



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA



Facultad
de Farmacia
Conocimiento al servicio de la salud

***Estudio de las alteraciones de Adenomatous
Polyposis Coli (componente de la vía de
señalización Wnt), en cáncer cervico uterino***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN FARMACIA

PRESENTA:

M. en F. ERICK AYALA CALVILLO

DIRECTOR DE TESIS

DRA. LETICIA GONZÁLEZ MAYA

CUERNAVACA, MORELOS

NOVIEMBRE 2018



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA



El presente proyecto de tesis se desarrolló en el laboratorio 7 de Diagnóstico Molecular de la Facultad de Farmacia de la UAEM, bajo la asesoría de la Dra. Leticia González Maya. Agradezco el apoyo financiero otorgado por CONACYT (1715661).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA



DEDICATORIA

Esta tesis la dedico a las tres personas más importantes... mis amados hijos Emiliano y Erick, y a mi compañera de vida Grace Ixchel.



ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
I. ANTECEDENTES	4
1.- CÁNCER	5
1.1.-CARACTERÍSTICAS DEL CÁNCER	6
1.2.-Biología Molecular del Cáncer; ¿Origen?	8
1.2.1.-Alteraciones genéticas	8
1.2.2.-Alteraciones epigenéticas	11
2.- CÁNCER CÉRVICO UTERINO Y VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO	16
2.1.- Historia	18
2.2.- La infección del HPV para el desarrollo del CaCu	18
2.3.- Papel de los genes E6 y E7 del HPV en el desarrollo del CaCu	21
3.- VÍA DE SEÑALIZACIÓN WNT	22
3.1.- β -Catenina; componente principal de la vía Wnt	23
3.1.1.- Estructura proteica de β -catenina, interacción y regulación	24
3.2.- APC; componente del complejo regulador de β -Catenina	26
3.2.1.- Estructura proteica de APC, interacción y regulación	26
3.2.2.- Región promotora del gen APC	28
4.- CÁNCER Y VÍA DE SEÑALIZACIÓN WNT	30
4.1.- Alteraciones genéticas en componentes de la vía WNT	30
4.2.-Alteraciones epigenéticas en componentes de la vía WNT	32
4.3.-Cáncer cérvico uterino y alteraciones en la vía WNT	33
II. JUSTIFICACIÓN	38
III. HIPÓTESIS	41
IV. OBJETIVOS	43
V. METODOLOGÍA	44
1.- MUESTRAS DE ESTUDIO	45
2.-PROCEDIMIENTOS GENERALES	46
2.1.Cultivo celular	46
2.2.-Obtención y purificación de ADN-genómico y ARN's totales	47
3.- TÉCNICAS PARA DETERMINAR ALTERACIONES GENÉTICAS	47
3.1.-Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	47
3.2.-Purificación y análisis de digestión a fragmentos amplificados	49
3.3.-Análisis mutacional	49



FACULTAD DE FARMACIA

4.- TÉCNICAS PARA DETERMINAR ALTERACIONES EPIGENÉTICAS	50
4.1.-Análisis de metilación específica por PCR (MSP)	50
4.2.-RT-PCR (semicuantitativa)	51
4.3.- Tratamiento con 5-aza-2'-deoxycytidine/trischostatin-A (DAC/TSA)	52
4.4.- RT-PCR (semicuantitativa) con/sin DAC-TSA	54
5.- TÉCNICAS PARA ESTABLECER LA CORRELACIÓN ENTRE LAS ALTERACIONES DEL APC Y LA REGULACIÓN DE LA VIA WNT	55
5.1.- Western-blot (W.B.)	55
5.2.- Inmunohistoquímica	56
5.3.- RT-PCR (semicuantitativa)	57
VI. RESULTADOS	58
1.- IDENTIFICACIÓN DE POSIBLES ALTERACIONES EN LA SECUENCIA DE LA REGIÓN DE MUTACIONES “CLUSTER” (MCR) DEL GEN APC, EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER CÉRVICO UTERINO	59
1.1.- Evaluación del ADN genómico de las líneas celulares	59
1.2.-Amplificación y digestión de la secuencia (ubicada en la región MCR) del gen APC	59
1.3.- Secuenciación, análisis y comparación de la secuencia (ubicada en la región MCR) del gen APC	61
2.- DETERMINAR LA HIPERMETILACIÓN DEL ADN EN EL PROMOTOR 1A Y EVALUAR SU EFECTO EN LA EXPRESIÓN DEL GEN APC, EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER CÉRVICO UTERINO	64
2.1.- Hipermetilación del ADN en el promotor 1A en líneas celulares	64
2.2.- Expresión de APC en líneas celulares	66
2.3.- Expresión de APC en líneas celulares tratadas con inhibidores de DNA metiltransferasas y desacetilasas de histonas	68
3.- ESTABLECER LA POSIBLE CORRELACIÓN ENTRE LA ALTERACIÓN DEL GEN APC Y LA REGULACIÓN DE B-CATENINA EN CÁNCER CÉRVICO UTERINO	70
3.1.- Expresión y localización de β -catenina en líneas celulares tratadas con los inhibidores DAC y TSA	70
3.2.- Expresión genes blancos del complejo β -catenin/TCF en líneas celulares tratadas DAC y TSA	72
VII. Discusión	75
VIII. Conclusiones	86
IX. Perspectivas	88
X. Bibliografía	90
XI. Anexos	109
ARTICULO PUBLICADO DE TESIS DOCTORAL	



ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Lista de figuras	
	Página
Figura 1. Características (Hallmarks; “sellos de identidad”) del cáncer	7
Figura 2. Alteraciones epigenéticas en cáncer	15
Figura 3. Cancer cervico uterino	17
Figura 4. Organización del genoma de VPH.	19
Figura 5. ciclo del virus de papiloma humano en el epitelio estratificado del cuello uterino	20
Figura 6. Efectos de las onco-proteínas E6 y E7 de los VPH de “alto riesgo” en números procesos celulares (vías de señalización)	21
Figura 7. Vía de señalización Wnt	23
Figura 8. Estructura proteica de β -catenina; regulación/interacción	24
Figura 9. Estructura proteica de APC; regulación/interacción. APC.	27
Figura 10. Regiones promotoras del gen APC; 1A y 1B	29
Figura 11. Mutaciones germinales y somáticas de APC en cáncer de colon.	31
Figura 12. Amplificación del fragmento localizado en la región MCR del gen APC.	60
Figura 13. Digestión del amplificado y esquema del patrón de digestión; fragmento localizado en la región MCR del gen APC. A)	61
Figura 14. Alineación de la secuencia del fragmento amplificado y secuenciado con la reportada por la base de datos NCBI	63
Figura 15. Análisis mutacional en la región MCR del gen APC.	64
Figura 16. Metilación del promotor 1A del gen APC en líneas de cáncer de cérvix.	65
Figura 17. Metilación del promotor 1A del gen APC en biopsias de cáncer de cérvix.	66
Figura 18. RT-PCR de transcritos del gen APC (exón 15; productos del promoter 1A y 1B.	67
Figura 19. Nivel de transcritos del gen APC (exón 15) en las distintas muestras.	68
Figura 20. Análisis de la re-expresión del gen APC por efecto del tratamiento con inhibidores del silenciamiento transcripcional.	69
Figura 21. Niveles proteicos de β -catenina en líneas celulares de cáncer de cérvix.	71
Figura 22. Localización celular de β -catenina en líneas celulares.	72
Figura 23. Análisis de la expresión de genes blancos de la vía WNT.	73

Lista de tablas	
	Página
Tabla 1. Muestras de estudio; líneas de cáncer cérvico uterino	45
Tabla 2. Componentes y concentraciones de una reacción de PCR.	48
Tabla 3. Secuencia de primers para RT-PCR.	57



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA





RESUMEN

El cáncer cérvico uterino (CaCu) es la segunda causa de muerte por tumores malignos en mujeres en México y a nivel mundial. Además, las infecciones persistentes por los VPH de “alto riesgo”, considerados oncogénicos son el factor más significativo o necesario, pero no suficiente para promover la transformación maligna de células del cervix. Distintos estudios, asocian frecuentemente la activación anormal de la vía Wnt (acumulación de β -catenina) con alteraciones en el gen supresor tumoral *adenomatous polyposis coli* (APC), en varios tipos de tumores. En este sentido, se ha observado en biopsias y líneas celulares de CaCu la deslocalización y acumulación citoplasmática/nuclear de β -catenina, sugiriendo su participación potencial en la transformación maligna. Por otra parte, aproximadamente, 80-90% de todas las mutaciones en el gen APC se localizan en el segmento MCR (“mutation cluster región”; codones 1286-1513), que dan lugar a una proteína truncada y sin la región de unión con β -catenina, lo que impide su reclutamiento y, posterior degradación. Asimismo, diferentes estudios han evidenciado que la hipermetilación de CpG’s en la región promotora del gen APC es otro mecanismo de inactivación de su función en varios tipos de cáncer.

El presente trabajo plantea que la alteración en la región codificante o promotora del gen APC permite la acumulación citoplasmática/nuclear anormal de β -catenina y, por tanto, la expresión anormal de genes blanco de la vía Wnt en células de cáncer cervico uterino infectadas con HPV. Para confirmar esta hipótesis, verificamos la secuencia del segmento MCR y examinamos la hipermetilación en el promotor 1A del gen APC, en líneas celulares y biopsias de cáncer de cervix. Además evaluamos el efecto de la inactivación del gen APC dentro de la vía Wnt, determinando los niveles y la distribución intracelular de β -catenina (endógena) por WB e IHC, respectivamente. Así también determinando el nivel de expresión de genes blancos de la vía Wnt (complejo β -catenina/TCF) en las líneas celulares de cáncer cervico uterino.

Como resultado de este trabajo, el análisis de la secuencia MCR no mostró mutaciones que pudieran asociarse a una inactivación del gen APC, dentro de las líneas celulares HeLa (HPV tipo 18), CasKi (HPV tipo 16), SiHa (HPV tipo 16) y C33 (sin HPV’s) de cáncer



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA



cérvico uterino. Sin embargo, nuestros resultados parecen sugerir una asociación entre el estado de metilación del promotor 1A del gen APC y la localización anormal de β -catenina en líneas celulares y biopsias de carcinoma cervical infectadas por HR HPV16. Por otro lado, observamos en las células de cáncer cérvico uterino CaSki, con un estado de hipermetilación monoalelica (heterocigota) y disminución de los niveles de transcritos del gen APC. Por otro lado, posterior al tratamiento con DAC/TSA en las células CaSki, se confirmó un incremento en los niveles de expresión de APC, sugiriendo que la reducción de transcritos de APC fue resultado de una inactivación epigenética. Finalmente, después del tratamiento, en las células CaSki y la reactivación de transcritos de APC observamos la disminución en la acumulación/deslocalización de β -catenina y la expresión de los genes VEGF, MMP-7. Por todo lo anterior, el presente estudio sugiere que el silenciamiento dependiente de la metilación del promotor 1A del gen APC es un mecanismo que contribuye en la activación de la vía Wnt en células de cáncer cervicouterino infectadas con VPH16.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA



ABSTRAC

The cervical cancer is one of the most common malignancies in women worldwide. The persistent infection with oncogenic human papillomavirus (HPV) is the most significant cofactor in the development of this type of cancer. In other hand, aberrant activation of the Wnt/ β -catenin pathway is frequently associated to inactivation of the tumor suppressor *adenomatous polyposis coli* (APC) acting as a prominent oncogenic mechanism in several cancers. Furthermore, in previous studies with human cervical carcinoma samples we and others observed an abnormal accumulation/distribution on cell nuclei and mainly on cell cytoplasm of β -catenin, which constitute a hallmark of the activated Wnt pathway. Approximately 80-90% of all APC mutations are confined in codons 1286 to 1513, region known as *mutation cluster region* (MCR), which typically lead to a truncated protein without β -catenin binding and regulatory sites. Additionally, as different studies had reported the hypermethylation of CpG's in APC promoter 1A region could be an alternative mechanism of APC inactivation. is.

