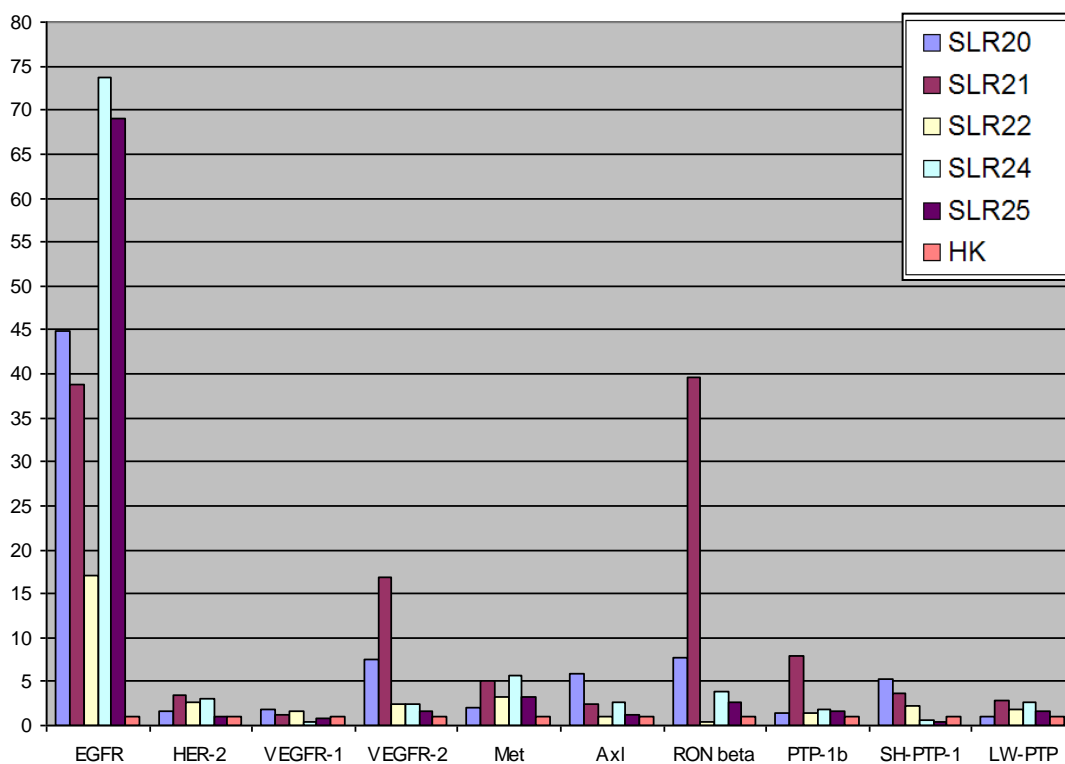


Gráfico 11. Comparativa de expresión en las distintas líneas celulares.

Un hallazgo muy importante es la sobreexpresión de las fosfatasas de la proteína tirosina, que apenas se han estudiado hasta el momento actual. Desde el momento de inicio de la realización de este trabajo han ido apareciendo distintos anticuerpos que permitirán estudiar más subclases de estas proteínas, recientemente identificadas gracias a las técnicas de secuenciación genética.

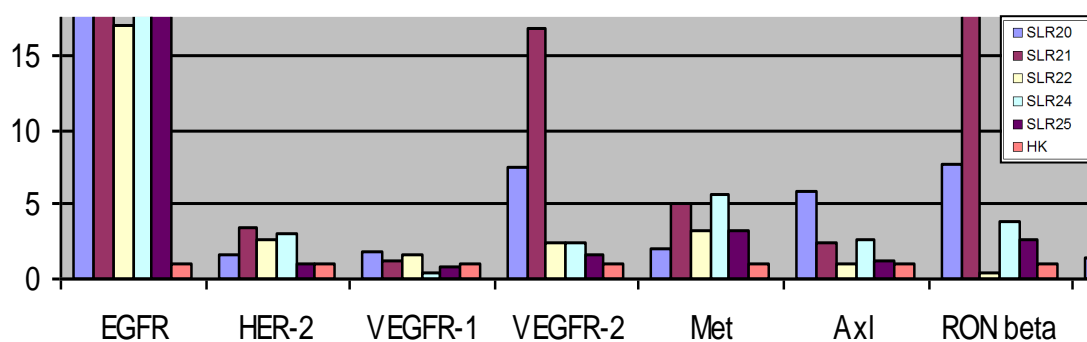


Gráfico 12. Ampliación de gráfico en el que pueden verse con mayor detalle las diferencias de expresión de receptores de tirosina kinasa evitando los valores muy altos.

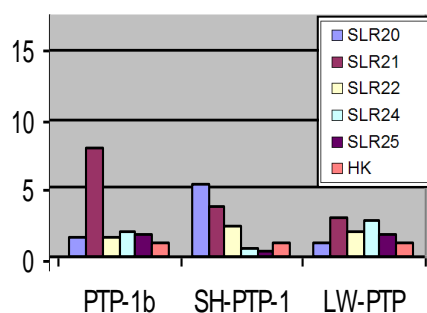


Gráfico 13. Expresión de Fosfatasas de la proteína tirosina en las distintas líneas celulares.

PTP-1b presenta una sobreexpresión significativa en las 5 líneas celulares patológicas.

SH-PTP1 presentó sobreexpresión en SLR20, SLR21 y SLR22, no siendo significativa la expresión (incluso menor que el tejido normal) SLR24 y SLR25.

LMW-PTP presentó una expresión muy similar en SLR20 y tejido normal no existiendo diferencias significativas. Se demostró sobreexpresión para el resto de líneas celulares.

ANÁLISIS DE LINEAS CELULARES

En los distintos gráficos se aprecia la sobreexpresión de las distintas proteínas para cada línea celular por separado. Esta subclasificación tiene mucho interés para buscar correlación entre comportamiento clínico y fenotípico al aplicar el modelo translacional. Hemos citado algunos estudios relevantes en este campo, viendo que la expresión de determinados receptores de tirosina kinasa se relaciona con la mayor agresividad de los tumores o el comportamiento metastático.

En este caso no conocemos bien las características fenotípicas de las líneas celulares, además de la limitación que supone el trabajar con una técnica in vitro. Sí podemos destacar que la velocidad de crecimiento en los cultivos era mayor en SLR20 y SLR21, mientras que era mucho más lenta en SLR 25 . SLR 22 y SLR 24 tienen una velocidad intermedia de crecimiento.

No pretendemos sacar conclusiones en este sentido ya que no disponemos del tamaño muestral adecuado ni las células tumorales pueden comportarse con sus características clínicas específicas debido a que no están en un organismo vivo sino en un medio de cultivo. Nuestra pretensión es demostrar que es posible realizar un mapa de expresiones cuantificadas que permite distinguir unos fenotipos tumorales de otros y que está por demostrar que exista una verdadera correlación entre cada una de dichas expresiones y el comportamiento clínico de los tumores.

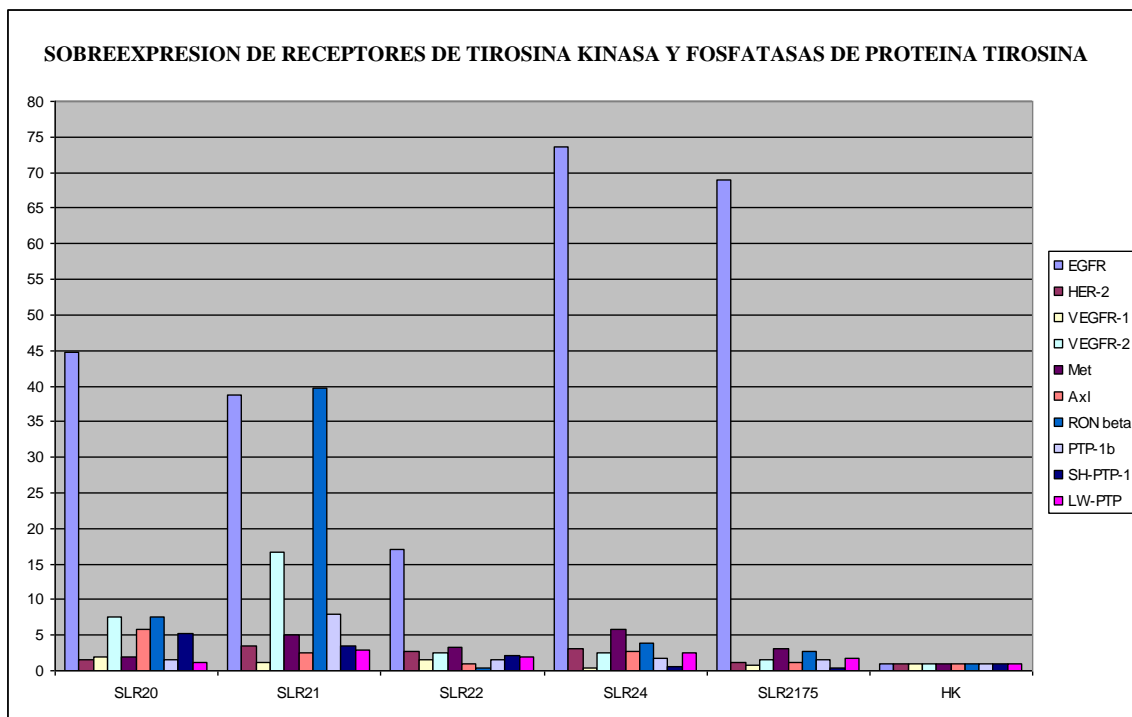


Gráfico 14. Comparativa de líneas celulares.

