

Amplificación de oncogenes en cáncer de mama. Amplificación del oncogen *neu* en carcinomas y del gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-r) en un sarcoma filodes

M. TORROELLA,¹ L. SKOOG,² M. NORDENSKJOLD,³ C. LARSSON,³ y C. BYSTROM³

¹ Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología (INOR). Calle 29 y E, Vedado, Ciudad de La Habana, Cuba

² División de Citología Clínica, Departamento de Patología, Hospital Karolinska, S-10401, Estocolmo, Suecia

³ Departamento de Genética Clínica, Hospital Karolinska, S-10401, Estocolmo, Suecia

Recibido en junio de 1990

Aprobado en enero de 1991

RESUMEN

En el presente trabajo se aborda el estudio de 51 tumores primarios humanos de la mama, con el objeto de conocer si existen patrones de amplificación o de reordenamiento en nueve genes de factores de crecimiento o de sus receptores, algunos de los cuales son oncogenes. Los resultados obtenidos mediante la técnica del Southern blot evidenciaron amplificación grosera del oncogen *neu* en 6 de 42 carcinomas y del gen del EGF-r en un sarcoma filodes. Se verificó el polimorfismo del gen del EGF-r reportado con la enzima Bgl II. No se encontraron evidencias de alteraciones en ninguno de los restantes genes estudiados (EGF, TGF *alpha*, PDGF-A, PDGF-B, PDGF-R, IGF-I, IGF-II). Se discute el papel de la amplificación de los oncogenes en el desarrollo de las neoplasias.

SUMMARY

In the present work we attempted the study of 51 primary human breast tumors with the aim of knowing if any specific gene amplification or gene rearrangement patterns existed in nine growth factor or growth factor receptor genes, some of which are known to be oncogenes. Results obtained using Southern blot technique showed gross amplification of *neu* oncogene in 6 out of 42 carcinomas, and of the

EGF-r gene in a phyllodes sarcoma. The reported EGF-r gene polymorphism with the restriction enzyme Bgl II was verified. Evidences of alterations were not found in the rest of the studied genes (EGF, TGF *alpha*, PDGF-A, PDGF-B, PDGF-R, IGF-I, IGF-II). The role of oncogene amplification in the development of neoplasia is discussed.

INTRODUCCION

El cáncer de mama es el tumor maligno más frecuente en las mujeres y continúa siendo una de las principales causas de muerte por cáncer en este sexo (Parkin *et al.*, 1984). Los factores de crecimiento y sus receptores están involucrados en la regulación de la proliferación celular, y diversos hallazgos recientes sugieren la idea de que pueden también estar desempeñando un papel clave en la oncogénesis (Heldin y Westmark, 1984; Spandidos, 1985). Entre los oncogenes identificados se conocen, al menos, cuatro relacionados con los factores de crecimiento o con sus receptores: la cadena B del factor

de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) está codificada por el proto-oncogen *c-sis*, el producto del oncogen *erbB-1* es una forma truncada del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-r), el proto-oncogen *c-fms* es el gen que codifica para el receptor del factor estimulador de colonias de macrófagos, y más recientemente se ha sugerido que el proto-oncogen *c-erbB-2* (oncogen *neu*) pueda estar codificando para un receptor de factor de crecimiento de estructura análoga a la del EGF-r, pero de ligando aún desconocido (Coussens *et al.*, 1985).

Existen proto-oncogenes amplificados en una variedad de cánceres humanos y de líneas celulares procedentes de los mismos (Alitalo, 1985), y de hecho se plantea que la amplificación génica constituye uno de los mecanismos de activación de proto-oncogenes en oncogenes (Alitalo, 1985). Los tumores mamarios forman un grupo heterogéneo de neoplasias y en ellos se ha reportado la amplificación o el reordenamiento de diferentes genes (Slamon *et al.*, 1987; Van de Vijver *et al.*, 1987, Szepetowski *et al.*, 1989, Tavassoli *et al.*, 1989).