According to these observations, it was hypothesized that APC alterations in gen or expression regulation may lead to β -catenin deregulation and the abnormal expression of direct targets of the Wnt pathway in HPV-infected cervical cancer cells. To test this hypothesis, mutational and methylation status analyses of the APC gene and its promoter 1A, respectively, were performed. Finally, the impact of the APC mutation and/or its epigenetic silencing over the Wnt signalling were evaluated through the expression and localization of endogenous β -catenin and its target genes in cervical carcinoma cell lines.

In the present study, sequence analysis of the MCR did not exhibit genetic alterations that may be associated with APC gene inactivation. In addition, it was identified that there was a good correlation with the hypermethylation status of the APC promoter 1A and the abnormal accumulation of endogenous β -catenin in cell lines and biopsies infected with HPV16, although not HPV18. Removal of the epigenetic markers led to an increase in APC levels and a reduction of β -catenin expression in two transcriptional targets of the Wnt pathway: VEGF, MMP-7. The present study proposed that methylation-dependent silencing of the APC gene promoter 1A is a mechanism that contributes to the activation of Wnt signaling pathway in cervical cancer cells infected by high risk HPV16.



*Estudio de las alteraciones de Adenomatous Polyposis Coli;
(componente de la vía de señalización Wnt) en cáncer cervicovaginal.*

ANTECEDENTES



1.- CÁNCER.

Durante el día mundial contra el cáncer, celebrado el 4 de febrero del 2018, la Organización Mundial de Salud (OMS) reportó que el cáncer se ha convertido en un problema de salud pública en todo el mundo, no solo por sus graves manifestaciones clínicas y su alta letalidad, sino también por la gran variedad de factores de riesgo individuales y ambientales con los que se asocia. La OMS recalca que el cáncer no era considerado como una enfermedad común a mediados del siglo pasado. Hoy en día, sin embargo, a pesar de conocer más sobre la forma de prevenir y tratar el cáncer, cada año aumenta el número de personas que lo padecen y es la segunda causa de muerte en el mundo (OMS, 2018). Asimismo, el Instituto Nacional de Cancerología (INCan) reportó que, en México el cáncer ha aumentado su nivel de prioridad, al pasar de ser la sexta causa de mortalidad hace cuarenta años, a la tercera causa (sólo después de enfermedades cardiovasculares y endocrinas-metabólicas) (SSA-México, 2018).

El cáncer es un conjunto de patologías complejas, en donde, a través de un proceso de carcinogénesis se modifica una célula normal en una neoplásica. Cabe señalar que las características generales de los diferentes tipos de cáncer son: la formación de una masa tumoral, la desregulación de los procesos moleculares/celulares y el hecho de ser, generalmente, un desorden que se disemina a otros órganos en un proceso que da lugar a la metástasis (OMS, 2018). Esto se debe a que cada tipo de cáncer tiene su particular agente etiológico y mecanismo de desarrollo, por lo que el cáncer es una enfermedad compleja y a pesar de que es una de las más estudiadas, también es una de las menos comprendidas (Siegel R, et al, 2013).

Por esta razón existe un particular interés en el estudio de las causas y factores que provocan estas patologías, sobre todo a nivel molecular. En ese sentido, el presente estudio constituye un esfuerzo pertinente en el ámbito nacional, dado que pretende identificar moléculas blanco que puedan ser aplicadas en el diagnóstico o pronóstico de la patología, o incluso ser utilizadas con fines terapéuticos.



1.1. CARACTERÍSTICAS DEL CÁNCER.

A principios de la década pasada se postularon bases sólidas para comprender la extraordinaria diversidad biológica de las enfermedades neoplásicas; Hanahan D y Weinberg R (2000) discuten las posibles características (Hallmarks; “sellos de identidad”) que determinan la transformación de células normales a cancerígenas, comunes en los distintos tipos de cáncer.

1. Estimular su propio crecimiento (proliferative signaling).
2. Resistir señales inhibitorias de crecimiento (evading growth suppressors).
3. Resistir su propia muerte celular programada; apoptosis (resisting cell death).
4. Estimular el crecimiento de los vasos sanguíneos para el suministro de nutrientes (inducing angiogenesis).
5. Dividirse siempre (enabling replicative immortality).
6. Invadir y diseminarse a tejidos adyacentes y distantes (activating invasion and metastasis).

Durante el transcurso de la década pasada, el notable progreso en la elucidación del origen del cáncer, permitió a Hanahan D y Weinberg R (2011) aclarar y modificar el original postulado de las posibles características del cáncer (**Figura 1**). Se proponen 4 nuevas características:

1. Vías metabólicas anormales (reprogramming of energy metabolism).
2. Evadir el sistema inmunológico (evading immune destruction).
3. Inflamación (Tumor-promoting inflammation).
4. **Inestabilidad genómica y mutabilidad (Genomic instability and thus mutability).**

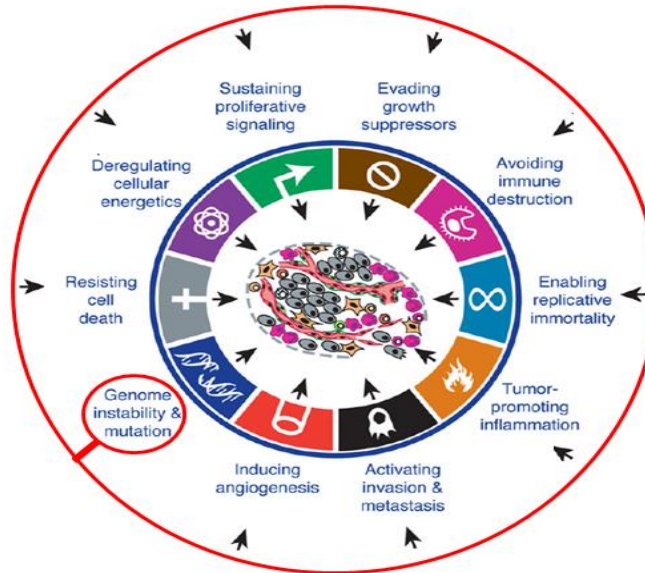


Figura 1. Características (Hallmarks; “sellos de identidad”) del cáncer. Esta ilustración abarca las seis características básicas (2000) y las nuevas propuestas por Hanahan D and Weinberg A (2011)

De las nuevas características mencionadas (Hallmarks), las tres primeras son propuestas para desarrollar un papel fundamental en la transformación de células normales a cancerígenas, y por tanto se podrían añadir a la lista de las características básicas (primeras Hallmarks). La primera consiste en una reprogramación importante del metabolismo energético con el fin de apoyar el crecimiento celular y la proliferación continua, reemplazando el programa metabólico que opera en la mayoría de los tejidos normales y la distribución fisiológica de nutrientes en células y tejidos cancerosos. La segunda se refiere a la evasión activa de las células del sistema inmune que atacan y eliminan células cancerosas. La tercera implica un proceso inflamatorio desde lesiones premalignas impulsado por las células del sistema inmune, que sirve para promover la progresión y transformación de células cancerosas.

Para finalizar, la última nueva característica (Hallmarks; “sellos de identidad”) propuesta es posiblemente la que permite adquirir todas las anteriores, y posiblemente el origen de los distintos mecanismos y procesos durante el curso del cáncer; la inestabilidad genómica y mutabilidad (Genomic instability and thus mutability) (Negrini S et al, 2010). En los últimos años, queda más claro que el origen molecular del cáncer son



alteraciones genéticas y epigenéticas en genes fundamentales para la homeostasis celular (discutidas anteriormente), que determinan cada una de las características del cáncer.

1.2. **BIOLÓGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER.**

El origen de cada tipo de cáncer está relacionado con un agente etiológico, en la mayoría de los casos, sin embargo, el proceso de carcinogénesis en los distintos tipos de cáncer consta de múltiples fases que conllevan la alteración de procesos celulares/moleculares, tales como el crecimiento celular, la quimiotaxis, la diferenciación, la supervivencia y la muerte, controlados por la acción concertada de un conjunto de genes. En ciertas condiciones, las alteraciones genéticas y/o epigenéticas de este conjunto de genes, denominados oncogenes y genes supresores de tumores, resulta en dicho proceso patológico (Podlaha O, et al, 2012; Timp W, et al, 2013; Vogelstein B, et al, 2013).

1.2.1 **Alteraciones genéticas:**

Desde hace décadas fue establecida la asociación entre el desarrollo y/o presencia de alteraciones genéticas y el cáncer (Fisher J, 1958). Una célula cancerígena a menudo puede albergar decenas, cientos o miles de las alteraciones genéticas, por lo que, su clasificación resulta de vital importancia. Lengauer C y colaboradores (1998) postulan la clasificación más aceptadas actualmente basándose en cuatro categorías de alteraciones del material genético a nivel molecular. Cabe resaltar, que cualquiera sea el tipo de alteración, existe siempre un cambio en la secuencia del ADN de algún gen (como unidad funcional); dando como resultado un producto de transcripción y/o traducción defectuosa:

- **ALTERACIÓN EN EL NÚMERO DE CROMOSOMAS:**

La pérdida del cromosoma 10, particularmente la región donde se localiza el gen supresor tumoral PTEN, se relaciona con el desarrollo del glioblastoma (Wang S et al, 1997). Además, la ganancia del cromosoma 7 resulta en una duplicación del oncogén MET, lo cual se asocia con el desarrollo de carcinoma renal (Zhuang Z et al, 1998).



- **TRANSLOCACIÓN DE CROMOSOMAS:**

Posterior a una deleción del cromosoma 9 (en la región del locus del gen C-abl), éste se une al cromosoma 22 en el locus del gen BCR, generando una translocación que causa leucemia mieloide (Nowell P et al, 1997).

- **AMPLIFICACIÓN GÉNICA:**

Un aumento en el número de copias del gen N-myc en la misma región cromosómica (amplificación genética), ha sido asociado en el 30% de los casos de neuroblastomas (Seeger R et al, 1985).

- **CAMBIO EN LA SECUENCIA DEL ADN:**

La mutación en el gen K-ras provoca un cambio de lectura (G12V), lo cual se encuentra en el 80% de los casos de cáncer pancreático, siendo ésta la alteración más común en este tipo de cáncer (Almoguera C et al, 1988).