Para evitar los valores extremos ampliamos la zona inferior de la gráfica:

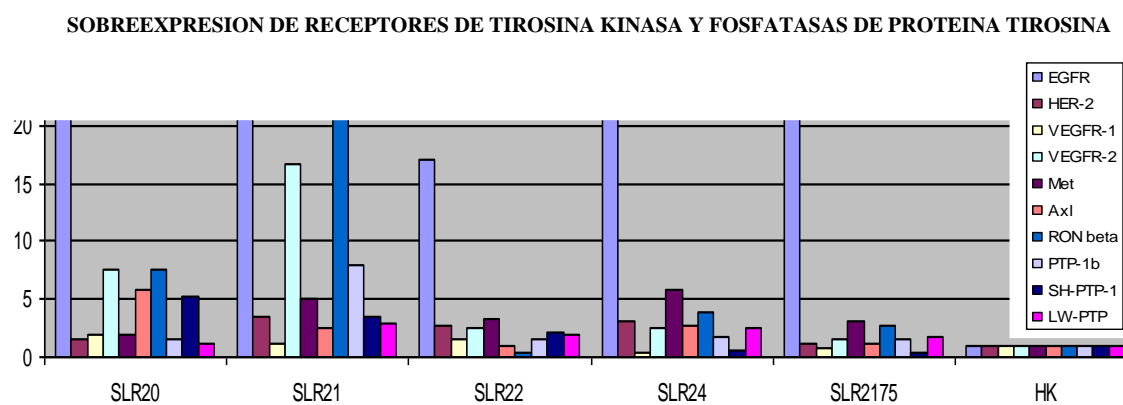


Gráfico 15. Comparativa de líneas celulares ampliada.

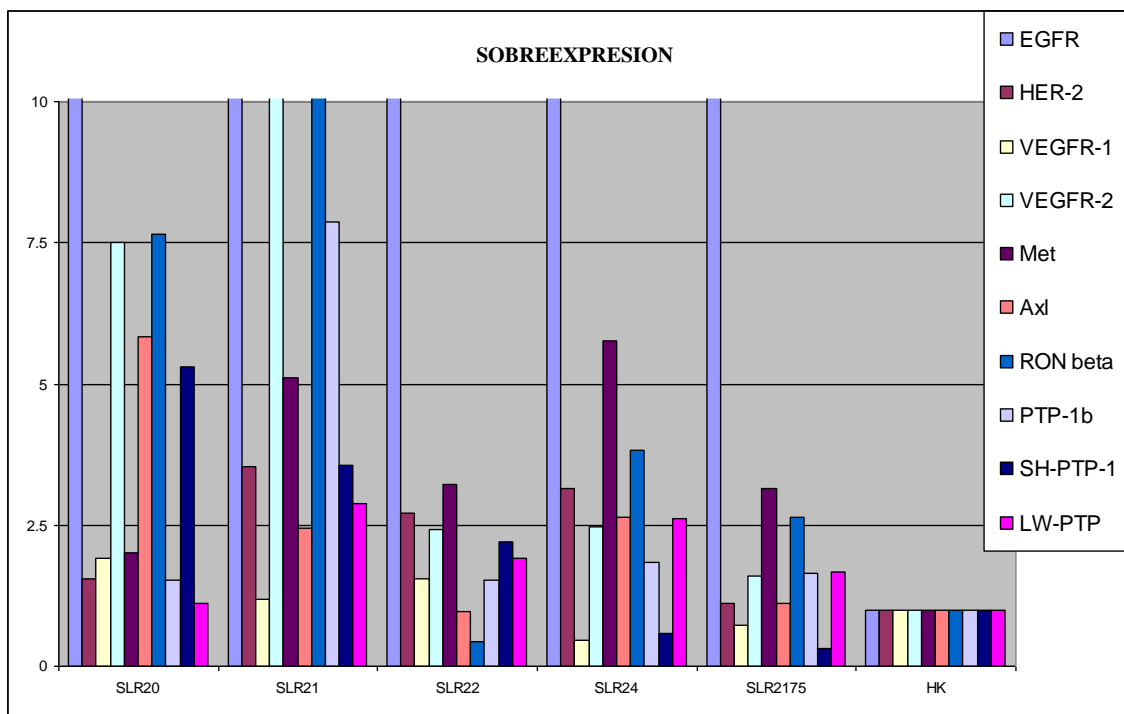


Gráfico 16. Comparativa de líneas celulares a menor escala para apreciar mejor las pequeñas diferencias de expresión.

SLR 20

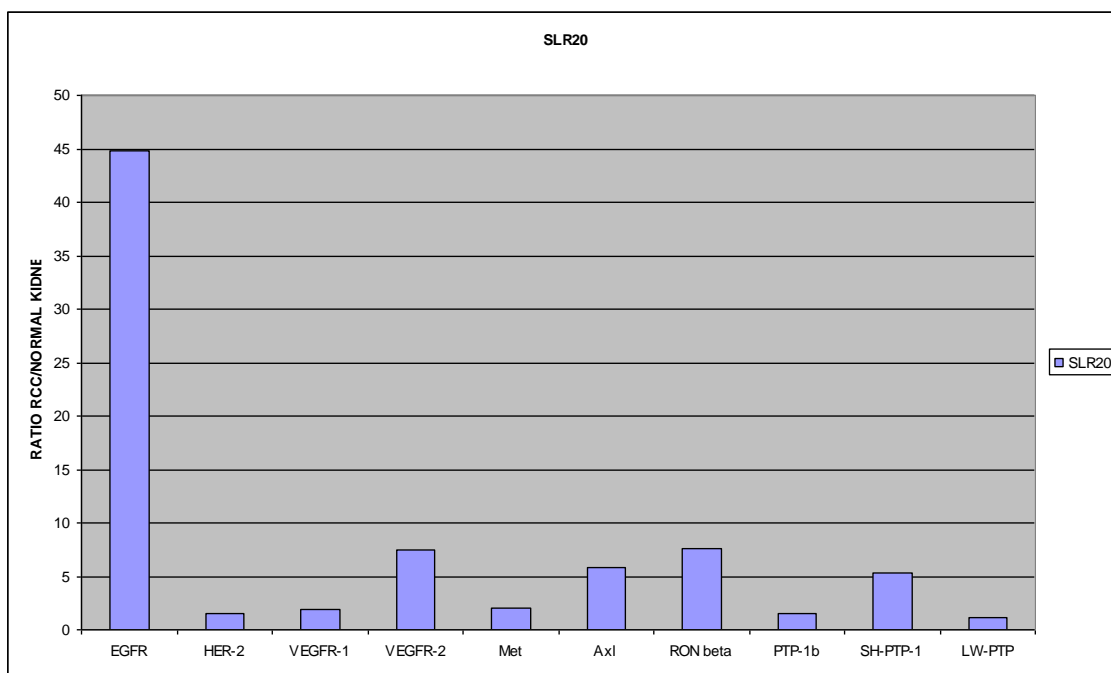


Gráfico 17. Expresión analizada en la línea celular SLR 20.

SLR21

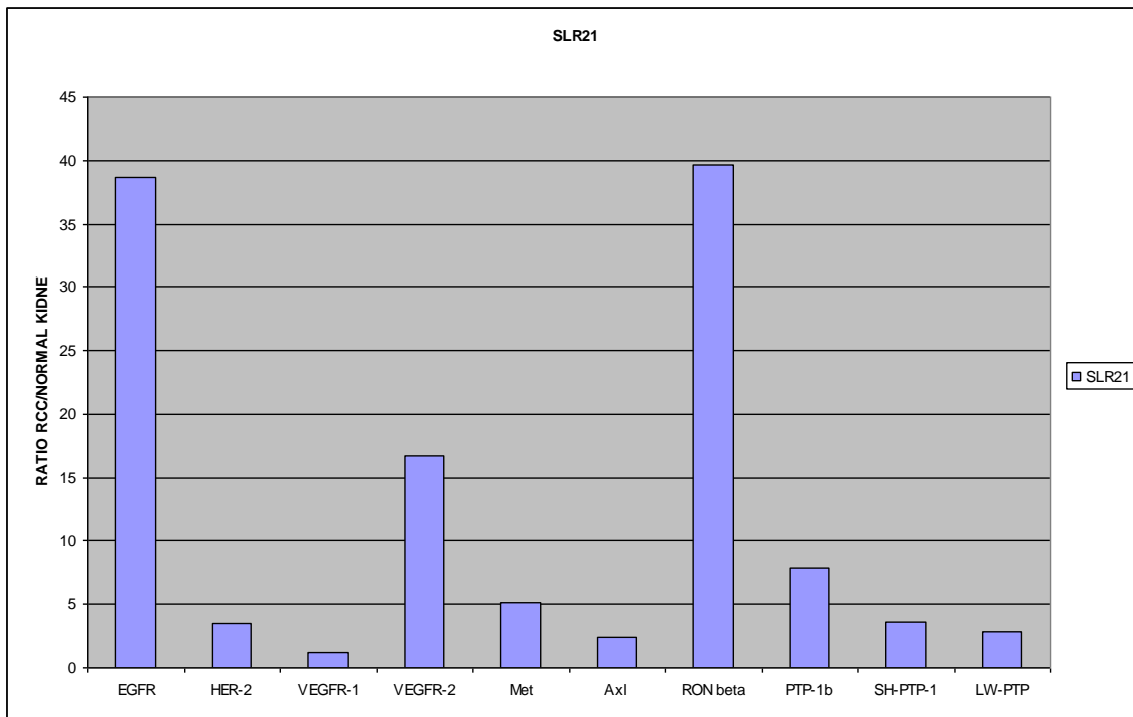


Gráfico 18. Expresión analizada en la línea celular SLR 21.