Existen evidencias de la existencia en el cáncer de mama de un sistema de control autocrino del crecimiento tumoral, que parece funcionar a través de la secreción por las células malignas de factores de crecimiento que actuarían sobre receptores específicos del propio tumor (Macías *et al.*, 1987). En el presente trabajo, y con el objeto de conocer si existe algún patrón específico de amplificación génica en el cáncer mamario humano, se acometió el estudio de 51 tumores primarios de la mama mediante la técnica del Southern blot (Southern, 1975), usando una batería de nueve sondas de genes de factores de crecimiento o de sus receptores, algunos de los cuales son oncogenes.

MATERIALES Y METODOS

Muestras de tejidos humanos

Se procesaron muestras de tumores humanos de mama, procedentes de 50 mujeres (entre 22 y 87 años de edad) y de un hombre (de 53 años de edad). Todos los tumores fueron resecados quirúrgicamente previamente a la irradiación o a la quimioterapia, y fueron congelados a -70°C por períodos entre 1 mes y 5 años antes de la extracción de ADN. Como fuentes de ADN control se usaron leucocitos humanos de una mujer sana y la línea celular A431, que tiene como origen un carcinoma epidermoide de vulva humano, y que presenta amplificación del gen del EGF-r (Ullrich *et al.*, 1984).

Obtención de ADN de alto peso molecular

Para la obtención de ADN de alto peso molecular, se procedió según el método descrito por Lundberg *et al.* (1987), que consiste, en esencia, en lo siguiente: la muestra congelada del tumor se homogeneiza durante no más de dos segundos en 1-2 ml de tampón de lisis (24 mM ácido etilendiamino tetracético, EDTA, 75 mM NaCl) con la ayuda de un homogeneizador de cuchillas de alta velocidad (Polytron). El homogeneizado del tumor se digiere con 1 mg de proteinasa K (Boehringer) en presencia de dodecyl sulfato de sodio, SDS, 1 % por no más de seis horas a temperatura ambiente, después de lo cual se procede a dos extracciones con fenol y dos extracciones con cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y a la precipitación del ADN con la adición de 1/10 del volumen de NaAcO 3 M y dos volúmenes de etanol frío.

El ADN de alto peso molecular obtenido se "pesca" con una pipeta Pasteur de punta sellada y se disuelve en 2 ml de solución Tris 10 mM, EDTA 1 mM pH 8, con rotación suave a temperatura ambiente durante 24 horas. Una vez disuelto el ADN, éste puede reprecipitarse y redisolverse, lo que garantiza una mayor pureza a la muestra, pero también puede disminuir el rendimiento. El ADN disuelto se conserva a 4°C .

Hibridación Southern

Antes de proceder a las digestiones con enzimas de restricción, las muestras de ADN se cuantifican cuidadosamente, tanto por espectrofotometría como por fluorescencia a ultravioleta en geles de agarosa en presencia de estándares de concentración conocida. Para las digestiones de restricción se

emplearon 7 μ g de ADN con las enzimas Bgl II y Taq I en presencia de espermidina 2 mM (Sigma). La calidad de las digestiones se controló mediante digestiones paralelas de ADN de fago *lambda* en presencia de alícuotas de las digestiones humanas controladas, y comprobando mediante electroforesis en geles de agarosa 1 % el patrón de bandas de *lambda* esperado con cada enzima.

Un patrón de *lambda* adecuado es interpretado como que la muestra humana correspondiente ha sido bien digerida (Lundberg *et al.*, 1987). Una vez verificadas las digestiones, estas fueron corridas en electroforesis en geles de agarosa 1% a 30 V en tampón Tris-Acetato. Los geles fueron posteriormente tratados con HCl 0,74 % durante 10 minutos para eliminar las purinas del ADN, y a continuación fueron pasados a NaOH 0,4 M/NaCl 0,6 M (20 minutos, dos cambios) para desnaturalizar el ADN. La transferencia Southern se hizo en este mismo tampón alcalino hacia membranas de nailon Gene Screen Plus (New England Nuclear). Los filtros se prehibridaron en bolsas plásticas conteniendo 6x de solución estándar de tricitrato, 10x Denharts, 1% SDS y 100 μ g/ml de ADN de esperma de salmón, durante 16 horas a 42°C.