Por otra parte, un mejor entendimiento de la susceptibilidad y/o predisposición para adquirir dichas alteraciones, continúa siendo trabajo de distintos grupos de investigación a nivel mundial y será fundamental para conocer el verdadero origen del cáncer.

Hasta el momento, sabemos que el principal factor para desarrollar algún tipo de alteración genética (mutación) es la exposición al medio ambiente y estilo de vida, teniendo como resultado un cáncer somático (espontáneo); alrededor del 90 – 95% de los distintos tipos de cáncer se atribuyen a genotóxicos endógenos (tabaco, cáncer de pulmón; rayos UV, cáncer de piel; etc.), infecciones (HPV's, cáncer de cérvix; HBV y HCV, cáncer hepático; etc.), y otros (hormonas; estrógenos y cáncer de mama; etc.) (Stratton M et al, 2009). Mientras, 5 -10 % de las alteraciones genéticas se presentan de forma hereditaria (mutación germinal) con alto riesgo de desarrollo de cáncer familiar por parte de los parientes o descendencia; ejemplo, cambio en la secuencia del gen BRCA1/BRCA2 (75%; cáncer de mama/ ovario) y MSH2 (60%; cáncer de colon no-polyposis) (Fletcher O et al, 2010).

Cabe destacar, que desde hace 40 años, las observaciones hechas por Ashley D. (1969), Hethcote H y Knudson A. G (1978) postularon que los cánceres heredables



autonómicos dominantes (FAP y Retinoblastoma, respectivamente) desarrollan mutaciones somáticas por la presencia de mutaciones germinales. La validación de la hipótesis del “doble-golpe” de Knudson ha sido uno de los principales logros de la investigación en cáncer, y ha establecido una interacción entre mutaciones somáticas y germinales causadas por múltiples factores (exposición al medio ambiente/estilo de vida y herencia) en los distintos tipos de cáncer.

Hasta el momento se han observado mutaciones somáticas en aproximadamente unos 500 genes, con una vinculación clara en la iniciación, progresión y desarrollo de los distintos tipos de cáncer (Forbes S et al, 2008, Lawrence et al, 2014). Sin embargo, el surgimiento de las nuevas tecnologías de secuenciación masiva (next-generation sequencing technologies) que permiten estudios de asociación del genoma completo (genome-wide association studies; GWAS) han estimulado una rápida re-categorización de las alteraciones genéticas somáticas y/o hereditarias dentro de posibles genomas del cáncer. Actualmente, los estudios GWAS han identificado alrededor de 200 asociaciones entre riesgo/tipo de cáncer y variantes en alelos genéticos/genómicos específicos, tales como polimorfismos de un solo nucleótido, haplotipos y variantes raras, que proporcionan pistas más claras sobre la dinámica de los genomas del cáncer (Chang et al., 2014).

Finalmente, estas nuevas tecnologías resultan fundamentales para el inicio y desarrollo de proyectos multicéntricos de la genómica del cáncer, tales como “The Cancer Genome Atlas” (Cancer Genome Atlas Research Network) y “The International Cancer Genome Consortium” (International Cancer Genome Consortium Research Network). Estos proyectos analizan las posibles alteraciones genéticas, epigenéticas, transcriptómicas y proteómicas en cientos o incluso miles de muestras de distintos tipos de cáncer. Su objetivo general es proporcionar conjuntos de datos oncogenómicos disponibles públicamente para comprender mejor los mecanismos moleculares que subyacen al cáncer y para evaluar la influencia de alteraciones genéticas específicas en cada tipo de cáncer.



1.2.2 Alteraciones epigenéticas:

Las alteraciones epigenéticas asociadas al desarrollo del cáncer son las más estudiadas en los últimos años. La regulación epigenética gira en torno a la estructuración del genoma en la cromatina y su efecto regulador sobre la expresión de los genes (Felsenfeld G and Groudine M, 2003).

El término epigenética se define como: cambios “mitóticos y meióticos” heredables en la expresión génica que ocurren sin una alteración en la secuencia de nucleótidos del ADN” (Bird A 2002; En-Li, 2002). En la regulación epigenética participa un gran número de complejos proteicos y diversos elementos que establecen que la expresión génica tenga un vínculo muy estrecho con la estructura de la cromatina. Entre estos podemos mencionar: 1) la metilación del ADN, 2) las modificaciones post-traduccionales de las histonas, 3) los complejos de remodelación de la cromatina y 4) micro-ARN no codificantes (miRNAs small noncoding); los cuales mantienen una estrecha interacción durante el proceso de regulación (Gou-Cheng Y, 2012). Dentro de estos elementos, el cambio en el estado de metilación en el ADN es la alteración más estudiada y con más evidencia acumulada durante los últimos 20 años. Sin embargo, el papel de otras alteraciones epigenéticas resulta un área emergente de interés por su relación con el origen del cáncer (Jones P, et al 2007, Sandoval J and Esteller M, 2012, Chakravarthi B et al, 2016).

- MECANISMO DE REGULACIÓN EPIGENÉTICA:

La metilación del ADN consiste en la incorporación de un grupo metilo (-CH₃) en el carbono 5 de la citosina, siempre y cuando se encuentre en el contexto del dinucleótido CpG; mediada por enzimas denominadas ADN metil-transferasas (Dnmts, por sus siglas en inglés) (Goll MG, Bestor TH 2005). Dentro del genoma humano se encuentran muy pocos dinucleótidos CpGs localizados en grandes segmentos (secuencias repetitivas, transposones) y segmentos cortos denominados “islas CpGs” (ricos en C-G; mayor al 60%), que se encuentran preferentemente en la región promotora de los genes. Dicho mecanismo participa de manera normal en la inactivación (transposones, secuencias repetitivas y cromosoma X) y silenciamiento (genes de expresión tejido específico y genes



improntados) mediante la formación de una cromatina compacta o heterocromatina; resultando en una estabilidad genómica y en una inaccesibilidad de la maquinaria transcripcional a regiones promotoras, respectivamente (Bird A, 1986; Jones P, 1999; Ooi S and Bestor T, 2008, Schübeler D, 2015).

Por otra parte, nuestro genoma se envuelve alrededor de un núcleo de histonas (denominado nucleosoma) que es la columna vertebral de la cromatina. Las regiones amino terminales de las histonas sobresalen de la estructura globular del nucleosoma y son blanco de modificaciones post-traduccionales. Estas regiones de las histonas son ricas en residuos de lisina, blanco de modificaciones covalentes tales como: acetilación y metilación, entre otras modificaciones, mediadas por acetiltransferasas y metiltransferasas de histonas (HAT y HMT por sus siglas en ingles), respectivamente. La presencia de esta modificación regula tanto positiva como negativamente la compactación de la estructura de la cromatina, ya que, permiten llevar a cabo el reacomodo estructural a heterocromatina y/o eucromatina (Ray-Gallet D and Almouzni G, 2010).

Cabe destacar, que las modificaciones de las histonas tienen una interacción dinámica con la metilación del ADN. Generalmente regiones silenciadas y/o inactivadas por la metilación de CpG's en el DNA están hipoacetiladas e hipermetiladas en residuos específicos de lisina (por ejemplo, lisina 9 y/o 27 en la histona H3). Además, ambos mecanismos epigenéticos sirven como marcas que son reconocidas por complejos proteicos que tienen una función co-represora; la familia de proteínas con capacidad de unirse al ADN metilado conocidas como MBD's o MeCP's (del inglés: "Methyl-Binding Proteins" o "Methyl-CpG-binding Proteins", respectivamente), proteínas del grupo Polycomb (PcG) y proteínas del grupo SWI/NSF-ATPasas que reconocen modificaciones específicas en las histonas, inician actividades de remodelaje de la cromatina que inducen a la formación de una heterocromatina. Por otra parte, regiones promotoras de genes activamente transcritos muestran CpG's del ADN libres de metilación, así como hiperacetilación en residuos de lisina de las histonas H3 y H4, y metilación de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4) (Berger S, 2007; Kouzarides T, 2007, Masliah P, et al, 2015).

Por último, un mecanismo recientemente encontrado de regulación epigenético es mediado por moléculas de ARN's pequeños no codificantes, denominados microARN's (por sus siglas en ingles, miRNAs). Estos microARN's modulan la expresión genética a



través del complejo RISC (del inglés. RNA induced silencing complex) bloqueando la expresión de genes específicos. En el complejo RISC la secuencia del microRNA interacciona con la región 5' del RNA mensajero (RNAm) correspondiente a un gen específico, por lo que, este mecanismo de regulación es pos-transcripcional. Es decir, se modula la expresión mediante el bloqueo del inicio de la traducción (síntesis de proteínas), los ARNm se dirigen a un lugar de almacenamiento citoplasmático, y tras ciertos estímulos posteriores se degrada o bien se regresa al citoplasma para traducirse (Avraham R, et al, 2012).

- ALTERACION DE MECANISMOS DE REGULACIÓN EPIGENÉTICA EN CÁNCER:

Las células neoplásicas se caracterizan por presentar un estado de metilación de CpGs del ADN anormal, particularmente una hipermetilación en los promotores de genes supresores de tumores (GST). Los estudios de la hipermetilación anormal en “islas CpG’s” ubicadas en promotores han permitido una asociación clara con el silenciamiento transcripcional y/o pérdida de función de genes supresores de tumores, y han contribuido a la obtención de una larga lista de genes potenciales blancos de diagnóstico y pronóstico de los distintos tipos de cáncer (Esteller M. 2007). Además, se postula la existencia de un “fenotipo metilador de islas CpG’s en cáncer” (por sus siglas en inglés, “CpG’s island methylator in cancer”) que es definido como un grupo de genes que tienen este tipo de alteración epigenética en un cáncer particular. En el caso de cáncer de colon esporádico el “set” de genes propuestos son *MINT1*, *MINT2*, *MINT31*, *CDKN2A* y *MLH1* (Issa J, 2004). Sumado a lo anterior, Irizarry R y colaboradores (2009) demostraron que el cáncer de colon presente una metilación anormal mayor del ADN en regiones no promotoras (definidas como proximales), localizadas hasta 2 a Kb del sitio de inicio de la transcripción y con una densidad relativamente baja de CpGs.

Por otra parte, las células cancerosas también se caracterizan por presentar una pérdida global de metilación. La hipometilación del ADN resulta en la expresión de genes normalmente silenciados, por ejemplo, genes improntados, como *IGF2* que es asociado con un incremento del riesgo a desarrollar distintos tipos de cáncer (Lim D and Maher E, 2010). Sin embargo, la principal consecuencia de la pérdida de metilación es probablemente la movilización de transposones y secuencias repetitivas que tienen la



capacidad de crear una inestabilidad genómica. Con este tipo de alteración se puede facilitar una recombinación genética anormal que conduce a rupturas cromosómicas, translocaciones y/o pérdidas alélicas (Hoffmann M et al, 2005; Barchitta M, et al, 2014).