SLR22

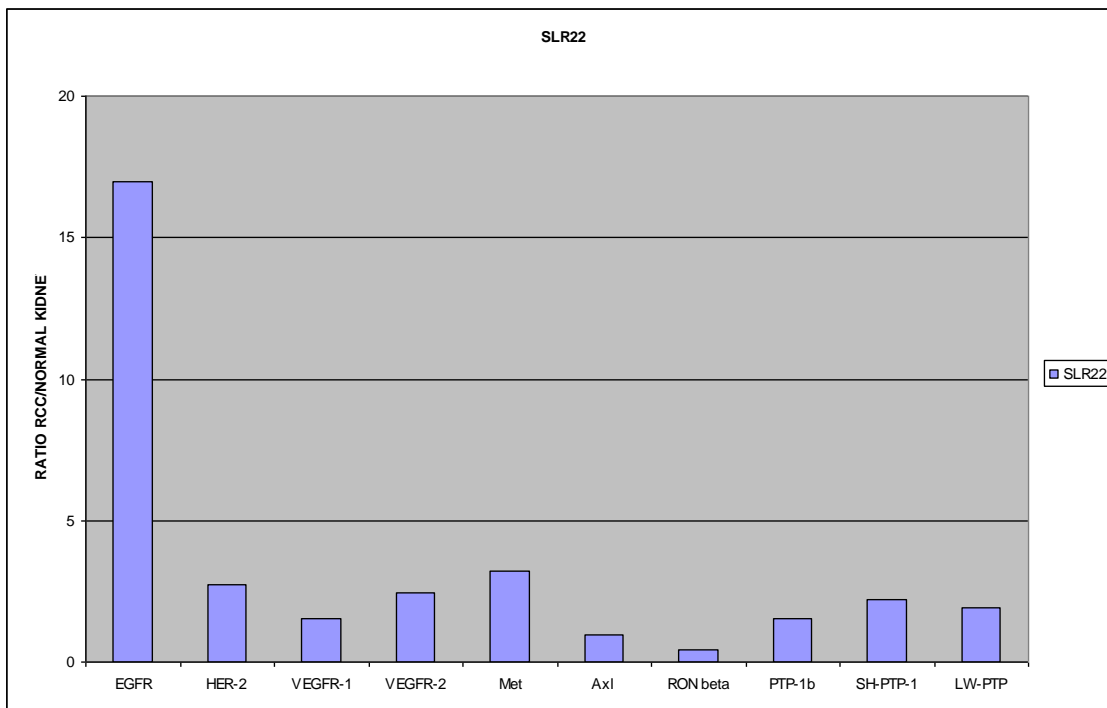


Gráfico 19. Expresión analizada en la línea celular SLR 22.

SLR24

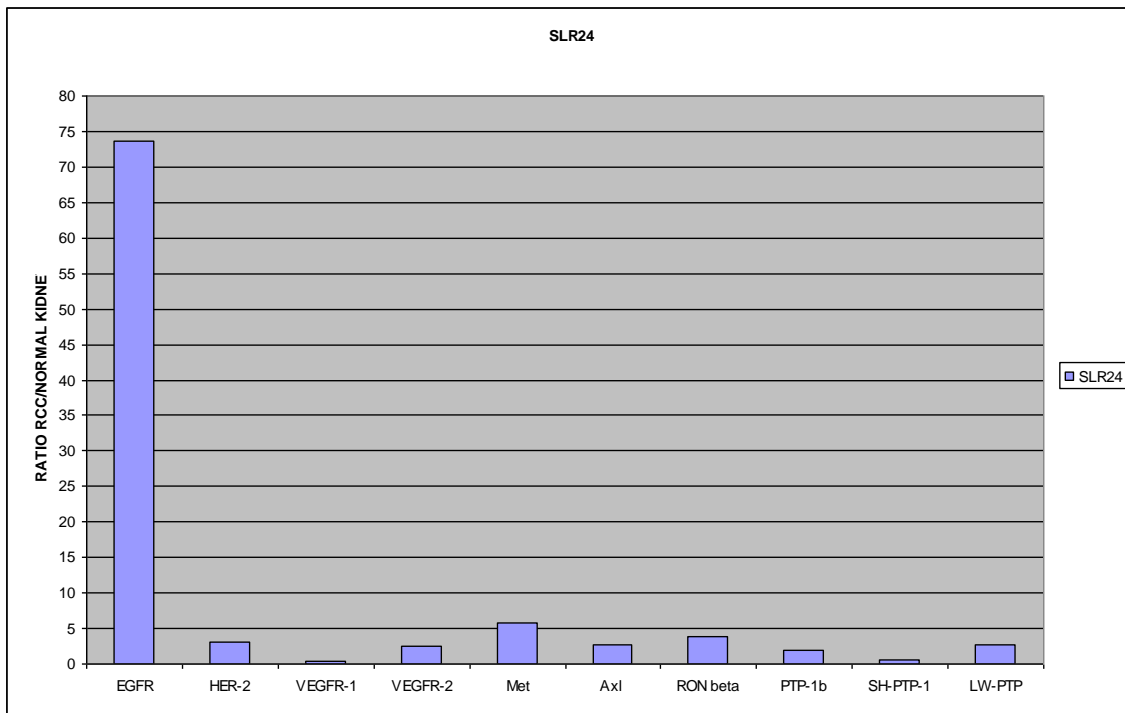


Gráfico 20. Expresión analizada en la línea celular SLR 24.

SLR25

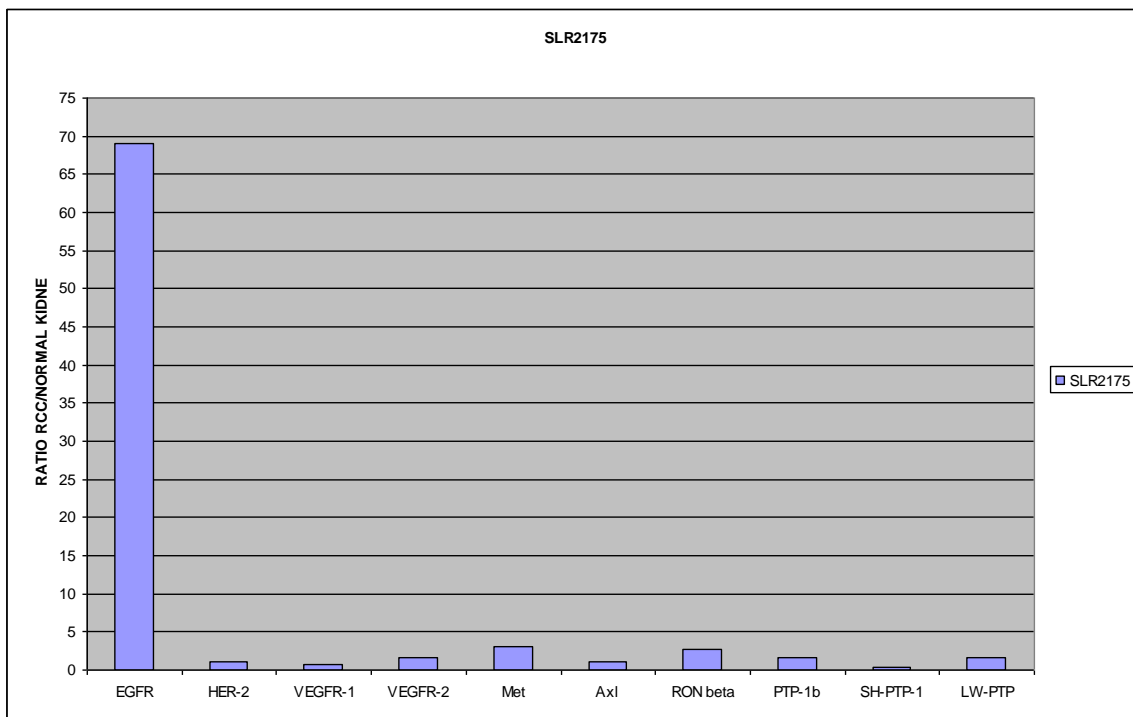


Gráfico 21. Expresión analizada en la línea celular SLR 25.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se trata de un estudio descriptivo. Se aplica una diferencia de valores de las diferentes variables que aparecen expresadas como ratios de expresión resultantes de la comparación de expresión de la proteína problema con la expresión de beta actina y posteriormente comparándolo con el valor de expresión del tejido normal (HK). La expresión, como ya hemos visto se calcula en base a densidad óptica calculada por un densitómetro digital.

En nuestro trabajo consideramos muy importante la validación de la técnica de Western-blot más que la comparación de la media de expresión global de una proteína en 5 líneas celulares con respecto a la del tejido normal. Se realiza comparación utilizando T de Student para datos apareados pero teniendo en cuenta que el tamaño muestral es insuficiente.

Comparación de líneas celulares: Receptores de Tirosina Kinasa

T DE STUDENT PARA DATOS APAREADOS

		Paired Differences					t	df	p
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	SLR20 - HK	9,1822	15,5059	5,8607	-5,1584	23,5228	1,567	6	,168
Pair 2	SLR21 - HK	14,3409	17,0706	6,4521	-1,4467	30,1286	2,223	6	,068
Pair 3	SLR22 - HK	3,0431	5,7841	2,1862	-2,3064	8,3925	1,392	6	,213
Pair 4	SLR24 - HK	12,1326	26,7308	10,1033	-12,5893	36,8545	1,201	6	,275
Pair 5	SLR25 - HK	10,3304	25,4300	9,6116	-13,1884	33,8493	1,075	6	,324

Tabla 13. T de Student para datos apareados. Comparación de expresión de líneas celulares. Receptores tirosina kinasa.