La hibridación se hizo en 50% formamida, 5% sulfato de dextrana, 6x de solución estándar de tricitrato, 1% SDS y 100 μ g/ml de ADN de esperma de salmón en las mismas condiciones. Las sondas génicas fueron marcadas radioactivamente con *alfa* 32 P-dATP por medio de la técnica de "cebadores al azar" (*random priming*, Feinberg y Vogelstein, 1983). Las membranas fueron lavadas en solución 2x estándar de tricitrato/0,1 % SDS una vez a temperatura ambiente y en solución 0,1x solución estándar tricitrato/0,1% SDS (dos veces de 15 minutos cada una a temperatura ambiente y dos veces de 30 minutos cada una a 65°C) y se expusieron en autorradiografías con pantallas amplificadoras Dupont Cronex, por un tiempo máximo de 12 días.

Las sondas hibridadas fueron removidas de las membranas de nailon mediante tratamiento con álcali, y estas fueron rehibridadas repetidamente con las diferentes sondas génicas. Cuando se sospechó amplificación génica, la membrana fue rehibridada con otra sonda de un gen en el mismo cromosoma, para excluir la duplicación cromosómica. Sólo se registraron las amplificaciones groseras. También se

verificó la aplicación de iguales cantidades de ADN en todas las carrileras de los geles por hibridación de las membranas a sondas de genes polimórficos de distintos cromosomas.

Sondas génicas usadas

Se usaron 9 sondas c-ADN de genes humanos de factores de crecimiento o de receptores de los mismos: factor de crecimiento epidérmico, EGF (Murray *et al.*, 1986), receptor del factor de crecimiento epidérmico, EGF-r (Lieberman *et al.*, 1985); factor transformante *alfa*, TGF-*alfa* (Murray *et al.*, 1986b); factor de crecimiento derivado de plaquetas, cadena A, PDGF-A (Betsholtz, 1986); factor de crecimiento derivado de plaquetas, cadena B, PDGF-B o *sis* (Julier *et al.*, 1985); receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas, PDGF-R (Claesson-Welsh*); factores insulinoideos tipos I y II (Jansen *et al.*, 1983 y Bell *et al.*, 1984, respectivamente), y c-erbB-2 o *neu* (Coussens *et al.*, 1985).

Para el control de las cantidades de ADN aplicadas en los filtros se usó la sonda RW45, marcador anónimo polimórfico del cromosoma 18, que da polimorfismos del tipo VNTR con Bgl II y Taq I (Lundberg *et al.*, 1987). Para el control de la amplificación de los genes EGF-r y *neu* se usaron los marcadores metH en el cromosoma 7 y PYNH37.3 en el cromosoma 17, respectivamente (Lundberg *et al.*, 1987).

RESULTADOS Y DISCUSION

En total fueron estudiados 51 tumores primarios de la mama, de los cuales 42 fueron carcinomas, 4 sarcomas filodes y 5 fibroadenomas benignos. Los carcinomas resultaron principalmente tumores estadio II del tipo histológico ductal invasivo. Se estudió la amplificación y/o el reordenamiento de nueve genes de factores de crecimiento y/o sus receptores en las muestras de ADN procedentes de esos tumores, digeridas con enzimas Bgl II o Taq I.

* Comunicación personal

No se encontraron pruebas de amplificación génica ni de reordenamiento en los genes EGF, TGF-*alfa*, PDGF-B(*sis*), PDGF-R, IGF-I ni IGF-II (no se muestran las autorradiografías). Las señales de hibridación con la sonda RW45 confirmaron que todas las membranas contenían las mismas cantidades de ADN (figura 1). Se encontraron evidencias de amplificaciones groseras del oncogen *neu* en 6 de los 42 carcinomas estudiados (figura 2).