En la mayoría de los casos, se establece la asociación entre el silenciamiento de genes supresores de tumor por promotores con CpG's hipermetilados y modificaciones en sus histonas (desacetilación de residuos de lisinas en histonas H3 y H4 y la metilación de residuos de lisinas 9 y 27 en histonas H3 -- H3K9 y H3K27--) que ocasionan por la formación de heterocromatina (Chrun E, et al, 2017). Un posible parte aguas en cuanto a la directa contribución, es la postulación del silenciamiento de los genes RARB, GAS2 y PIK3C por hipermetilación de CpG's y metilación en la lisina 27 de la histona H3 (H3K27) dentro de región sus regiones promotoras (Yukata K et al, 2008). Además, Fraga y colaboradores (2005) muestran el perfil de acetilaciones en la histona H4 a lo largo del genoma completo de células de biopsias y líneas celulares de cáncer, por lo que, la desacetilación de histonas global es la modificación de histonas anormal en cáncer mejor entendida y la más aceptada.

INTERACCIÓN DE MECANISMO EPIGENETICOS ALTERADOS EN CÁNCER:

La maquinaria epigenética actúa en conjunto para asegurar la conformación de una cromatina correcta y los niveles de accesibilidad, asegurando una estabilidad genómica y niveles normales de expresión génica. Sin embargo, alteraciones intrínsecamente relacionadas de la maquinaria epigenética pueden darse en el origen y desarrollo del cáncer (Biswass S, et al, 2017). Por ejemplo, el silenciamiento transcripcional de genes supresores de tumor por una hipermetilación de "islas CpGs" localizadas en sus regiones promotoras, se asocia con una particular combinación de marcas de histonas; desacetilación de las histonas H3 y H4 (desAc-H3 y desAc-H4), pérdida de trimetilación en la lisina 4 de la histona 3 (trimethyl-H3K4), ganancia de metilación en la lisina 9 de la histona 3 (methyl-H3K9) y ganancia de trimetilación en la lisina 27 de la histona 3 (trimethyl-H3K27) (**Figura 2**).

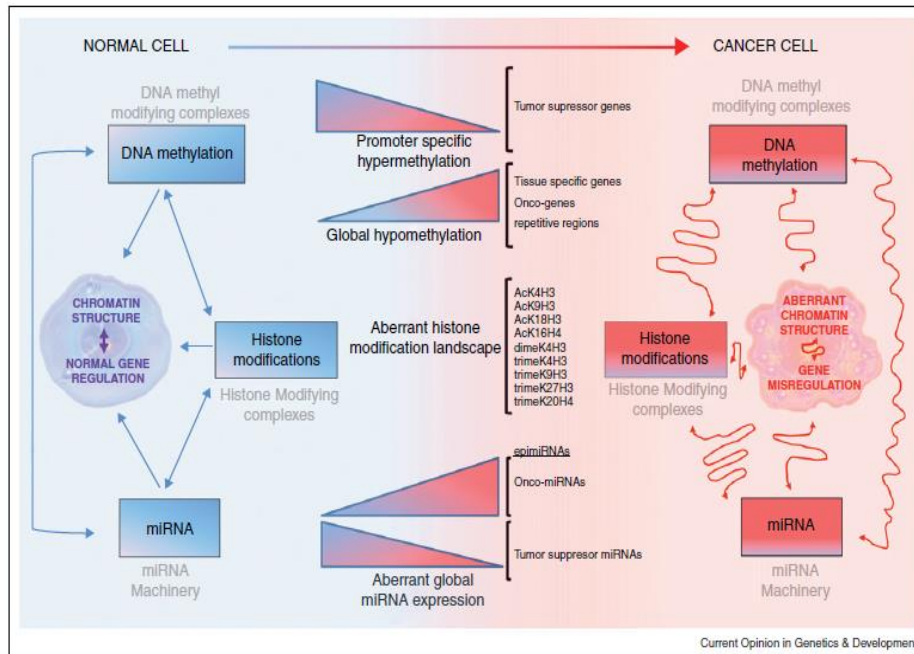


Figura 2. Alteraciones epigenéticas en cáncer. En conjunción con la acumulación de alteraciones genéticas, existen alteraciones en los diferentes componentes de la maquinaria epigenética; modificación en los perfiles de metilación del ADN (CpG's), modificaciones de las histonas y miRNAs. En las células normales, la interacción entre los componentes epigenéticos y la estructura de la cromatina resulta en una regulada expresión génica y estabilidad genómica. Sin embargo, en las células cancerosas promotores de genes supresores de tumor presentan una hipermetilación de CpG's con un patrón global alterado en las modificaciones de las histonas que resulta en el silenciamiento transcripcional. Por otra parte, la hipometilación global conduce a una inestabilidad y fragilidad cromosómica. Los cambios epigenéticos, como la metilación del ADN y las histonas modificaciones son responsables de una expresión anormal de miRNA (Sandoval J and Esteller M, 2012).

Curiosamente, componentes de la maquinaria epigenética, como son las enzimas ADN metil-transferasas (DNMTs), enzimas desacetiltransferasas (HDACs) y genes del complejo remodelador Poycomb, pueden ser objeto de regulación por microARNs y viceversa. Saito y colaboradores (2006) demostraron que el microR-127 es suprimido por hipermetilación de CpGs asociada a una disminución en la acetilación de la histona 3 (Ac-H3) y en la metilación de la lisina 4 de la histona 3 (methyl-K4H3). Mientras que diversos estudios de análisis del genoma completo (GWS) en diferentes tipos de cáncer, han demostrado la influencia de la metilación de CpGs del ADN y las modificaciones post-traduccionales de histonas en la regulación global de microRNAs (Kozaki K, et al, 2008; Pavicic W et al, 2011 Liz J, et al, 2016).



2. CÁNCER CÉRVICO UTERINO Y VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

El cáncer cérvico uterino (CaCu) es el cuarto cáncer más diagnosticado y la tercera causa de mortalidad por cáncer de mujeres en el mundo (Ferlay J et al, 2010; Torre L et al, 2015). Globocan reportó sus estimaciones más recientes sobre el impacto del cáncer cervical a nivel mundial (**Figura 3**); 200,000 casos adicionales por año hasta llegar a un millón de casos esperados para 2050 (Globocan; IARC, 2010). Cabe resaltar, que la mayoría de las pacientes (80-85%) consideradas de alto riesgo para desarrollar CaCu viven en países en vías de desarrollo o zonas de niveles altos de pobreza como África, América Central y Sudamérica (Jemal A et al, 2010).

En México, el CaCu es la segunda causa de muerte por neoplasias en mujeres mayores de 25 años (INEGI, 2015). El Sistema Nacional de Salud de nuestro país reporta una tasa de mortalidad correspondiente a 10 por cada 100 mil (SSA-México, 2015). Por lo anterior, es claro que el CaCu constituye un tipo de cáncer altamente prioritario para nuestro país, por lo que los esfuerzos para poder conocer los mecanismos por lo cual se desarrolla resultan importantes.

Por otro lado, la infección genital con el virus del papiloma humano (VPH) constituye la enfermedad de transmisión sexual viral más frecuente a nivel mundial, presentando un pico de prevalencia entre personas de 18 a 30 años y un riesgo de infección del 50-80 % (Bosch et al, 2013).



FACULTAD DE FARMACIA

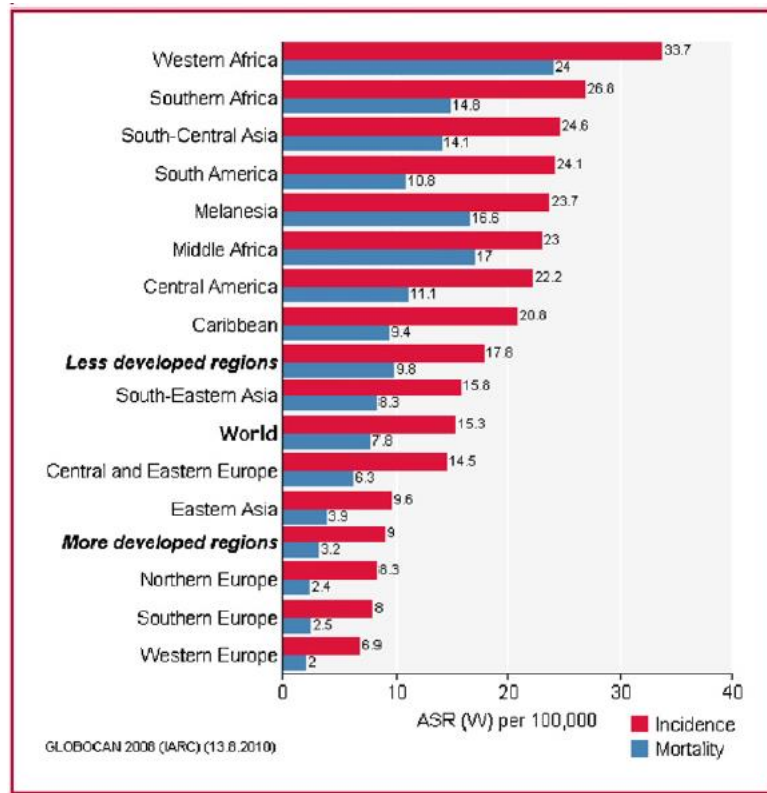


Figura 3. Epidemiología del cáncer cérvico uterino. Tasas estimadas de incidencia y mortalidad en regiones subdesarrolladas o bajo desarrollo (Less developed) y alto desarrollo (More developed) (Stanley M,2010).

Los estudios clínicos (técnicas de biología molecular de alta sensibilidad) han identificado tipos específicos del HPV en prácticamente el 100% de los cánceres de cuello uterino. Sin embargo, menos del 5% de las mujeres infectadas por algún tipo de VPH desarrollan CaCU (Syriannen K.J. et al, 1996). Por lo anterior, la propuesta de que las infecciones persistentes por Virus del Papiloma Humano (VPH) son el más significativo o necesario co-factor, pero no suficiente, para promover la transformación maligna en las células del cérvix, cuenta con el consenso prácticamente generalizado en grupos de investigación y organismos mundiales en el área de la salud (Castellsagué X, 2008; Stanley M, et al, 2010).

2.1. HISTORIA.

Hasta principios del siglo XX, las verrugas genitales y el CaCu siempre fueron referidos como manifestaciones de enfermedades venéreas comunes, tales como sífilis y



gonorrea. No fue sino hasta principios de los años 80's que se propuso una asociación entre el cáncer cérvico uterino y el VPH. Así entonces, por medio de experimentos de hibridación, se demostró que las verrugas genitales y los tejidos de cáncer de cérvix, contienen el genoma del VPH (zur-Hausen et al, 1980). Estas observaciones fueron respaldadas por una serie de novedosos estudios moleculares en el laboratorio de Harald zur-Hausen (zur-Hausen et al, 1981, 1983, 1984), que resultarían en las bases para la identificación y purificación de los VPH tipo 16 y 18 en líneas celulares y biopsias de cáncer de cérvix, razón por la cual le otorgaron a Harld zur-Hausen el Premio Nobel en Medicina, 2008.