Comparación de líneas celulares: Fosfatasa de la Proteína Tirosina

T DE STUDENT PARA DATOS APAREADOS

		Paired Differences					t	df	p
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	SLR20 - HK	1,6417	2,3110	1,3343	-4,0993	7,3827	1,230	2	,344
Pair 2	SLR21 - HK	3,7731	2,7110	1,5652	-2,9614	10,5075	2,411	2	,137
Pair 3	SLR22 - HK	,8784	,3448	,1991	2,181E-02	1,7349	4,412	2	,048
Pair 4	SLR24 - HK	,6739	1,0269	,5929	-1,8771	3,2248	1,137	2	,374
Pair 5	SLR25 - HK	,2070	,7743	,4470	-1,7164	2,1304	,463	2	,689

Tabla 14. T de Student para datos apareados. Comparación de expresión de líneas celulares. Fosfatasa de la proteína tirosina.

Basándonos en los valores con significación estadística solo podríamos concluir que la línea celular SLR 22 presenta niveles de expresión de fosfatasa de la proteína tirosina significativamente mayores que los del tejido normal.

Esta consideración agruparía los valores de expresión de las distintas PTPs de forma global, no siendo ese nuestro objetivo sino estudiar cada proteína por separado.

Comparación de expresión de tipos de Receptores de Tirosina Kinasa con respecto al tejido normal.

T DE STUDENT PARA DATOS APAREADOS

		Paired Differences					t	df	p
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	EGFR LINEAS-HK	47,6247	23,2077	10,3788	18,8085	76,4409	4,589	4	,010
Pair 2	HER-2 LINEAS-HK	1,4107	1,0414	,4657	,1176	2,7038	3,029	4	,039
Pair 3	VEGFR-1 LINEAS-HK	,1681	,5911	,2644	-,5659	,9021	,636	4	,559
Pair 4	VEGFR-2 LINEAS-HK	5,1462	6,3722	2,8497	-2,7659	13,0583	1,806	4	,145
Pair 5	MET LINEAS-HK	2,8481	1,5422	,6897	,9332	4,7630	4,129	4	,015
Pair 6	AXL LINEAS-HK	1,6035	1,9574	,8754	-,8269	4,0339	1,832	4	,141
Pair 6	RON BETA LINEAS-HK	9,8382	16,3031	7,2910	-10,4048	30,0811	1,349	4	,249

Tabla 15. T de Student para datos apareados. Comparación de expresión de los distintos tipos de Receptores de tirosina kinasa.

En este análisis la p es significativa para EGFR, HER-2 y MET. La causa fundamental de la falta de significación estudiando las 5 líneas celulares de forma global es que serían necesarias más líneas celulares para alcanzar dicha significación.

Comparación de expresión de tipos de Fosfatasa de Proteína Tirosina con respecto al tejido normal.

T DE STUDENT PARA DATOS APAREADOS

		Paired Differences					t	df	p
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	PTP-1B LINEAS-HK	1,5659	2,6182	1,0689	-1,1817	4,3135	1,465	5	,203
Pair 2	SH-PTP-1 LINEAS-HK	1,1583	1,9568	,7989	-,8952	3,2119	1,450	5	,207
Pair 3	LMW-PTP-1 LINEAS-HK	,8650	,7674	,3133	5,966E-02	1,6703	2,761	5	,040

Tabla 16. T de Student para datos apareados. Comparación de expresión de los distintos tipos de Fosfatasa de la proteína tirosina.

En este caso la p es significativa para LMW-PTP. Vale el mismo comentario realizado para los receptores tirosina kinasa.

LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Las limitaciones del presente estudio tienen que ver con el tamaño muestral y tipo de muestras para estudio seleccionadas. No es posible disponer de un gran número de estas líneas celulares por lo que utilizamos los medios facilitados por el Hillman Cancer Center (University of Pittsburgh).

Tampoco se dispone de variedad de anticuerpos reactivos, que podrían aportar mayor especificidad en algunos casos para detectar las bandas.

DISCUSIÓN

MECANISMOS DE DISREGULACIÓN DE LOS RECEPTORES DE TIROSINA KINASA.

Los receptores tirosina kinasa están disregulados en las células cancerosas, de diversas formas [96].

La fusión de un receptor tirosina quinasa con una proteína complementaria como consecuencia de una traslocación cromosómica promueve una autofosforilación y una activación. Un ejemplo es bcr-abl en leucemia mieloide crónica [97].

Otro mecanismo es una mutación que altera la autorregulación de las kinasas. Por ejemplo mutaciones en el receptor FLT-3 (Fms- like tyrosine kinase 3) en leucemia mieloide aguda; en este caso la disregulación no requiere ligando. Otro ejemplo son las pequeñas mutaciones o deleciones del EGFR en cáncer de pulmón no microcítico. Se aumenta la sensibilidad del receptor a su ligando [98] y alteran la señalización del receptor [99,100] .

Un tercer mecanismo es el aumento o la expresión aberrante del receptor de tirosina kinasa, su ligando o ambos. En esto se basa nuestro trabajo de investigación. Un ejemplo claro es la importancia de la expresión Her-2 /neu en cáncer de mama y la expresión de una forma mutante de PDGF en dermatofibrosarcoma protuberans con traslocación (11,17).

Finalmente la actividad tirosina kinasa puede resultar de una disminución de los factores que limitan dicha actividad, como aumento de actividad de proteína tirosina fosfatasa. Este punto ha sido desarrollado también en nuestros resultados. Una nueva aportación de nuestro trabajo es el estudio de las fosfatasas de la proteína tirosina, de las cuales poco se ha descrito en la literatura.

Ya hemos comentado que la activación aberrante de los receptores de tirosina kinasa puede aumentar la supervivencia, proliferación y resistencia a citotóxicos de las células malignas y puede aumentar la angiogénesis, invasividad y potencial metastático de las neoplasias.

ESTRATEGIAS PARA UTILIZAR TIROSINA-KINASAS COMO DIANA TERAPEÚTICA.

Las tirosina kinasas pueden ser inhibidas farmacológicamente por múltiples mecanismos. Se describen moléculas que inhiben la actividad catalítica de las kinasas por interferencia con el sitio de unión del ATP o de los sustratos. Otras moléculas bloquean la dimerización de los receptores de tirosina kinasa. Anticuerpos contra el receptor de tirosina kinasa o sus ligandos interrumpen la señalización a través de la neutralización del ligando, bloqueo del sitio de unión del ligando, internalización del receptor y quizás citotoxicidad mediada por el anticuerpo.

Son muchos los fármacos que se están desarrollando en este sentido y por esta razón es tan importante detectar la sobreexpresión de dichas dianas terapéuticas.

EGFR ha quedado claramente demostrado en diversos estudios, que está sobreexpresado en el carcinoma de células renales, concordando con nuestros resultados. Por tanto, se encuentran en fase preclínica o en fase de ensayo clínico diversos fármacos que actúan contra dicho receptor.

VEGFR-1 y VEGFR-2 están sobreexpresados en muchos cánceres de pulmón no microcítico, mama, próstata, cáncer colorrectal y carcinoma de células renales [101]. En nuestros resultados hemos detectado la sobreexpresión significativa de VEGFR-2. VEGFR-1 y VEGFR-2 son buenas dianas terapéuticas, tanto ellas como su ligando VEGF.

Met se sobreexpresa en melanoma y en tumores del sistema músculoesquelético activado por mutaciones puntuales en cáncer de pulmón microcítico y en carcinoma de células renales papilar aunque también se ha visto sobreexpresión en no papilar. También aparece disregulado en cáncer gástrico.

PDGFR alfa se sobreexpresa en glioblastoma, osteosarcoma [102, 103, 104] y presenta mutaciones y deleciones en GIST [105].

Axl es otra proteína que presenta sobreexpresión en carcinoma de células renales, como hemos demostrado y hay estudios anteriores concordantes en este sentido aunque son muy pocos los trabajos que se han publicado en cuanto a esta proteína. [106].

Tie es un receptor de tirosina kinasa expresado en células endoteliales y en un grupo de progenitores hematopoyéticos [107]. No se dispone de datos de sobreexpresión en carcinoma de células renales.

Numerosos estudios se han ido desarrollando con objetivos similares al nuestro [108,109,110]. El resumen de todos ellos podría ser que el carcinoma de células renales presenta sobreexpresión de EGFR, HER-2, Ron, Met, VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3, lo cual es concordante con nuestros resultados obtenidos por la técnica de Western-Blot.

FOSFATASAS DE LA PROTEÍNA TIROSINA COMO DIANA TERAPEÚTICA

Al igual que los receptores de la tirosina kinasa, se están investigando en fase de ensayo clínico muchos inhibidores de estas fosfatasa de la proteína tirosina. Estas proteínas son las nuevas protagonistas en el campo del desarrollo de nuevos fármacos [111].

El descubrimiento de que los PTP-1B actúan como un regulador negativo en la señalización de la insulina ha impulsado el interés de la industria farmacéutica [112]

Recientes descubrimientos de que otras fosfatasa de la proteína tirosina juegan un

importante papel en una gran variedad de enfermedades han aumentado el número de proyectos de investigación en torno a la utilización de las fosfatasa de la proteína tirosina como diana terapéutica. Muy recientemente se han descrito aproximadamente 30 fosfatasa de la proteína tirosina distintas implicadas en cáncer gracias a los avances de la genómica. [113]

Esperamos que con la mejoría del conocimiento de los mecanismos moleculares por lo cuales las fosfatasa de la proteína tirosina intervienen en la patogenia de estas enfermedades, combinadas con el papel dominante que estas fosfatasa juegan en los procesos de regulación de la fosforilación de los receptores de tirosina kinasa, los inhibidores de estas fosfatasa serán terapéuticas relevantes en el futuro. El principal reto dentro del campo de estas proteínas, en la era post-genómica, es elucidar el papel fisiológico de cada producto individual de cada gen. Numerosos avances tecnológicos ayudarán a descubrir el sustrato de estas fosfatasa como son la espectrometría de masas, los avances en genómica, el uso de RNA de interferencia, de forma que puedan aclararse sus funciones.