Se verificó el polimorfismo descrito para el gen del EGF-r con la enzima Bgl II (Biunno *et al.*, 1988) en el cual aparecen dos bandas polimórficas de 10,6 y 9,4 kb, además

de las cuatro bandas constantes de menores tallas. Adicionalmente, uno de los cuatro sarcomas filodes incluidos en nuestro estudio mostró una fuerte amplificación del gen del EGF-r (figura 3). La línea celular A431 mostró su esperado patrón de amplificación del EGF-r (figura 4). Los controles de los cromosomas 7 y 17 demostraron que se trataba de amplificaciones de los genes EGF-r y *neu*, y no de duplicaciones de los respectivos cromosomas (autorradiogramas no mostrados).

El estudio de la amplificación de oncogenes en tumores humanos constituye en el presente un campo de trabajo muy frecuentado. Es atractivo suponer

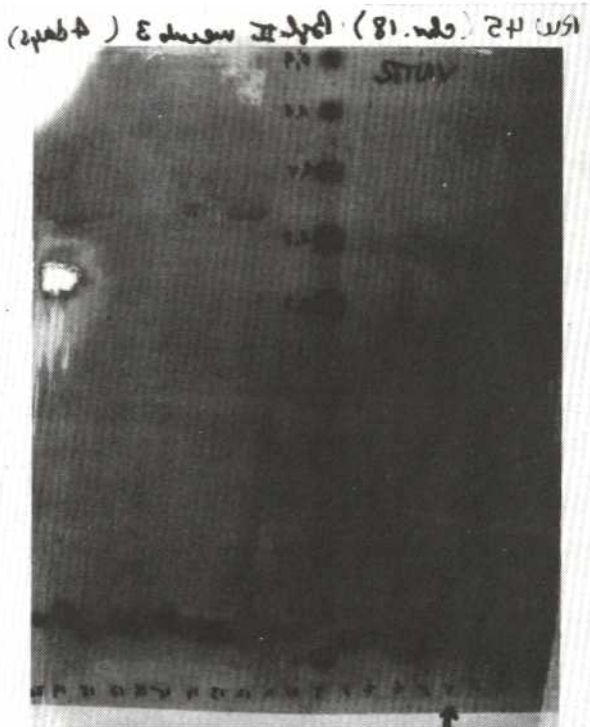


FIG. 1. Hibridación con sonda RW45 (crom. 18) de membrana con muestras de ADN tumorales digeridas con la enzima Bgl II. Se trata de la misma membrana de la figura 3, en la cual aparece en la carrilera 4 la muestra del tumor filodes con amplificación del gen EGF-r. Obsérvese que todas las carrileras contienen cantidades aproximadamente iguales de ADN. Los números expresan las tallas de las bandas en kilobases.