Actualmente, más de 130 genotipos diversos del VPH han sido definidos y cerca de 40 de ellos infectan mucosas genitales. Estos tipos de VPH genitales se clasificaron como de bajo o alto riesgo por su probabilidad de causar cáncer cérvico uterino. Los VPH considerados de "bajo riesgo", como el VPH 6 y 11, que producen verrugas genitales benignas o condilomas, en el 90% de los casos. Mientras que los virus de "alto riesgo": 31, 33, 35, 45, 51 (entre otros) pero principalmente el tipo 16 y 18, se han identificado como los principales factores etiológicos del CaCu (Muñoz et al., 2003). Por otra parte, es interesante comentar que los más frecuentes tipos de HPV en CaCu son el tipo 16 (54.5%) y 18 (15.8%), donde ambos representan más del 70% de los casos tumorales (Smith J et al, 2007).

2.2. LA INFECCIÓN DEL HPV PARA EL DESARROLLO DEL CACU.

El VPH, pertenece a la familia Papillomaviridae, una familia recientemente reconocida como distinta de los polyomavirus por el Consejo Internacional para la Taxonomía de los Virus, (ICTV). El genoma del VPH consiste de una molécula de ADN circular de doble cadena de aproximadamente 8 Kb (**Figura 4**) y el cual se divide en tres regiones: la región larga de control, LCR, que no contiene marco de lectura alguno; la región que corresponde a las proteínas tempranas (E1 a E8) y la región que corresponde a las proteínas tardías (L1 y L2) (de Villiers et al., 2004).

FACULTAD DE FARMACIA

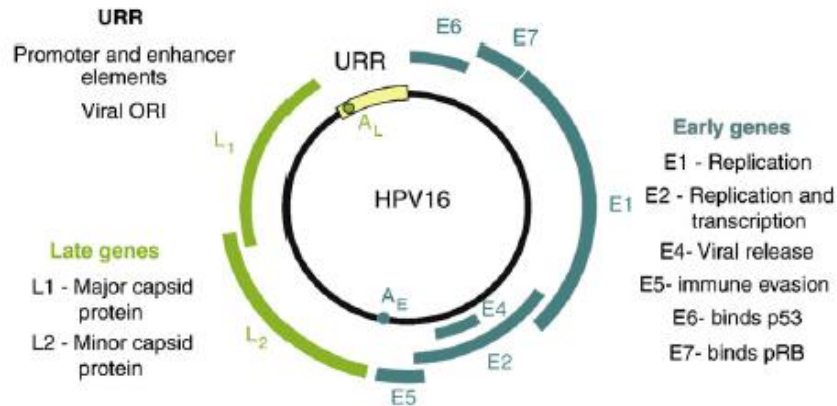


Figura 4. Organización del genoma de VPH. Las tres regiones en que se divide el genoma del virus: la región larga de control, LCR (URR), que no contiene marco de lectura alguno; la región que corresponde a las proteínas tempranas, E1 a E8 (Early genes) y la región que corresponde a las proteínas tardías, L1 y L2 (Late genes) (Stanley M, 2010).

Un resumen del ciclo de infección del HPV y el desarrollo del CaCU se muestra en la **Figura 5**. La infección y replicación del virus solamente se da en células epiteliales totalmente diferenciada (estrato basal), como consecuencia de microtraumatismos, es decir, una abrasión o lesión del epitelio. El proceso de división celular normal de las células infectadas, favorece el aumento de copias del genoma viral y la expresión de sus proteínas tempranas, mientras que la diferenciación proporciona una señal al virus para activar todos los genes (incluyendo E4, L1 y L2) que permitirá la formación de viriones, listos para reiniciar la infección (Doorbar J et al, 2005).

Cabe señalar, que los virus papiloma humano, tanto oncogénicos como no oncogénicos, pueden causar LSIL (lesión intraepitelial de bajo riesgo) en la zona de transformación del cuello uterino. LSIL, también conocido como NIC 1 (neoplasia intraepitelial cervical, grado 1) bajo otro sistema de clasificación, se manifiestan transitoriamente por la infección viral productiva. La zona de transformación del cuello uterino se localiza en la región que une al epitelio columnar del endocérnix y el epitelio escamoso del ectocérnix y constituye una región de continuos cambios metaplásicos, más activos durante la pubertad y durante el primer embarazo y declinan después de la menopausia. Una metaplasia escamosa atípica, inducida por los virus oncogénicos y que se desarrolle en esta región, puede progresar a una HSIL (lesión intraepitelial de alto riesgo), o también reconocido NIC 2 o NIC 3. Las HSIL son las verdaderas precursoras

del CaCu, ya que se caracterizan por presentar mayor actividad mitótica y contenido de células inmaduras en los tercios central y superior la lesión. HSIL es comúnmente positivo a los tipos virales oncogénicos que evitan la maduración y diferenciación, produciendo una replicación continua de células inmaduras y eventualmente la acumulación de anomalías genéticas y epigenéticas que favorecen al desarrollo del CaCu. Por otro lado, la progresión desde LSIL hasta el nivel HSIL, y por último, el desarrollo de CaCu puede durar más de 15 años; dicho tiempo permite postular la necesidad de factores adicionales a los efectos de las proteínas producidas por VPH oncogénicos (Cooper C, 2017).

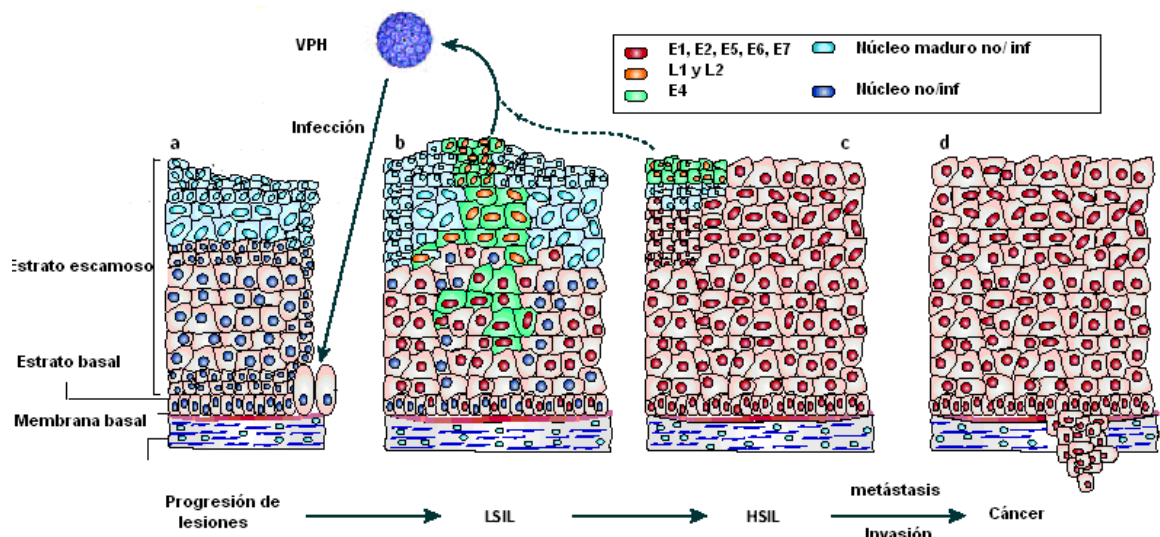


Figura 5. El ciclo del virus de papiloma humano en el epitelio estratificado del cuello uterino:
a) Las células germinales normales se dividen a lo largo de la membrana basal y maduran verticalmente a través del epitelio sin división posterior. **b)** Después de que el VPH infecta estas células del estrato basal (completamente diferenciadas), se expresan las proteínas tempranas (E1, E2, de E5, de E6 y de E7; núcleos rojos) y se replica el DNA viral, causando una LSIL (lesión intraepitelial de bajo riesgo). En las capas superiores del epitelio, el genoma viral expresa E4 (citoplasma verde), L1 y L2 (núcleos anaranjados). Eso permite la formación de viriones, listos para reiniciar la infección. **c)** Las infecciones persistentes por VPH de "alto riesgo" progresan a las HSILs (lesiones de alto grado), donde la diferenciación celular es retardada e incompleta, por lo que muestra poco grado de diferenciación. **d)** La continua progresión, favorece la invasión y metástasis. (Cooper C, 2017).

2.3. PAPEL DE LOS GENES E6 Y E7 DEL HPV EN EL DESARROLLO DEL CACU

Desde la década pasada, se conoce el papel de las onco-proteínas E6 y E7 de los VPH de “alto riesgo” en el desarrollo del CaCU. Así se conoce que la expresión de los genes E6 y E7 inactiva dos proteínas fundamentales en el establecimiento de homeostasis celular (apoptosis y proliferación controladas): los supresores de tumores p53 y pRB, respectivamente. Es decir, se sabe que la inactivación de p53 y pRB es suficiente para immortalizar células (ya que elimina puntos de control del ciclo celular) por insuficiente para transformación carcinogénica (Clarke B. and Chetty R., 2001; Bosch F.X. et al., 2002). Además, se postula que las onco-proteínas E6 y E7 de los VPH de “alto riesgo” presentan funciones adicionales que permiten alterar y/o inactivar distintas vías de señalización, que resultan en una inestabilidad genómica, alteración de la expresión génica y eventos de evasión de la respuesta inmune (**Figura 6**) (Moody C et al, 2010. Litwin T, et el, 2017).

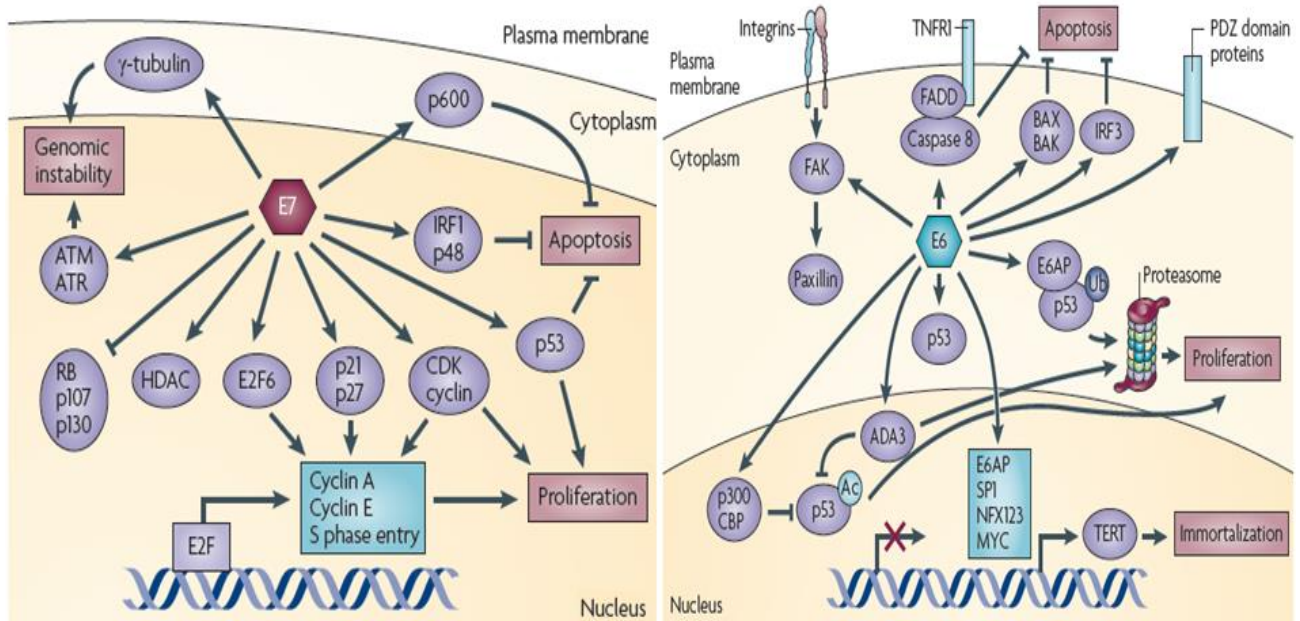


Figura 6. Efectos de las onco-proteínas E6 y E7 de los VPH de “alto riesgo” en números procesos celulares (vías de señalización). (Moody C et al, 2010).