Como se ha comentado en la introducción, la fosforilación de la tirosina es un proceso reversible y dinámico. Los estados de fosforilación de las proteínas son gobernados por las acciones contrapuestas de los receptores tirosina kinasa y de las fosfatasa de la proteína tirosina. En esta textura ambos tipos de proteínas juegan importantes papeles de manera equitativa en la transducción de señales. [114] Ha quedado muy claro en nuestro trabajo que la fosforilación es la modificación bioquímica más común de las moléculas celulares, regulando procesos fundamentales como el crecimiento, la diferenciación, la proliferación, el movimiento o la muerte. [115] El balance entre fosforilación y defosforilación está alterado en las células tumorales. El aumento de actividad de las fosfatasa de la proteína tirosina en las células tumorales confirma este

disbalance y además se correlaciona con el pronóstico. Las técnicas que permiten comparar la diferencia entre tumores y tejido normal utilizan métodos inmunológicos para detectar la sobreexpresión de las proteínas. [116]

MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN DE DIANAS TERAPEÚTICAS

Con nuestro trabajo demostramos que el Western-Blot es un buen método para detección de proteínas implicadas en los mecanismos de oncogénesis.

Otras estrategias para la identificación de dianas terapéuticas están en desarrollo. Sabemos que la activación de una o más tirosina kinasas o de los patrones de señalización en cascada ocurre en la mayoría si no en la práctica totalidad de los cánceres. La citogenética moderna puede ser capaz de identificar tirosina quinasas adicionales activadas a través de traslocaciones cromosómicas, reordenamientos y deleciones en células cancerígenas. Únicamente estamos comenzando a identificarlos. Los análisis por FISH demostraron la amplificación del gen ABL1 en un subconjunto de leucemia aguda linfoblástica T [117] y llevó a la identificación de la proteína de fusión NUP214-ABL. [118] En el síndrome hipereosinofílico y en el glioblastoma, proteínas de fusión relacionadas con el PDGFRalfa y el receptor ROS son generadas mediante deleciones demasiado pequeñas para ser detectadas por técnicas citogenéticas de rutina [119, 120] pero deberían detectarse por técnicas de hibridación.

Las técnicas de citometría de flujo para identificar proteínas tirosina kinasas activadas y las vías de señalización en células neoplásicas parecen prometedoras. [121] Las modernas técnicas de genómica nos permitirán avanzar en el reconocimiento de estos receptores de tirosina kinasa, de forma que cada exon de cada tirosin kinasa es amplificado por PCR desde el tejido tumoral y analizado por secuenciación para

mutaciones potencialmente activadoras. Con esta técnica han podido identificarse nuevas mutaciones de receptores de tirosina kinasa en cáncer de colon [122] aunque su rendimiento es bajo.

Estas sofisticadas técnicas tienen el inconveniente de la necesidad de una mayor infraestructura para su utilización, son más caras aunque tienen una mayor resolución. Las técnicas más clásicas como el Western Blot o inmunohistoquímica resultan más asequibles y su generalización de uso es más viable.

El Western-blot se presenta como una técnica adecuada para la determinación cuantitativa de la expresión de receptores de tirosina kinasa y de fosfatasas de la proteína tirosina. Es una técnica fácilmente reproducible, que requiere un adiestramiento básico y que no emplea una tecnología de altos costes salvo los anticuerpos sintéticos dirigidos contra las proteínas objeto de nuestro estudio. Puede ser un método objetivo de detección, válido para todos los tipos de neoplasia. Sus limitaciones pueden ser la falta de especificidad de algunos anticuerpos utilizados o las mutaciones que producen variaciones en los dominios de unión a dichos anticuerpos reactivos.

SELECCIÓN DE PACIENTES CANDIDATOS A TRATAMIENTO.

La determinación de receptores de tirosina kinasa puede considerarse un método de selección de pacientes candidatos a tratamiento.

El futuro de los tratamientos anti-diana en cáncer es prometedor, pero deben indicarse algunos aspectos en nuestro enfoque. Los nuevos agentes anti-tirosina kinasa no se ajustan bien al método tradicional del ensayo clínico fase I, II y III ya que su toxicidad es muy baja y la obtención de respuestas clínicas es limitada a un subgrupo de pacientes [123]. En los estudios fase II o III los pacientes deberían ser seleccionados en base a la

evidencia de activación de las dianas tirosina kinasa en los distintos tumores. Dichos estudios deberían incluir análisis farmacodinámicos de inhibición de dichas dianas para asegurarse si realmente se produce la respuesta esperada porque podría descartarse un posible fármaco al no obtener una respuesta clínica (debido a otras causas determinadas) y sin embargo existir una adecuada inhibición a nivel molecular [124] .

La estratificación de los pacientes nos llevará a que la terapia anticáncer sea individualizada.

Aquí es donde verdaderamente encuentra aplicación clínica nuestro trabajo de investigación. La determinación de los receptores de tirosina kinasa en los pacientes selecciona subgrupos susceptibles de ser tratados con fármacos antitumorales siendo el Western Blot un método útil. Estas determinaciones previas podrían reducir el gasto farmacéutico al seleccionar pacientes susceptibles pero la realidad es que muchos de estos nuevos fármacos se emplean en asociación con quimioterápicos de alto precio, por lo que el ahorro global no es muy significativo.

La detección de receptores de tirosina kinasa ayudará a testar nuevos fármacos contra tumores resistentes a citotóxicos clásicos y pueden abrir una luz de esperanza en pacientes con un pronóstico nefasto, además de resultar un complemento a los tratamientos estándar.

APLICACIÓN AL CARCINOMA DE CÉLULAS RENALES

Centrándonos en el carcinoma de células renales han surgido en los últimos años numerosas publicaciones acerca de la expresión de receptores de tirosina kinasa, pero acerca de la expresión de fosfatasa de la proteína tirosina apenas hay precedentes en la literatura.

Debido a la gran cantidad de receptores de tirosina kinasa que se conocen no todos están evaluados en cuanto a su expresión en el carcinoma de células renales. Hay estudios publicados en los que se demuestra la sobreexpresión de algunos receptores de tirosina kinasa en algunos tejidos renales tumorales como EGFR [125,126]. El estudio de expresión de Eph A2 mediante técnica de Western-Blot e inmunohistoquímica en la publicación de Herrem y colaboradores tiene un diseño muy similar a nuestro trabajo, demostrando sobreexpresión de dicho receptor de tirosina kinasa en las mismas líneas celulares que hemos analizado. Se demostró que las líneas celulares metastásicas expresaban en mayor grado dicho receptor que las líneas celulares no metastásicas. Utilizó como comparador la misma línea celular HK que en nuestro análisis. Sus resultados se correlacionaron con los obtenidos con las mismas líneas celulares estudiadas por técnicas de inmunohistoquímica [127,128].

El receptor Her-2 también se encuentra sobreexpresado en algunos casos. [129] Los antecedentes en la literatura de expresión de HGFR (Met y Ron) en carcinoma de células renales son más escasos. [130, 131,132] Existen dos estudios relativamente recientes de la expresión de Ron en distintos tipos de carcinoma de células renales. El primero es un estudio italiano en el que Ron se considera un marcador exclusivo de oncocitoma [133]. En este estudio también se empleó el Western Blot y la conclusión es que hay mayor sobreexpresión de Ron en oncocitomas que en otros tipos de tumor renal. El segundo estudio [134] , del mismo centro que el estudio de c-kit (Universidad de Rochester, Nueva York y Universidad de Chicago) concluye que Ron está sobreexpresado tanto en oncocitoma como en carcinoma cromóforo a pesar de que en otros estudios parece un rasgo diferencial de los oncocitomas. Se analizan 141 carcinomas de células renales, el 99% de los oncocitomas sobreexpresaron Ron y un

96% de los cromóforos también lo expresaron mientras que solo un 17% de los otros tipos lo expresaron. La técnica de estudio fue la inmunohistoquímica.

También ha sido estudiada la sobreexpresión de IGFR [135] y PDGFR. [136].

Existen estudios acerca de la expresión de c-kit en carcinoma de células renales en aras de poder utilizar dicha molécula como diana para tratamientos ya existentes en la actualidad. Huo y colaboradores [137] han estudiado recientemente la expresión de dicha proteína mediante la técnica de microarrays e inmunohistoquímica a partir de publicaciones previas en las que se considera a c-kit un marcador de carcinoma de células renales cromóforo y del angiomiolipoma renal. Analizan 17 carcinomas de células renales cromóforos y 20 oncocitomas mediante técnica de microarrays de cDNA (DNA complementario). Además estudian 226 tumores renales por inmunohistoquímica incluyendo 40 carcinomas de células renales de clara, 40 cromóforos, 41 oncocitomas y 29 angiomiolipomas. Se encontró sobreexpresión de c-kit en cromóforos y en oncocitomas. No se detectó expresión en el resto de tumores. Vemos la importancia que puede tener la detección con implicaciones pronósticas y terapéuticas así como su correlación con los distintos tipos histológicos.

De todos estos estudios, de forma genérica, podemos remarcar que los análisis de sobreexpresión de receptores de tirosina kinasa y sobre todo, de fosfatasa de la proteína tirosina en carcinoma de células renales, publicados en la literatura, no están completamente desarrollados, siendo muy escasos.