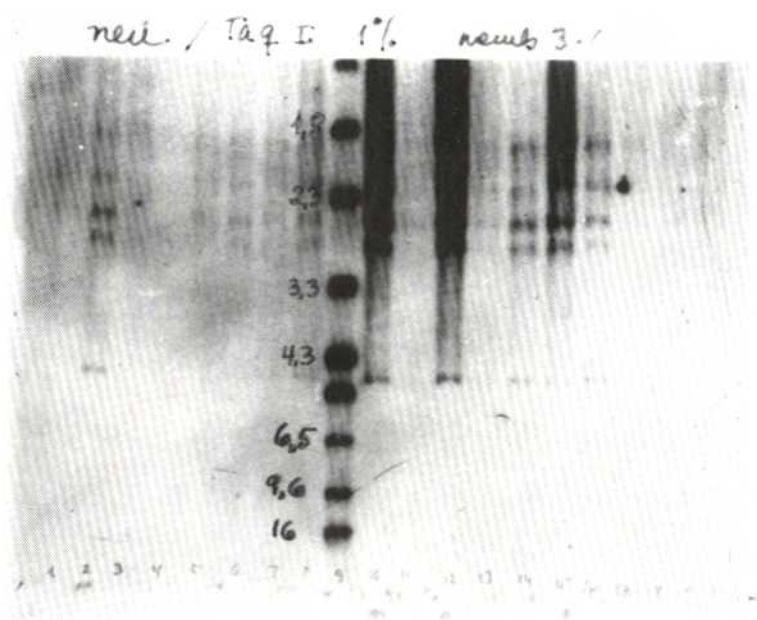


FIG. 2. Amplificación del oncogen *neu* en carcinomas ductales de mama. Cada carrilera tiene 7 μ g de ADN tumoral digeridos con la enzima Taq I. Obsérvense tres muestras (carrileras 10, 12 y 15) con el gen groseramente amplificado. Los números expresan las tallas de las bandas en kilobases.

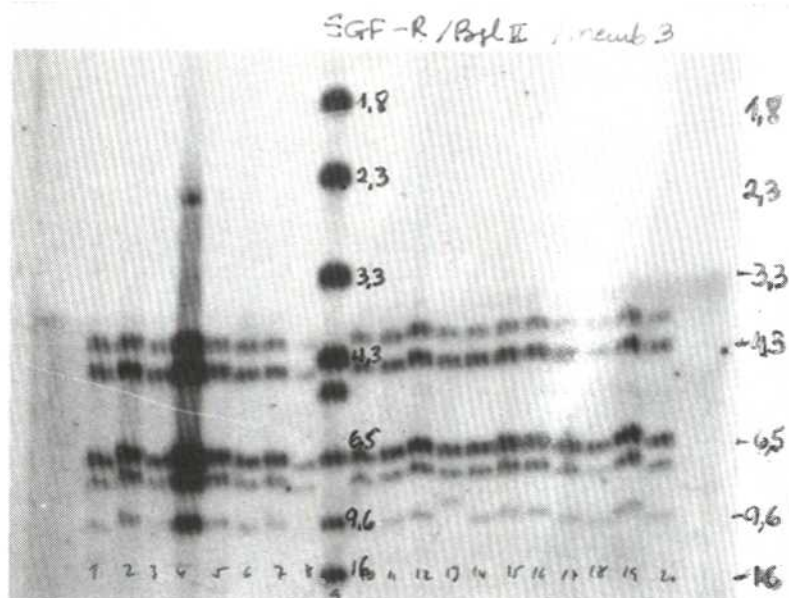


FIG. 3. Amplificación del gen EGF-r en un sarcoma filodes (carrilera 4). Cada carrilera tiene 7 μ g de ADN tumoral digeridos con enzima Bgl II. Obsérvese el polimorfismo del gen con esta enzima en las bandas de menor talla. Los números expresan las tallas de las bandas en kilobases.

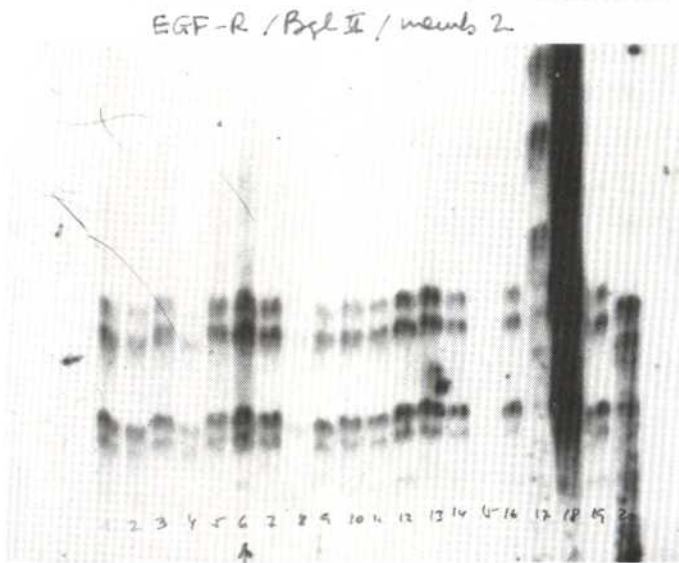


FIG. 4. Amplificación del gen EGF-r en la línea celular A431 (carrilera 18). Cada carrilera tiene 7 μ g de ADN tumoral digeridos con enzima Bgl II.