3. VÍA DE SEÑALIZACIÓN WNT

En las últimas tres décadas, se han identificado componentes moleculares cruciales en vías de señalización que controlan o regulan mecanismos como el metabolismo celular, la síntesis de proteínas, la arquitectura del citoesqueleto y por consecuencia, los procesos celulares de proliferación, diferenciación, interacción célula-célula y apoptosis (Goldmann W. H. et al, 2012).

En este sentido la vía intracelular de señalización, conocida como Wingless/Wnt resulta clave en la regulación de los organismos multicelulares durante toda su vida. La vía Wnt controla procesos conservados durante la evolución tales como la inducción embrionaria, generación de la polaridad celular y el direccionamiento específico celular dentro del embrión durante la morfogénesis. Además, se reconoce que durante la etapa adulta continúa jugando un papel indispensable en la homeostasis, la renovación y regeneración celular (Lonh K et el, 2016).

Para la vía Wnt/ β -catenina, el modelo más reciente (**Figura 7**) sugiere que la inactivación de la vía ocurre por la acción de los distintos antagonistas (SFRPs y DDK1), que bloquean la unión de los ligandos Wnt con el receptor transmembranal Frizzled, permitiendo la formación de un complejo multiprotéico que incluye las proteínas: adenomatous polyposis coli (APC), axina (1 o 2), sintetasa glucógeno cinasa-beta ($GSK3\beta$), caseína cinasa-1alfa ($CK1\alpha$) y la fosfatasa A2 (PP2A). Dicho complejo tiene la capacidad de fosforilar a β -catenina por la acción directa de $GSK3\beta$ y $CK1\alpha$. La β -catenina fosforilada es dirigida a degradación mediante el mecanismo de ubiquitinación/proteosoma, dando por resultado bajos niveles de β -catenina en el citoplasma y núcleo. Es importante comentar que en células diferenciadas normales este mecanismo se encuentra inactivo: donde la β -catenina se encontrará enriquecida en el dominio citoplasmático de la membrana celular y formando complejos con los dominios intracelulares de las E-cadherinas (jugando un papel en las uniones adherentes célula-célula). Por el contrario, la unión de los ligandos Wnt al receptor Frizzled, ocasionaría la activación de la vía y el bloqueo de la interacción entre β -catenina y el complejo multiproteico, impidiendo su fosforilación y, por consiguiente, su degradación. Todo esto

permitirá la acumulación de la β -catenina en citoplasma y, su posterior, translocación al núcleo. Una vez en el núcleo, β -catenina se asocia a la familia de factores Tcf/Lef (factor de células T/factor potenciador linfoide) y actúan como factor de transcripción para promover la expresión de genes blancos (Roel Nusse, 2012).

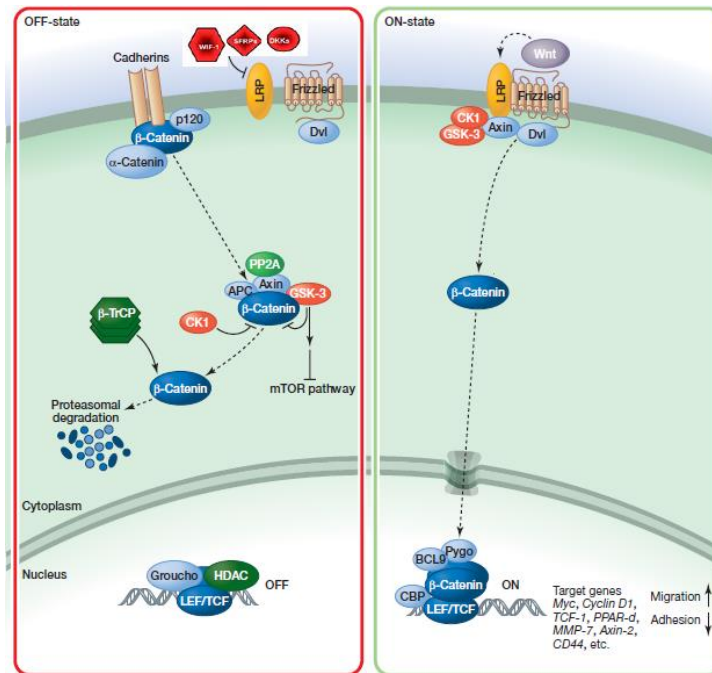


Figura 7. Vía de señalización Wnt. Vía inactiva (off-state Wnt) y activa (on-state Wnt+) (Roel Nusse, 2012).

3.1. β -CATENINA; COMPONENTE PRINCIPAL DE LA VÍA WNT.

El gen de la β -catenina (CTNNB1) se localiza en el cromosoma 3 (3p22-p21.3), produce un transcrito de 3729 pb y codifica para una proteína de 88 kDa conteniendo 781 aminoácidos. La β -catenina es una proteína que se identificó originalmente debido a su interacción con el dominio citoplasmático de la E-cadherina y que, junto con la α -catenina, permite la formación de un complejo anclado con el citoesqueleto de actina. Esto permite a la β -catenina jugar un papel en la interacción celular mediante la adhesión célula-célula. No obstante, también ha sido demostrado que la β -catenina juega un papel central en la cascada de señalización Wnt, regulando diversos procesos que permiten la homeostasis celular (como proliferación, diferenciación, entre otros). Además, cabe

destacar su potencial implicación (dependiente o independientemente de la vía Wnt) en la regulación de la expresión génica, debido a su interacción con distintos factores de regulación transcripcionales (Nusse R and Harold V, 2012; Prakash S, et al, 2015).

3.1.1 Estructura proteica de β -catenina, interacción y regulación.

La estructura primaria de la β -catenina se caracteriza por un dominio central que contiene 12 repeticiones de 42 aminoácidos, conocida como “repeticiones de armadillo” (ARM; residuos 141-664). El dominio central está flanqueado por dos regiones ubicadas en el dominio amino y carboxilo terminal, NTD y CTD, respectivamente (**Figura 8**) (Valenta T et al, 2012). Dichos dominios permiten la interacción de β -catenina con distintas proteínas en las siguientes regiones subcelulares:

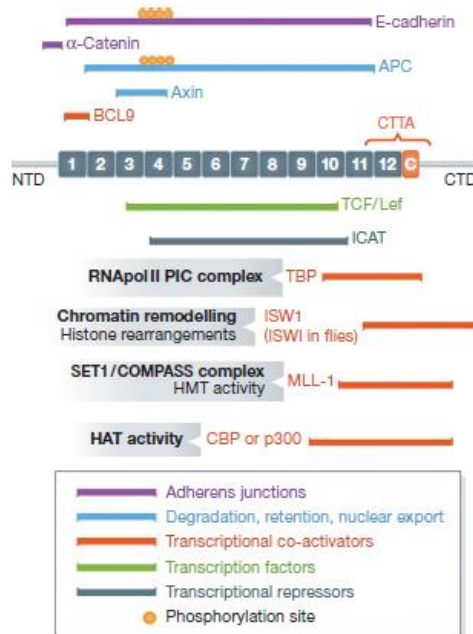


Figura 8. Estructura proteica de β -catenina; regulación/interacción. β -catenina interacciona con proteínas de la membrana citoplasmática (E-cadherina; función de adherencia); proteínas citoplasmáticas (APC y Axina; función de destrucción); proteínas nucleares (BCL9, TBP, ISW1, MML1, CBP; función transcripcional) (Valenta T, et al, 2012).

- A) En la membrana plasmática la interacción de β -catenina con E-cadherina y α -catenina, permite su estabilización: la β -catenina se localiza principalmente en esta región y presenta niveles bajos en citoplasma y núcleo (vía Wnt apagada). La



fosforilación en los aminoácidos tirosina 142 y 654 por parte de proteínas con actividad de tirosina-cinasa (CK1 y Scr) resulta en una disminución del complejo E-cadherina/ β -catenina/ α -catenina y, por tanto, en la activación de la vía Wnt (Bustos et al, 2006 and Van-Veelen et al, 2011).

- B) En el citoplasma la interacción de β -catenina con Axina y adenomatous polyposis coli (APC), permite la formación del complejo multiproteico que degrada la β -catenina. Se sugiere que este mecanismo permite regular los altos niveles de β -catenina en citoplasma y previenen su posterior translocación al núcleo (vía Wnt apagada). APC actúa como el andamio de este complejo, permitiendo interactuar con el resto de los componentes: Axina, sintetasa glucogeno cinasa-3beta (GSK3 β), caseína cinasa-1alfa (CK1 α) y la fosfatasa A2 (PP2A). La formación del complejo induce la fosforilación en el dominio N-terminal (secuencia de aminoácidos localizados en el exón 3; D32SGxxSxxxTxxxS45) de la β -catenina. Primero, en la Ser-45, por CK1 α , y después en Ser-33, Ser-37 y Thr-41, por GSK3 β . A continuación, la β -catenina fosforilada se vuelve blanco de la ubiquitin ligasa E3/ β -TrCP (proteína con repeticiones β) para su ubiquitinación y subsiguiente destrucción proteolítica vía proteosoma (Kimelman D and Xu W, 2006; Roberts D et al, 2011).
- C) En el núcleo, β -catenina interacciona con factores de transcripción (principalmente, Tcf/Lef) y con distintos factores de regulación de la actividad transcripcional, resultando cambios en la expresión génica; la acumulación de β -catenina en citoplasma es un prerequisite indispensable para su translocación y acumulación en el núcleo (vía Wnt, activa) (Prakash S, et al, 2015). Como β -catenina no posee dominios de unión al ADN necesita interactuar con complejos multiproteicos que controlan la remodelación en la secuencia promotora y activación transcripcional de genes blancos. La interacción con co-activadores (Bcl-9-pygopu y TBP) del complejo de transcripcional, remodeladores de la cromatina (complejos Brg-1 y ISWI) y reguladores de la cromatina (CBP/p300) permite la subsecuente formación del complejo β -catenina/Tcf (Mosimann C et al, 2009). Existe una lista cada vez mayor de los genes blancos, sin embargo, muchos están sujetos al tipo de complejo formado con los distintos reguladores y factores transcripcionales, así



como al contexto dependiente del tejido-específico. (Vlad A et al, 2008). Una lista actualizada se puede encontrar en <http://www.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/target>. Por otra parte, la interacción entre β -catenina y/o TCF con co-represores transcripcionales (ICAT y Groucho/ TLE) bloquean la expresión de los genes blanco (vía Wnt, apagada) (Bottomly D et al, 2010).