Nuestro trabajo supone una aportación más en este campo, resaltando la utilidad y las ventajas de la técnica del Western Blot. Este trabajo se engloba dentro de un proyecto más amplio de investigación en el que los siguientes pasos son la utilización de agonistas e inhibidores de los receptores de tirosina kinasa y de las fosfatasa de la

proteína tirosina viendo las modificaciones en la expresión de los mismos y el estudio de la correlación con la clínica, comprobando si hay cambios en el comportamiento del tumor en función de la sobreexpresión o la inhibición de la misma. Un paso más sería utilizar estas proteínas como dianas no sólo terapéuticas (como dianas farmacológicas) sino también inmunológicas, pudiendo obtener vacunas o estimular linfocitos CD8 contra dichas dianas.

Estudios farmacológicos futuros aclararán el verdadero valor de la expresión de estas proteínas. Queremos recalcar lo novedoso del estudio de la expresión de las fosfatasa de la proteína tirosina, que suponen un gran avance en el amplio abanico de dianas terapéuticas que se están desarrollando en la actualidad.

Este trabajo se realiza con la ambición de ofrecer una esperanza más a los pacientes afectados de carcinoma de células renales, a los que hasta ahora se les han ofrecido muy pocas alternativas terapéuticas efectivas.

CONCLUSIONES

1. En todas las líneas celulares de carcinoma renal estudiadas se demuestra sobreexpresión de EGFR en un grado muy superior al resto de proteínas. VEGFR-2, el receptor Met y PTP-1b presentan sobreexpresión también en todas las líneas celulares estudiadas.
2. HER-2, Ron y LMW-PTP presentan sobreexpresión en cuatro de las cinco líneas celulares estudiadas.
3. Axl y SH-PTP presentan sobreexpresión en tres de las cinco líneas celulares estudiadas .
4. Para VEGFR-1 obtenemos sobreexpresión en dos de las cinco líneas estudiadas.
5. El Western-Blot es un método fiable, objetivo, fácilmente reproducible y económico para el estudio de expresión de proteínas en células tumorales, tanto de líneas celulares como en la práctica clínica. El grado de especificidad de los anticuerpos que se utilizan para el marcaje es su factor limitante.
6. Nuestros resultados de expresión son concordantes con otros estudios realizados y publicados en revistas de alto impacto en Oncología.
7. La práctica clínica debe incluir en algunos casos la determinación de expresión de estas proteínas para realizar tratamientos individualizados.
8. Las proteínas sobreexpresadas son potenciales dianas terapéuticas, en concreto, VEGFR-2 es la diana para sunitinib y sorafenib, dos fármacos recientes muy activos en carcinoma renal. Del mismo modo las fosfatasa de la proteína tirosina son nuevas dianas que darán lugar en un futuro no muy lejano a la aparición de fármacos anti-diana.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cao Y. et al. Renal neoplasms in younger adults: analysis of 112 tumors from a single institution according to the new 2004 World Health Organization classification and 2002 American Joint Committee on Cancer Staging System. *Arch Pathol Lab Med.* 2005 Apr;129(4):487-91.
2. Bassil B, Dosoretz DE, Prout GR Jr: Validation of the tumor, nodes and metastasis classification of renal cell carcinoma. *J Urol* 134 (3): 450-4, 1985.
3. Golimbu M, Joshi P, Sperber A, et al.: Renal cell carcinoma: survival and prognostic factors. *Urology* 27 (4): 291-301, 1986.
4. Robson CJ, Churchill BM, Anderson W: The results of radical nephrectomy for renal cell carcinoma. *J Urol* 101 (3): 297-301, 1969.
5. Consensus conference. Magnetic resonance imaging. *JAMA* 259 (14): 2132-8, 1988.
6. Kidney. In: American Joint Committee on Cancer.: *AJCC Cancer Staging Manual.* 6th ed. New York, NY: Springer, 2002, pp 323-5
7. Novick AC, Strem S, Montie JE, et al.: Conservative surgery for renal cell carcinoma: a single-center experience with 100 patients. *J Urol* 141 (4): 835-9, 1989.
8. Thrasher JB, Robertson JE, Paulson DF: Expanding indications for conservative renal surgery in renal cell carcinoma. *Urology* 43 (2): 160-8, 1994.

9. De Kernion JB, Berry D: The diagnosis and treatment of renal cell carcinoma. *Cancer* 45 (7 Suppl): 1947-56, 1980.
10. Swanson DA, Wallace S, Johnson DE: The role of embolization and nephrectomy in the treatment of metastatic renal carcinoma. *Urol Clin North Am* 7 (3): 719-30, 1980.
11. Phillips E, Messing EM: Role of lymphadenectomy in the treatment of renal cell carcinoma. *Urology* 41 (1): 9-15, 1993.
12. Hatcher PA, Anderson EE, Paulson DF, et al.: Surgical management and prognosis of renal cell carcinoma invading the vena cava. *J Urol* 145 (1): 20-3; discussion 23-4, 1991.
13. deKernion JB: Management of renal adenocarcinoma. In: deKernion JB, Paulson DF, eds.: *Genitourinary Cancer Management*. Philadelphia, Pa: Lea and Febiger, 1987, pp 187-217
14. Angermeier KW, Novick AC, Strem SB, et al.: Nephron-sparing surgery for renal cell carcinoma with venous involvement. *J Urol* 144 (6): 1352-5, 1990.
15. Oliver RT, Nethersell AB, Bottomley JM: Unexplained spontaneous regression and alpha-interferon as treatment for metastatic renal carcinoma. *Br J Urol* 63 (2): 128-31, 1989.
16. Wroński M, Arbit E, Russo P, et al.: Surgical resection of brain metastases from renal cell carcinoma in 50 patients. *Urology* 47 (2): 187-93, 1996.

17. Steis RG, Foon KA, Longo DL: Current and future uses of recombinant interferon alpha in the treatment of low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer* 59 (3 Suppl): 658-63, 1987.
18. Muss HB: The role of biological response modifiers in metastatic renal cell carcinoma. *Semin Oncol* 15 (5 Suppl 5): 30-4, 1988.
19. Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, et al.: A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *N Engl J Med* 316 (15): 889-97, 1987.
20. Fisher RI, Coltman CA Jr, Doroshow JH, et al.: Metastatic renal cancer treated with interleukin-2 and lymphokine-activated killer cells. A phase II clinical trial. *Ann Intern Med* 108 (4): 518-23, 1988.
21. Weiss GR, Margolin KA, Aronson FR, et al.: A randomized phase II trial of continuous infusion interleukin-2 or bolus injection interleukin-2 plus lymphokine-activated killer cells for advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 10 (2): 275-81, 1992.
22. Rosenberg SA, Yang JC, Topalian SL, et al.: Treatment of 283 consecutive patients with metastatic melanoma or renal cell cancer using high-dose bolus interleukin 2. *JAMA* 271 (12): 907-13, 1994 Mar 23-30.
23. Atkins MB, Sparano J, Fisher RI, et al.: Randomized phase II trial of high-dose interleukin-2 either alone or in combination with interferon alfa-2b in advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 11 (4): 661-70, 1993.

24. Yang JC, Topalian SL, Parkinson D, et al.: Randomized comparison of high-dose and low-dose intravenous interleukin-2 for the therapy of metastatic renal cell carcinoma: an interim report. *J Clin Oncol* 12 (8): 1572-6, 1994.
25. Sleijfer DT, Janssen RA, Buter J, et al.: Phase II study of subcutaneous interleukin-2 in unselected patients with advanced renal cell cancer on an outpatient basis. *J Clin Oncol* 10 (7): 1119-23, 1992.
26. Fyfe G, Fisher RI, Rosenberg SA, et al.: Results of treatment of 255 patients with metastatic renal cell carcinoma who received high-dose recombinant interleukin-2 therapy. *J Clin Oncol* 13 (3): 688-96, 1995.
27. Neves RJ, Zincke H, Taylor WF: Metastatic renal cell cancer and radical nephrectomy: identification of prognostic factors and patient survival. *J Urol* 139 (6): 1173-6, 1988.
28. Childs R, Chernoff A, Contentin N, et al.: Regression of metastatic renal-cell carcinoma after nonmyeloablative allogeneic peripheral-blood stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 343 (11): 750-8, 2000.
29. Beldegrun A, Abi-Aad AS, Figlin RA, et al.: Renal cell carcinoma: basic biology and current approaches to therapy. *Semin Oncol* 18 (5 Suppl 7): 96-101, 1991.
30. Díaz-Rubio E. *Biología Molecular para clínicos de los principales tumores.* (2): 185-194. 2005.
31. Pawson T. Regulation and targets of receptor tyrosine kinases. *Eur. J. Cancer.* 38: S3-10, 2002.

32. Clague M.J., Urbe S. The interface of receptor trafficking and signalling. *J Cell Sci* 114: 3705-3081,2001
33. Zwick E., Bange J, Ulrich A. Receptor tyrosine kinase signalling as a target for cancer intervention strategies. *Endocr. Relat Cancer* 8: 161-173. 2001.
34. Van der Geer, P., Hunter, T., Lindberg, R.A. Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu Rev Cell Biol* 1994; 10: 251-337.
35. Robertson, S.C., Tynan, J., Donoghue, D.J. RTK mutations and human syndromes: When good receptors turn bad. *Trends Genet* 2000; 16: 368.
36. Heldin, C. H. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* 1995; 80: 213-223.
37. Bargmann, C.I., Weinberg, R.A. Oncogenic activation of the neu-encoded receptor protein by point mutation and deletion. *EMBO J* 1988; 7: 2043-2052.
38. Stemberg, M.J.E., Gullick, W.J. Neu receptor dimerization. *Nature* 1994; 339: 587.
39. Webster, M.K. Donoghue, D.J. Constitutive activation of fibroblast growth factor receptor 3 by transmembrane domain point mutation found in achondroplasia. *EMBO J* 1996; 15: 520-527.
40. Bernardi, G. The human genome: Organization and evolutionary history. *Annu Rev Genet* 1995; 29: 445-476.
41. Cunningham, B.C, Ultsch, M., de Vos, A.M., Mulkerrin, M.G., Clauser, K.R., Wells, J.A. Dimerization of the extracellular domain of the human growth hormone receptor by a single hormone molecule. *Science* 1991; 8; 254: 821-825.