que conociendo los patrones específicos de comportamiento que pudieran tener en ciertos tumores algunos genes vitales para la célula, como son los oncogenes; se podría "asociar" oncogenes con tumores, atribuyendo a ciertas neoplasias la etiología de determinadas funciones celulares alteradas. Hay un hecho que parece bastante claro derivado de los resultados preliminares reportados por diversos autores, y es el hallazgo de que la amplificación de oncogenes en general no es un evento ni frecuente ni necesario en el desarrollo de un cáncer, por cuanto la mayoría de los tumores humanos no tienen amplificación de oncogenes (Szepetowski *et al.*, 1989).

Sin embargo, una vez que ocurre la amplificación, como evento al azar que es, si afectara a un gen de control de la proliferación o de la diferenciación celulares, el suceso podría conferirle a la

célula neoplásica determinadas ventajas para su propia sobrevivencia y desarrollo, al aumentar descontroladamente el número de copias de la proteína codificada por el gen, modificando así el comportamiento biológico del tumor, haciéndolo más agresivo. De esta manera, la amplificación génica pudiera convertirse así en un marcador de la progresión tumoral, que ocurre tardíamente en el desarrollo de una neoplasia, y que, sin ser condición para su génesis, puede conferirle mayor autonomía en su progresión.

Esto es precisamente lo que ha sido reportado con relación a la amplificación de oncogenes en cáncer humano. Así, la amplificación de N-myc se ha asociado con una progresión rápida en casos de neuroblastomas (Masuda *et al.*, 1987). Igualmente, la amplificación de c-myc se

relaciona con el mal pronóstico en el carcinoma de células pequeñas de pulmón (Mc Guire *et al.*, 1987).

En cuanto a cáncer de mama, la relación más frecuentemente encontrada ha sido la de la amplificación del oncogen *neu* y el mal pronóstico del tumor (Slamon *et al.*, 1987). En nuestros resultados, de 9 genes estudiados, sólo en dos de ellos, encontramos amplificación, *neu* y EGF-r, y en un bajo número de tumores. Con una muestra de 51 neoplasias de la mama, de las cuales 42 eran carcinomas, encontramos seis casos de carcinomas ductales con una amplificación grosera de este gen (14 %), porcentaje que coincide con el reportado en la literatura para la amplificación grosera de este oncogen en cáncer de mama (Slamon *et al.*, 1987).

Es interesante señalar que de estos seis casos con amplificación de este gen, cinco tuvieron un desarrollo muy agresivo y rápido de la enfermedad, y el restante tenía valores de los receptores de estrógeno y progesterona negativos, indicativos de un mal pronóstico del caso, aunque aún la paciente no había presentado recaída cuando se confeccionó este trabajo (Skoog*). También es importante señalar que en los restantes casos, en los cuales no hubo evidencias de amplificación de este oncogen, uno tuvo una evolución muy agresiva.

Los carcinomas constituyen la gran mayoría de los cánceres de mama; sin embargo, los tumores de tipo filodes son una variedad muy rara y agresiva de sarcomas de la mama (Skoog*) cuya biología molecular no ha sido estudiada. Parece relevante que en una muestra tan pequeña como lo son cuatro filodes, se

encuentre un claro signo de amplificación del gen del EGF-r en uno de ellos. Nuestro hallazgo de una amplificación del EGF-r no en un carcinoma epidermoide, sino en un sarcoma, coincide con reportes* previos (Gusterson *et al.*, 1985), y sugiere que la amplificación de este gen no es exclusiva del epitelio escamoso malignizado.