3.2. APC; COMPONENTE DEL COMPLEJO REGULADOR DE B-CATENINA.

El gen APC (*adenomatous polyposis coli*; NCBI No. NG_008481) se localiza en el cromosoma 5 (5q21-q22) y produce transcritos de aproximadamente 10 Kb. El exón 15 representa más del 75% de la secuencia codificada y se encuentra en los distintos transcritos. La secuencia proteica del gen APC desempeña múltiples funciones celulares que gobiernan la homeostasis de las células epiteliales, como transducción de señales, mediación de la adherencia intercelular, estabilización del citoesqueleto, posible regulación del ciclo celular y apoptosis. Cabe destacar, que principalmente se le atribuye a APC un papel como supresor de tumores por regular la vía de señalización Wnt, como se describió antes, por formar parte del complejo multiproteico que degrada la β -catenina (considerado antagonista por mantener la vía inactiva) (Heppner G and Groden J, 2000; Fearnhead N et al, 2001; Waller A, et al, 2016).

3.2.1 Estructura proteica de APC, interacción y regulación.

Los distintos transcritos del gen APC codifican una secuencia proteica de aproximadamente 2800 aminoácidos y 310 kDa (NCBI No. NP_000029.2, 2843 aa; NP_001120983.2, 2825 aa), los cuales presentan una expresión constitutiva en distintos tejidos y una localización intracelular. Las funciones de APC parecen estar relacionadas con sus dominios de interacción con otras proteínas, que se encuentran en su estructura proteica (**Figura 9**) (Brocardo M and Henderson B, 2008). En el extremo amino-terminal, la proteína APC presenta un dominio de oligomerización formado por repeticiones denominadas "Heptad" (xx aminoácido apolar xx aminoácido apolar; entre los aminoácidos 6 y 57), que permiten la formación de homodímeros entre proteínas APC. Además, entre los aminoácidos 453 y 766 se localizan 7 repeticiones de 42 aminoácidos

(dominio Armadillo) que permiten a la proteína APC interactuar con PPA2, ASEF, Kap3A, Striartin y WTX, entre otras. Por lo cual, además de su papel en la regulación de la vía de Wnt se incluyen actividades de transporte nuclear, adherencia célula-célula, control del ciclo celular y estabilidad de la red citoesquelética de actina (Li Z and Nathke IS, 2005; Aoki K and Taketo M, 2007).

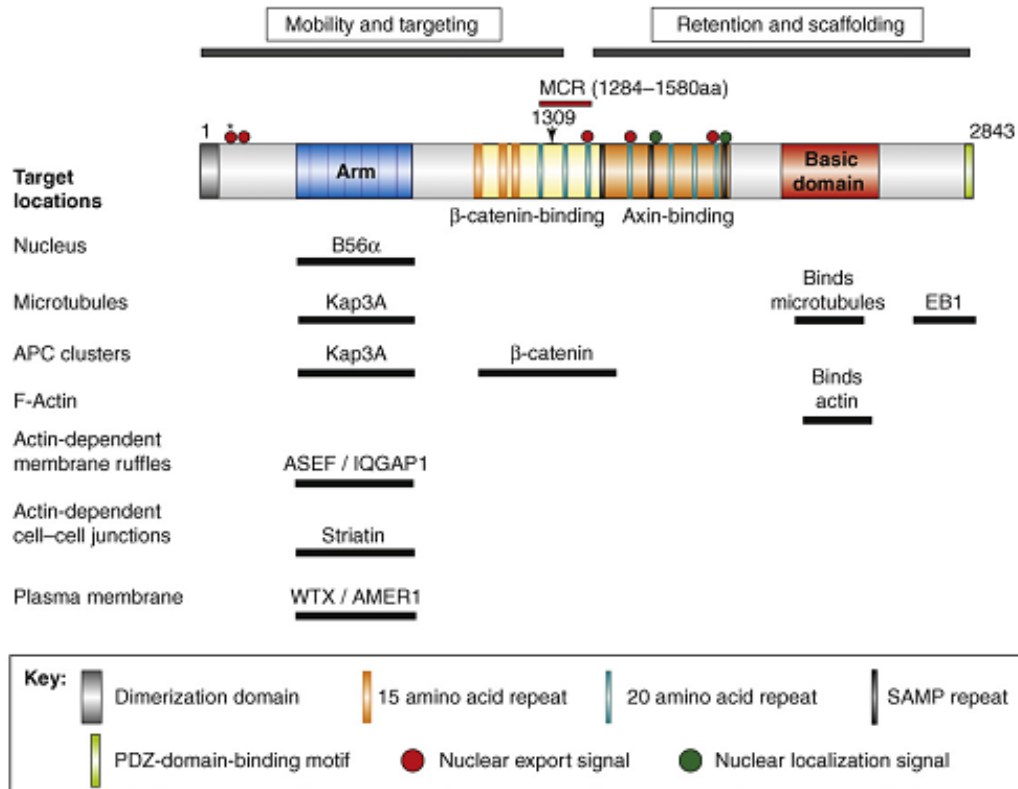


Figura 9. Estructura proteica de APC e identificación de dominios de interacción con otras proteínas. APC interacta con distintas proteínas mediante sus dominios proteicos. Notar la localización de la región MCR presente dentro de la región de interacción con b-catenina (Brocardo M and Henderson B, 2008).

Por otra parte, en la región central de APC (entre los aminoácidos 1020 y 2035) se localiza un dominio de interacción caracterizado por 3 repeticiones de 15 aminoácidos (3rep/15aa) y 7 repeticiones de 20 aminoácidos (7rep/20aa), que permiten la unión de APC con el componente central de la vía de señalización Wnt: la β -catenina. (Jing et al., 2001). Además, dentro de la región central (entre el dominio de interacción con β -catenina) existen 3 repeticiones, denominadas SAMP, que son plataformas de interacción de APC con Axina. Por lo anterior, la región central de la proteína APC regula la vía de



señalización Wnt, mediante los dominios de interacción y formación del complejo proteico que degrada β -catenina (Li Z and Nathke IS, 2005; Aoki K and Taketo M, 2007; Roberts DM et al, 2012).

Finalmente, dentro de la región carboxilo-terminal de la proteína APC se localiza el dominio básico (rico en arginina, lisina y prolina) entre los aminoácidos 2200 y 2400, que permite una interacción de APC con los microtúbulos y microfilamentos del citoesqueleto. Además, la región C-terminal puede desempeñar un papel en la progresión del ciclo celular y control del crecimiento, al interactuar con las proteínas EB1 (se asocia a microtúbulos del citoesqueleto) y hDLG (implicada en la polaridad celular, migración y bloqueo de la proliferación celular) (Li Z and Nathke IS, 2005; Aoki K and Taketo M, 2007).

3.2.2 Región promotora del gen APC.

El gen APC presenta dos promotores (1A y 1B) que inician la transcripción en distintos sitios (exones 1A y 1B; Genbank No. U02509 y No. D13981, respectivamente), localizados en el costado 5' de la región no codificante del gen. Horri A. y colaboradores (1993) demostraron que las principales isoformas de transcripción son resultado de "splicing" (proceso de maduración del ARNm) alternativo. La isoforma A (NCBI No. NM_000038.3), con un tamaño de 10740 pb, es resultado de la influencia del promotor 1A, mientras, la isoforma B (NCBI No. NM_001127511), con un tamaño de 10814 pb, es resultado de la acción del promotor 1B. Cabe destacar que ambas isoformas codifican en más del 95% la misma secuencia, incluido de forma integral el exón 15 (NCBI-BLAST; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Por otra parte, Hosoya K y colaboradores (2009) establecieron por primera vez mediante un análisis bioinformático (NCBI) el sitio de inicio de la transcripción de las distintas isoformas, localizados en el promotor 1A y 1B del gen APC, ambos ricos en secuencias de citosinas y guaninas, conocidas como islas CpG's (Figura 10).

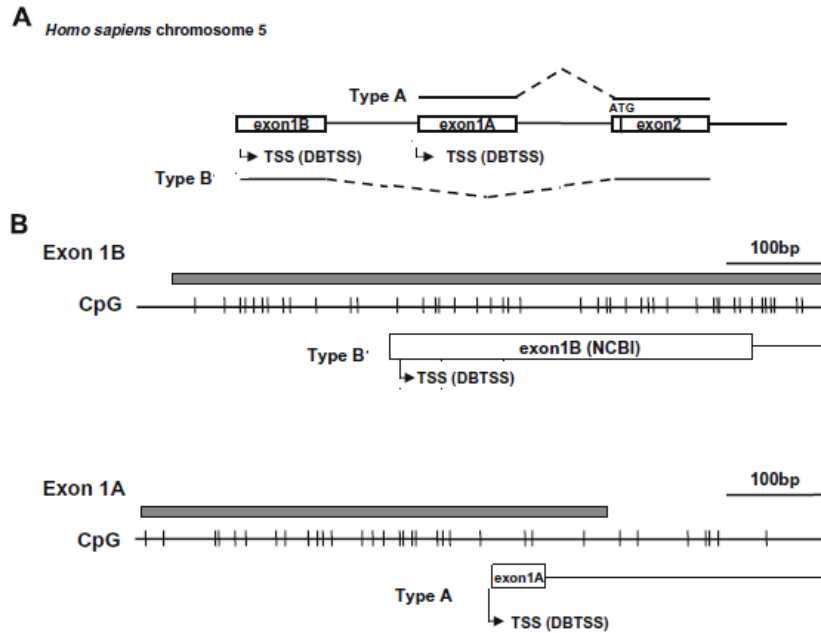


Figure 10. Regiones promotoras del gen APC; 1A y 1B. A) Localización de los promotores (exón 1A y exón 1B) y sitios de inicio de la transcripción (TSS) de las distintas isoformas (type A y type B). B) Características de cada promotor (isla CpG's) (Hosoya K et al, 2009).

A pesar de los diferentes estudios hasta el momento no es clara la diferencia entre los promotores para determinar el nivel y el lugar de expresión de las isoformas del gen APC; sin embargo, aunque el promotor 1B no ha sido extensamente estudiado, se postula que tiene un papel menor en la regulación de la expresión de APC, en comparación con el promotor 1A (Segditsas et al., 2008, Tsuchiya et al., 2000). Lo anterior es confirmado primero por los estudios de Esteller M (2000) y Arnold C (2000), donde se observaron que las modificaciones epigenéticas (hipermetilación de CpG's del ADN) en el promotor 1A resultaron en el silenciamiento del gen APC. Por su parte, Charames G y colaboradores (2008), reportaron que la delección del promotor 1A provocó el silenciamiento completo de las isoformas de APC, sugiriendo que las modificaciones del promotor 1B podrían no contribuir al mismo nivel. Adema, Uruna S. y colaboradores (2001) realizaron un análisis detallado en la secuencia de promotor 1A, demostrando la localización y función de secuencias para sitios de unión a factores transcripcionales como, Octamer, AP2, Sp1; que permiten una expresión basal del gen APC.