42. Carpenter, G. Receptor tyrosine kinase substrates: src homology domains and signal transduction. *FASEB J* 1992; 6: 3283-3289. Review.
43. Glenney, J.R., Jr. Tyrosine-phosphorylated proteins: Mediators of signal transduction from the tyrosine kinases. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1134: 113-127.
44. Mayer, R., Lindle, D.W., Southworth, S.R., Cowan, P.L. Direct determination of molecular orbital symmetry of H₂S using polarized x-ray emission. *Phys Rev A* 1991; 43: 235-241.
45. Treisman, R. Ternary complex factors: Growth factor regulated transcriptional activators. *Curr Opin Genet Dev* 1994; 4: 96-101.
46. Garrington, T.P., Johnson, G.L. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11: 211-218.
47. Reedijk, M., Liu, X.Q., Pawson, T. Interactions of phosphatidylinositol kinase, GTPase-activating protein (GAP), and GAP-associated proteins with the colony-stimulating factor 1 receptor. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 5601-5608.
48. Giordano, S., di Renzo, M.F., Narsirhan, R.P. y cols. Evidence for autocrine activation of a tyrosine kinase in a human gastric carcinoma cell line. *J Cell Biochem* 1988; 38: 229-236.
49. Gherardi, E., Stoker, M. Hepatocyte growth factor—scatter factor: Mitogen, motogen, and met. *Cancer Cells* 1991; 3: 227-232.
50. Reiter, J.L, Threadgill. D.W., Eley, G.D. y cols. Comparative genomic sequence analysis and isolation of human and mouse alternative EGFR transcripts encoding truncated receptor isoforms. *Genomics* 2001; 71:1-20.

51. O'Bryan, J.P., Frye, R.A., Cogswell, P.C. y cols. axl, a transforming gene isolated from primary human myeloid leukemia cells, encodes a novel receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol* 1991; 11: 5016-5031.
52. Wells, A. EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol* 1999; 31: 637-643.
53. Haley, J., Whittle, N., Bennet, P. The human EGF receptor gene: Structure of the 110 kb locus and identification of sequences regulating its transcription. *Oncogene Res* 1987; 1: 375-396.
54. Harris, A. "EGFR Signal Transduction 2001 Poster" Signal: EGFR Signal Transduction. 2002 October.
55. Freeman MR, Washecka R, Chung LW. Aberrant expression of epidermal growth factor receptor and HER-2 messenger RNAs in human renal cancers. *Cancer Res* 1989; 49: 6221-6225.
56. Akiyama, T., Sudo, C., Ogawara, H., Toyoshima, K., Yamamoto, T. The product of the human c-erbB-2 gene: A 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Science* 1986; 232: 1644-1646.
57. Bargmann, C.I., Hung, M.C., Weinberg, R.A. The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. *Nature* 1986; 319: 226-230.
58. Coussens, L., Yang-Feng, T.L., Liao, Y.C. y cols. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* 1985; 230: 1132-1139.
59. King, C.R., Kraus, M.H., Aaronson, S.A. Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science* 1986; 229: 974-976.
60. Schechter, A.L., Stern, D.F., Vaidyanathan, L. y cols. The neu oncogene: An erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature* 1984; 312: 513-516.

61. Stern, D.F., Heffernan, P.A., Weinberg, R.A. p185, a product of the neu proto-oncogene, is a receptor-like protein associated with tyrosine kinase activity. *Mol Cell Biol* 1986; 6: 1729-1740.
62. Yamamoto, T., Ikawa, S., Akiyama, T. y cols. Similarity of protein encoded by the human c-erb-B-2 gene to epidermal growth factor receptor. *Nature* 1986; 319: 230-234.
63. Kraus, M.H., Issing, W., Miki, T., Popescu, N.C., Aaronson, S.A. Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: Evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 9193-9197.
64. Plowman, G.D., Whitney, G.S., Neubauer, M.G. y cols. Molecular cloning and expression of an additional epidermal growth factor receptor-related gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 4905-4909.
65. Plowman, G.D., Culouscou, J.M., Whitney, G.S. y cols. Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 1746-1750.
66. Slamon, D.J., Godolphin, W., Jones, L.A. y cols. Studies afilie erbB-2/neuproto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989; 244: 707-712.
67. Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A., McGuire, W.L. Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/ neu oncogene. *Science* 1987; 235: 177-181.
68. Press, M.F., Pike, M.C., Chazin, V.R. y cols. Her-2/neu expression in node-negative breast cancer: Direct tissue quantitation by computerized image

- analysis and association of overexpression with increased risk of recurrent disease. *Cancer Res* 1993; 53: 4960-4970.
69. Nicholson, S., Wright, C., Sainsbury, J.R.C. y cols. Epidermal growth factor receptor (EGFr) as a marker for poor prognosis in node-negative breast cancer patients: Neu and tamoxifen failure. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1990; 37: 811-814.
70. Wright, C., Nicholson, S., Angus, B. y cols. Relationship between c-erbB-2 protein expression and response to endocrine therapy in advanced breast cancer. *Br J Cancer* 1992; 65: 118-121.
71. Kraus, M.H., Popescu, N.C., Amsbaugh, S.C., King, C.R. Overexpression of the EGF receptor-related proto-oncogene erbB-2 in human mammary tumor cell lines by different molecular mechanisms. *EMBO J* 1987; 6: 605-610.
72. Semba, K., Kamata, N., Toyoshima, K., Yamamoto, T. A v-erbB-related protooncogene, c-erbB-2, is distinct from the c-erbB-1/epidermal growth factor-receptor gene and is amplified in a human salivary gland adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 6497-6501.
73. Venter, D.J., Tuzi, N.L., Kumar, S., Gullick, W.J. Overexpression of the c-erbB-2 oncoprotein in human breast carcinomas: Immunohistological assessment correlates with gene amplification. *Lancet* 1987; 2: 69-72.
74. Yokota, J., Yamamoto, T., Toyoshima, K. y cols. Amplification of c-erbB-2 oncogene in human adenocarcinomas in vivo. *Lancet* 1986; 1: 765-767.
75. D'Emilia, J., Bulovas, K., D'Ercole, K., Wolf, B., Steele, G. Jr., Summerhayes, I.C. Expression of the c-erbB-2 gene product (p185) at different stages of neoplastic progression in the colon. *Oncogene* 1989; 4: 1233-1239.

76. Herrera, G.A. C-erb B-2 amplification in cystic renal disease. *Kidney Int* 1991; 40: 509-513.
77. Jankowski, J., Coghill, G., Tregaskis, B., Hopwood, D., Wormsley, K.G. Epidermal growth factor in the oesophagus. *Gut* 1992; 33: 1448-1453.
78. Maulik, G., Shrikhande, A., Kijima, T., Ma, P.C., Morrison, P.T., Salgia, R. Role of hepatocyte growth factor receptor, c-Met, in oncogenesis and potencial for therapeutic inhibition. *Cytoquine Growth Factor Reviews* 2002; 13: 41-59.
79. Rosen, E.M., Lamszus, K., Laterra, J. y cols. HGF/SF in angiogenesis. *Ciba Found Symp* 1997; 212: 215-226.
80. Dong, G., Chen, Z., Li, Z.Y. y cols. Hepatocyte growth factor/scatter factor-induced activation of MEK and PI3K signal pathways contributes to expression of proangiogenic cytokines interleukin-8 and vascular endothelial growth factor in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2001; 61: 5911-5918.
81. Rampino T, Gregorini M, Soccio G, Maggio M, Rosso R, Malvezzi P, Collesi C, Canton AD. The Ron Proto-oncogene Product Is a Phenotypic Marker of Renal Oncocytoma. *Am J Surg Pathol.* 2003 Jun;27(6):779-85).
82. Janssen JW, Schulz AS, Steenvoorden AC, Schmidberger M, Strehl S., Ambros PF, Bartam CR. A novel putative tyrosine kinasa receptor with oncogenic potencial. 1991. *Oncogene* 6, 2113-2120).
83. Mc Closkey P, Pierce J, Koski RA, Varnum B, Liu ET. Activation of the Axl tyrosine kinasa receptor induces mitogenesis and transformation in 32D cells. 1994. *Cell Growth Differ* 5. 1105-1117.

84. O'Bryan JP et al. Axl, a transforming gene isolated from primary human myeloid leukemia cells encodes a novel tyrosine kinasa receptor. 1991. *Mol. Cell Biol.* 11, 5016-5031.
85. Charbonneau H, Tonks N.K., Kumar S., Diltz C.D., Harrylock M., Cool D.E., Krebs E.G., Fischer. E.H., Walsh K.A. Human placenta protein-tyrosine phosphatase: amino acid sequence and relationship to a family of a receptor-like proteins. 1989. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 5252-5256.
86. Guan K.L., Haun R.S., Watson S.J., Geahlen R.L., Dixon J.E. Cloning and expression of a protein-tyrosine phosphatase: 1990. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 1501-1505.
87. Czernilofsky A.P., Levinson A.D., Varmus H.E., Bishop J.M., Tischler E, Goodman H.M. Nucleotide sequence of an avian sarcoma virus oncogene (src) and proposed aminoacid sequence for gene product. 1980. *Nature* 287, 198-203.
88. Fischer E.H., Charbonneau H, Tonks N.K. Protein-tyrosine phosphatase: A diverse family of intracellular and transmembrane enzymes. 1990. *Science* 253, 401-406.
89. Walton K.M., Dixon J.E. Protein-tyrosine phosphatases. 1993. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 101-120.
90. Tonks N.K., Neel B.G. From form to function: Signalling by protein-tyrosine phosphatases: 1996. *Cell* 87, 365-368.
91. Mustelin T., Feng G., Bottini N., Alonso A., Kholod N, Birle D., Merlo J., Huynh H. Protein-tyrosine phosphatases: 2002. *Front Biosci.* 7, 85-142.
92. Mustelin T., Tasken K. Positive and negative regulation of T cell activation through kinases and phophatases. 2003. *Biochem. J.* 371, 15-27.