Sería interesante ampliar el estudio con un número mayor de casos de este raro tipo de tumor mamario, para confirmar si existe algún patrón específico de amplificación génica ligado al sarcoma filodes. De todos modos, el significado de la amplificación génica en el desarrollo de un cáncer está lejos de ser comprendida aún. Los resultados encontrados son heterogéneos y contradictorios (Tavassoli *et al.*, 1989). Queda abierta la posibilidad, sin embargo, de explotar la ocurrencia de este evento genético tumoral en el manejo clínico de los pacientes con neoplasias malignas.

Independientemente de que comprendamos o no aún la verdadera esencia del fenómeno, el hecho práctico de que la amplificación de oncogenes en tumores pueda funcionar como un potente marcador molecular del mal pronóstico de un tumor individual, abre enormes perspectivas en la clínica oncológica. Esto es ya una realidad en el caso de algunos oncogenes en ciertas neoplasias, como es el caso del oncogen *neu* en cáncer de mama, que actualmente es considerado por muchos autores como el marcador pronóstico más potente en esta localización después de la presencia de ganglios metastásicos (Guerin *et al.*, 1989, Tavassoli *et al.*, 1989).

*Comunicaciones personales

REFERENCIAS

- ALITALO, K. (1985). Amplification of cellular oncogenes in cancer cells. *Trends in Biochemical Sciences* 10: 194-197.
- BELL, G. I.; J. P. MERRYWEATHER; R. SÁNCHEZ-PESCADOR; M. M. STEMPIEN; L. PRIESTLEY; J. SCOTT y L. B. RALL (1984). Sequence of a cDNA clone encoding human preproinsulin-like growth factor II. *Nature* 310: 775.
- BETSHOLTZ, C.; A. JOHNSON; C. H. HELDIN; B. WESTMARK; P. LIND; M. S. URDEA; R. EDDY; T. B. SHOWS; K. PHILPOTT; A. L. MELLOR; T. J. KNOTT y J. SCOTT (1986). c-DNA sequence and chromosomal localization of human platelet derived growth factor A-chain and its expression in tumor cell lines. *Nature* 320: 695-699.
- BIUNNO, I.; M. R. POZZI; P. MONDINI; M. A. PIEROTTI; J. HALEY; M. D. WATERFIELD y G. DELLA PORTA (1988). Bgl II polymorphism of the Epidermal Growth Factor (EGF-r) gene. *Nucleic Acid Research* 16: 7753-7758.
- COUSSENS, L.; T. L. YANG-FENG; Y. C. L. ELLSON CHEN; A. GRAY; J. Mc GRATH; P. H. SEEBURG; T. A. LIBERMANN; J. SCHLESSINGER; U. FRANCKE; A. LEVISON y A. ULLRICH (1985). Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with *neu* oncogene. *Science* 230: 1132-1139.
- FEINBERG, A. P. y B. VOGELSTEIN (1983). A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochemistry* 132: 6-13.
- GUERIN, M.; M. GABILLOT; M. C. MATHIEU; J. P. TRAVAGLI; M. SPIEGELMAN; N. ANDREU y G. RIOU (1989). Structure and expression of *c-erbB2* and EGF-r genes in inflammatory and non inflammatory breast cancer prognostic significance. *Int. J. Cancer* 43: 201-208.
- GUSTERSON, B.; G. COWLEY; J. Mc ILHINNEY; B. OZANNE; C. FISHER y B. REEVES (1985). Evidence for increased epidermal growth factor receptors in human sarcomas. *Int. J. Cancer* 36: 689-693.
- HELDIN, C. H. y B. WESTMARK (1984). Growth factors: mechanism of action and relation to oncogenes. *Cell* 37: 9-20.
- JANSEN, M.; F. M. A. VAN SCHAIK; A. T. RICKER; B. BULLOCK; D. E. WOODS; K. H. GABBAY; A. L. NUSSBAUM; J. S. SUSSENBACH; J. L. VAN DEN BRANDE (1983). Sequence of cDNA encoding human insulin-like growth factor I precursor. *Nature* 306: 609-618.
- JULIER, C.; M. LATHROP; J. M. LALOUEL; A. REGHIS; M. F. SZAJNERT y J. C. KAPLAN (1985). New restriction fragment length polymorphism on human chromosome 22 at loci *sis*, *MB* and *IGLV*. *Cytol. Cell Genet.* 40: 664-667.
- LIBERMANN, T. A.; H. R. NUSSBAUM; N. RAZON; R. KRIS; I. LAX; H. SOREF; N. WHITTLE; M. D. WATERFIELD; A. ULLRICH y J. SCHLESSINGER (1985). Amplification and overexpression of the EGF receptor gene in primary human glioblastomas. *Cell Sci. Suppl.* 3: 161-172.
- LUNDBERG, C.; L. SKOOG; W. K. CAVENEE y M. NORDESNSKJOLD (1987). Loss of heterozygosity in human ductal breast tumors indicates a recessive mutation in chromosome 13. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 2372-2376.
- MACÍAS, A.; R. PEREZ; T. HAGERSTROM y L. SKOOG (1987). Identification of transforming growth factor alpha in human primary breast carcinomas. *Anticancer Res.* 7: 1271-1276.
- MASUDA, H.; H. BATTIFORA; J. YOKOTA; S. MELTZER y M. J. CLINE (1987). Specificity of proto-oncogene amplification in human malignant diseases. *Molec. Biol. Med.* 4: 213-227.
- Mc GUIRE, W.; B. E. JOHNSON; R. C. SEEGER y D. J. SLAMON (1987). Oncogenes in clinical cancer. A panel discussion. *Breast Cancer Research and Treatment* 10: 217-227.
- MURRAY, J. C.; C. R. DE HAVEN y G. I. BELL (1986). RFLPs for Epidermal Growth Factor, a single copy sequence at 4q25-4q27. *Nucleic Acid Res.* 14: 223-230.
- MURRAY, J. C.; K. H. BUETOW y G. I. BELL (1986b). RFLPs for transforming growth factor alpha gene at 2p13. *Nucleic Acid Res.* 14: 334-338.
- PARKIN, D. M.; J. STJERNESWARD y C. S. MUIR (1984). Estimates of the worldwide frequency of twelve major cancers. *Bull. W.H.O.* 62: 163.
- SLAMON, D. J.; G. M. CLARK; S. G. WONG; W. J. LEVIN; A. ULLRICH y W. L. McGUIRE (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the *HER-2 neu* oncogene. *Science* 235: 177-182.

- SPANDIDOS, D. A. (1985). Mechanisms of carcinogenesis: the role of oncogenes, transcriptional enhancers and growth factors. *Anticancer Res.* 5: 485-498.
- SZEPETOWSKI, P., J. ADNANE; M. P. SIMON; D. BIRBAUM; C. THEILLET y P. GAUDRAY (1989). "Protooncogene amplification in human breast cancer: Study of an amplicon located on 11q13." *Abstracts of papers presented at the Fifth Annual Meeting on Oncogenes, June 27-July 1, Hood College, Frederick, Maryland, USA.*
- TAVASSOLI, M.; F. FARZANEH y N. KIRKHAM (1989). "c-erbB2- erbA coamplification indicative of lymph node metastasis in human breast cancer." *Abstracts of papers presented at the Fifth Annual Meeting on Oncogenes, June 27-July 1, Hood College, Frederick, Maryland, USA.*
- ULLRICH, A.; L. COUSSENS; J. S. HAYFLICK; T. J. DULL; A. GRAY; A. W. TAM; J. LEE; Y. YARDEN; T. A. LIBERMANN; J. SCHLESSINGER; J. DOWNWARD; E. L. V. MAYES; N. WHITTLE; M. D. WATERFIELD y P. H. SEEBURG (1984). Human EGF-r cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* 309: 418-425.
- VAN DE VIVJER M.; R. DE BERSSELAR; P. CORNELISSE; J. PETERSE y R. NUSSE (1987). Amplification of the *neu* (cerbB2) oncogene in human mammary tumors is relatively frequent and is often accompanied by amplifications of the linked c-erbA oncogene. *Molec. and Cell. Biology* 345: 2019-2023.