93. Alonso A. et al. Protein Tyrosine Phosphatases in the human genome. 2004. Cell 117: 699-711.
94. Tatsumi T. et al. Disease stage variation in CD4+ and CD8+ T-cell reactivity to the receptor tyrosine-kinase EphA2 in patients with renal cell carcinoma. 2003. Cancer Res 63: 4481-4489.
95. Ryan MJ, Johnson G, Kirk J., Fuerstenberg SM, Zager RA, Torok-Storb B. Kidney Int 1994 Jan; 45(1): 48-57.
96. Krause D., Van Etten R. Tyrosine Kinases as Targets for Cancer Therapy. N Eng J M 2005. 353; 172-87
97. Smith K.M., Yacobi R., Van Etten R. Autoinhibition of bcr-abl through its SH3 domain. Mol Cell 2003; 12: 27-37.
98. Lynch T., Bell, D.W., Sordilla R., et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small cell lung cancer to gefitinib. N Eng J M 2004; 350: 2129-39
99. Pao W, Miller V, Zakowski M, et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. Proc Natl Acad Sci USA 2004;101:13306-11.
100. Sordella R, Bell DW, Haber DA, Settleman J. Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways. Science 2004;305:1163-7.
101. Ferrara N, Gerber H-P, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. Nat Med 2003;9:669-76.
102. Hermanson M, Funa K, Hartman M, et al. Platelet-derived growth factor and its receptor in human glioma tissue: expression of messenger RNA and protein

- suggests the presence of autocrine and paracrine loops. *Cancer Res* 1992;52:3213-9.
103. McGary EC, Weber K, Mills L, et al. Inhibition of platelet-derived growth factor-mediated proliferation of osteosarcoma cells by the novel tyrosine kinase inhibitor STI571. *Clin Cancer Res* 2002;8:3584-91.
104. Kilic T, Alberta JA, Zdunek PR, et al. Intracranial inhibition of platelet-derived growth factor-mediated glioblastoma cell growth by an orally active kinase inhibitor of the 2-phenylaminopyrimidine class. *Cancer Res* 2000;60:5143-50.
105. Heinrich MC, Corless CL, Duensing A, et al. PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science* 2003; 299: 708-710.
106. Cheng B., Malkowicz B., Nguyen T.B., Libertino J.A., McGarvey T.W. Expresión of the Proto-Oncogen Axl in Renal Cell Carcinoma. *DNA and Cell Biology*. 2003. Vol. 22 (8):533-540).
107. Partanen J. et al. A novel endothelial cell surface receptor tyrosine kinase with extracellular epidermal growth factor homology domains. *Mol Cell Biol* 2002. 12: 1698.
108. Uhlman D.L. et al. Epidermal growth factor and transforming growth factor alpha expresión in papillary and non-papillary renal cell carcinoma: correlation with metastatic behavior and prognosis. *Clin Cancer Res* 1995. 1: 913-920.
109. Natali P.G. et al. Overexpression of the met / HGF receptor in renal cell carcinomas. *Int J Cancer* 1996. 69: 212-217.
110. Gunnigham S.P. et al. Vascular endothelial growth factor-B and vascular endothelial growth factor-C expresión in renal cell carcinomas: regulation by the Von Hippel-Lindau gene and hypoxia. 2001. 61: 3206-3211.

111. Alonso A. et al. Protein Tyrosine Phosphatases en the Human Genome. 2004. Cell. 117: 699-711.
112. Elchebly et al. Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gen. Science. 1995. 283: 1544-1548.
113. Andersen J.N.et al. A genomic perspective on protein tyrosine phosphatases: gene structure, pseudogenes and genetic disease linkage. FASEB J 2004. 18: 8-13.
114. Burke T.R., Zhang Z.Y. Protein-tyrosine phosphatases: structure, mechanism, and inhibitor discovery. Biopolymers 1998. 47 (3): 225-41.
115. Sachsenmaier C. Targeting protein kinases for tumor therapy. Onkologie. 2001. 24 (4): 346-55.
116. Ottenhoff-Kalff et al. Protein tyrosine phosphatase activity as a diagnostic parameter in breast cancer. Breast Cancer Res Tret 1995. 33(3): 245-56.
117. Barber KE, Martineau M, Harewood L, et al. Amplification of the ABL gene in T-cell acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 2004;18:1153-1156.
118. Graux C, Cools J, Melotte C, et al. Fusion of NUP214 to ABL1 on amplified episomes in T-cell acute lymphoblastic leukemia. Nat Genet 2004;36:1084-1089.
119. Cools J, DeAngelo DJ, Gotlib J, et al. A tyrosine kinase created by fusion of the PDGFA and FIP1L1 genes as a therapeutic target of imatinib in idiopathic hypereosinophilic syndrome. N Engl J Med 2003;348:1201-1214.
120. Charest A, Lane K, McMahon K, et al. Fusion of FIG to the receptor tyrosine kinase ROS in a glioblastoma with an interstitial del(6)(q21q21).

121. Irish JM, Hovland R, Krutzik PO, et al. Single cell profiling of potentiated phospho-protein networks in cancer cells. *Cell* 2004;118:217-228).
122. Bardelli A, Parsons DW, Silliman N, et al. Mutational analysis of the tyrosine kinome in colorectal cancers. *Science* 2003;300:949-949.
123. Arteaga CL, Baselga J. Tyrosine kinase inhibitors: why does the current process of clinical development not apply to them? *Cancer Cell* 2004;5:525-31.
124. Rothenberg ML, Carbone DP, Johnson DH. Improving the evaluation of new cancer treatments: challenges and opportunities. *Nat Rev Cancer* 2003;3:303-9.
125. Paule B., Brion N. EGF receptors in urological cancer. Molecular basis and therapeutic involvements. *Ann Med Interne* 2003. 154: 448-456
126. Weber K.L., Doucet M., Price J.E. Renal cell carcinoma bone metastasis : epidermal growth factor receptor targeting. *Clin. Orthop* 2003: 415: S86-94
127. Tatsumi T., Herrem C.J., Olson W.C., Finke J.H., Bukowski R.M., Kinch M.R, Ranieri E., Storkus W. Disease stage variation in CD4+ and CD8+ T cell reactivity to the receptor tyrosine kinase EphA2 in patients with renal cell carcinoma. *Cancer Res* 2003. 63: 4481-4489.
128. Herrem C.J., Tatsumi T., Olson W.C., Finke J.H., Bukowski R.M., Zou M., Gooding W.E., Kinch M.R, Storkus W.
129. Latif Z., Watters A.D., Bartlett J.M., Underwood M.A., Aitchison M. Gen amplification and overexpression of HER-2 in renal cell carcinoma. *BJU Int.* 2002. 89: 5-9.

130. Oh R.R., Park J.Y., et al. Expression of HGF/ SF and Met protein is associated with genetic alterations of VHL gen in primary renal cell carcinomas. *APMIS* 110. 2002: 229-238.
131. Sweeney P., El-Naggar A.K., Lin S.H., Pisters I.L. Biological significance of c-met overexpression in papillary renal cell carcinoma. *J. Urol* 168: 51-55. 2002.
132. Nakamura T., Kanda S., Yamamoto K., Kohno T., Maeda K., Matsuyama T., Kanetake H. Increase in hepatocyte growth factor receptor tyrosine kinase activity in renal cell carcinoma cells is associated with increased motility partly through phosphoinositide 3-kinase activation. *Oncogene*.2001. 20. 7610-7623.
133. The Ron Proto-oncogene Product Is a Phenotypic Marker of Renal Oncocytoma. Rampino T, Gregorini M, Soccio G, Maggio M, Rosso R, Malvezzi P, Collesi C, Canton AD. *Am J Surg Pathol*. 2003 Jun;27(6):779-85
134. Expression of RON Proto-oncogene in Renal Oncocytoma and Chromophobe Renal Cell Carcinoma. Patton KT, Tretiakova MS, Yao JL, Papavero V, Huo L, Adley BP, Wu G, Huang J, Pins MR, Teh BT, Yang XJ. *Am J Surg Pathol*. 2004 Aug;28(8):1045-1050.
135. Parker A.S., Chevillie J.C., Janney C.A., Cerhan J.R. High expression levels of insulin –like growth factor-I receptor predict poor survival in among women with clear-cell renal cell.
136. Sulzbacher I., Birner P., Traxler M., Marberger M., Haitel A. Expression of platelet-derived growth factor alpha receptor is associated with tumor progression in clear cell renal cell carcinoma. *Am, J, Clin Pathol* 2003. 120: 107-112.

137. Huo L, Sugimura J, Tretiakova MS, Patton KT, Gupta R, Popov B, Laskin WB, Yeldandi A, Teh BT, Yang XJ. C-kit expression in renal oncocytomas and chromophobe renal cell carcinomas. *Hum Pathol.* 2005 Mar;36(3):262-8.