4. CÁNCER Y VÍA DE SEÑALIZACIÓN WNT

Entre las moléculas implicadas en esta cascada de señalización, se han encontrado con más frecuencia en varios cánceres humanos, las alteraciones genéticas y epigenéticas en los genes de β -catenina y APC (Clavers H and Nusse R, 2012). De esa manera, la acumulación nuclear de β -catenina, en la mayoría de los tumores estudiados, parece estar asociada a dichas alteraciones, lo cual resulta en inactivación/pérdida de la función y silenciamiento, respectivamente de APC. En base a lo anterior, se ha propuesto que β -catenina podría funcionar como posible oncogen, mientras que APC actuaría como gen supresor de tumor (Polakis P, 2012; Zhan T, et al, 2017).

4.1 ALTERACIONES GENÉTICAS EN COMPONENTES DE LA VÍA WNT

El gen APC presenta el 80-90% de todas sus mutaciones en el segmento denominado MCR (“mutation cluster region”; codones 1286-1513) del exón 15. Se ha observado que mutaciones en el MCR da lugar a una proteína truncada y sin los aminoácidos indispensables para unión a β -catenina (7rep/20aa) (**Figura 11**). Las alteraciones genéticas del gen APC se reportado en adenomas gástricos (Horii A et al, 1992), cáncer de mama (Furuuchi K et al, 2000), cáncer hepático (Oda H et al, 1996), cáncer de ovario (Wu R et al, 1996), cáncer de páncreas (Horii A et al, 1992) y cáncer de tiroides (Zeki K et al, 1994). Sin embargo, en los carcinomas de colón por la presencia de mutaciones hereditarias (germinales, familiar adenomatous polyposis; FAP) y espontáneas (somáticas), las cuales constituyen más del 85% de los casos (Nakamura Y, et al., 1992).

Las mutaciones germinales de APC ocasionan Polyposis Adenomatoso Familiar (FAP), una enfermedad autosomal dominante heredada, con el desarrollo inevitable del cáncer colorectal. Las mutaciones más comunes ocurren entre los aminoácidos 1194-1392, siendo las más frecuentes (“hotspots”) en los codones 1061 y 1309, las cuales explican un tercio de todas las mutaciones germinales reportadas. Mientras las mutaciones somáticas estan presentes en aproximadamente el 80% de los cánceres colorectales esporádicos y principalmente dentro del segmento MCR. En dicho fragmento

hay dos sitios “hotspots”: los codones 1309 y1450. Por lo anterior, las mutaciones germinales y/o somáticas del gen APC dan lugar a una proteína truncada, que carece de los aminoácidos indispensables para desempeñar su papel en la vía de señalización Wnt; unión a β -catenina (7rep/20aa) y axina (repeticiones de SAMP) Miyoshi et al., 1992 -B-; Karoui M et al, 2007; Minde D et al, 2011).

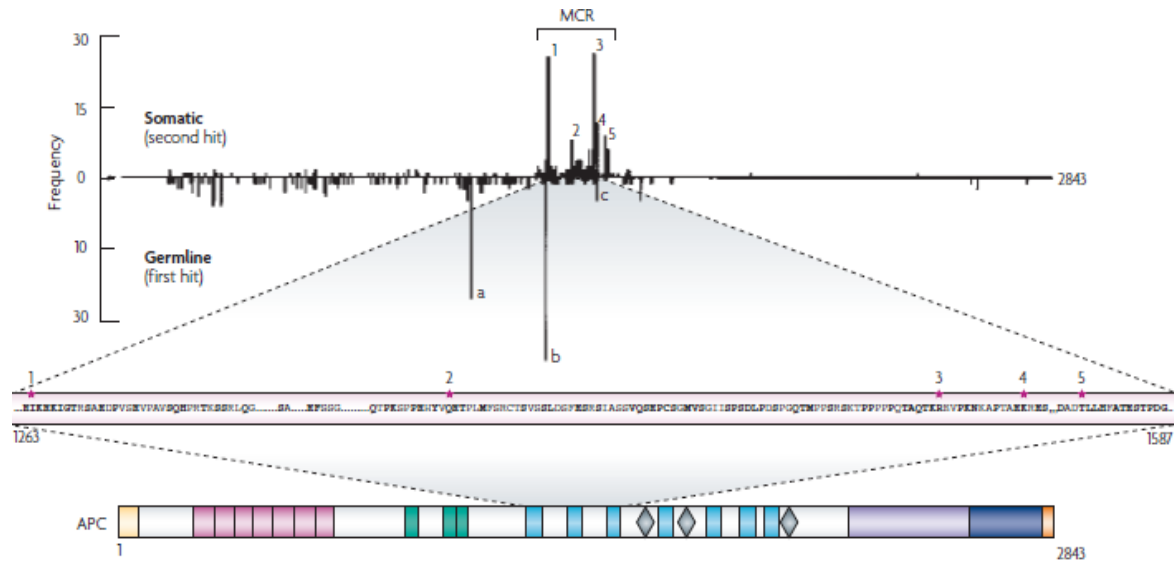


Figure 11. Mutaciones germinales y somáticas de APC en cáncer de colon. Fragmento MCR (codon 1286-1513), sitios “hotspots”; codones1309 y1450 Minde D et al, 2011

Por otra parte, en distintos tipos de cáncer, también se ha observado acumulación nuclear de β -catenina, y esta deslocalización está asociada con mutaciones en el exón 3 de CTNNB1 (serina/treonina; codones 45, 41, 33 y 37) (Kikuchi A et al, 2003; Polaski P, 2007). Entre estos tipos de cáncer se puede mencionar los carcinomas colorectal (Akisik E et al 2011); hepatocelulares (Cieply B et al, 2009); cáncer gástrico (Jang W and Kim W, 2011) y cáncer de páncreas (Gerder B et al, 1999) entre otros.

Alteraciones genéticas han sido igualmente encontradas en otros miembros del complejo multiproteico, como Axina y GSK3, pero con muy poca frecuencia. De esa manera, Salahshor S y Woodgett J (2005) recopilan distintos estudios que muestran la existencia de mutaciones espontáneas en los genes Axins I y II, particularmente hepatocelular y colorrectal Por su parte, Abrahamsson A y colaboradores (2009) encontraron una delección que afectan el dominio quinasa del gen GSK3 en la leucemia



mieloide crónica. Además, por el hecho de existir isoformas de estas proteínas (Axina 1 o 2; GSK3-alfa y beta) las cuales pueden reemplazar la función de la forma mutada Kikuchi A et al, 2003; Polaski P, 2007).

En base a lo descrito anteriormente, varias alteraciones genéticas en la secuencia del ADN de los componentes de la vía Wnt posibilitarían la alteración de las interacciones moleculares normales y, por tanto, podrían llevar a la acumulación nuclear de β -catenina, en la mayoría de los tumores estudiados y, por lo tanto, la anormal activación de la vía Wnt que resulta en el inicio y desarrolla del proceso carcinogénico.

4.2 ALTERACIONES EPIGENÉTICAS EN COMPONENTES DE LA VÍA WNT

Por otro lado, también se han reportado alteraciones epigenéticas, tales como hipermetilación de islas CpG en sus promotores, en varios tipos de cáncer, lo cual podría llevar también al silenciamiento transcripcional de componentes supresores de la vía Wnt (Rodríguez-Paredes y Esteller M, 2011; Serman L et al, 2014). Cabe destacar, que distintos estudios han mostrado la asociación entre hipermetilación anormal de componentes y la activación de la vía Wnt durante el proceso carcinogénico. En este sentido, Laird P y colaboradores. (1995) mostraron que la delección genética y/o inhibición de ADN-metiltransferasa (tratamiento con DAC) reduce la carga tumoral, mientras, Sansom O (2003) y Phesse T (2008) reportaron que la delección genética de MBD2 (proteína de unión a CpG-metilado) también reprime la formación tumoral mediante la atenuación de la señalización de señalización Wnt.

Además, los análisis de promotores hipermetilados mediante estudios de genoma completo en cáncer de colon y páncreas, mostraron que los supresores de la vía de Wnt pueden ser blanco de este mecanismo de silenciamiento génico (Vincent et al 2011; Suzuki et al. 2002). En particular, las regiones promotoras de los genes que codifican para las proteínas APC y sFRP1,2 y 5 (reconocidas como antagonistas), fueron identificados como blanco de la hipermetilación en estos estudios.



En el caso particular de APC, se ha reportado hipermetilación de la isla CpG en el promotor 1A en distintos tipos de cáncer, mientras que la isla CpG en el promotor 1B parece no presentar dicha alteración (Esteller M, et al., 2000). Adicionalmente, la hipermetilación anormal del promotor 1A parece estar acompañada con el silenciamiento de su transcripto (inactivación epigenética) en cáncer hepático, 80%; estómago, 68%; próstata, 58%; pulmón, 30% y mama, 10% (Ohm J et al, 2007). Es importante comentar, que distintos estudios reportan la presencia de dicha alteración epigenética en otros tipos de cáncer, sin embargo, hasta el momento todavía es controversial la asociación entre la hipermetilación y el silenciamiento de APC (Agular O, Estelle M et al, 2007; Rodriguez P, Esteller M et al, 2011).

Por su parte, se ha reportado que los antagonistas de Wnt (miembros de la familia SFRP): SRFP 1, 2 y 5, también presentan hipermetilación en sus genes, en cáncer de colon (Sizuki H, Baylin et al, 2004) y cáncer de mama (Sizuki H., Toyota M. et al, 2008); SRFP1, en vejiga (Stoehr R. et al, 2004), próstata (Lodygin D. et al, 2005), pulmón (Fukui T. et al, 2005). Sin embargo, el posible papel por silenciamiento epigenético de otros miembros de la familia SFRP en la alteración de la vía Wnt continua sin ser explorado, por ejemplo, SRFP3 en melanoma (Ekstrom E et al, 2011). En cada estudio cabe destacar, que la perdida de la función de los distintos miembros de la familia SFRP por CpG's hipermetiladas dentro de la región promotora fue asociada al silenciamiento epigeneticos (desminición de transcriptos), con restauración de la expresión por tratamiento con inhibidores del silenciamiento epigenético (inhibidor de ADN-metiltransferasas: DAC).

4.3 CÁNCER CÉRVICO UTERINO Y ALTERACIONES EN LA VÍA WNT

En el caso particular del cáncer cérvico uterino, es poco lo que se sabe sobre las alteraciones de la vía Wnt y su contribución en el desarrollo del mismo. Sin embargo, Pereira-Suárez y Col. observaron mediante Western blot moderados nivel de expresión de β -catenina presentaron las líneas celulares CaSki (VPH 16) y Calo (VPH 18), mientras que fue bajo en HeLa (VPH 18) y SiHa (VPH 16), nulo en C33A (sin VPH's). Esto permitió postular que los altos niveles de β -catenina sugerían su acumulación, lo cual podría estar relacionado con la alteración de la vía Wnt (Pereira-Suárez et al., 2001).



Posteriormente, se evaluó por inmunohistoquímica la acumulación citoplásmica/nuclear de β -catenina en tumores de cérvix. En cortes de LSIL (lesión intraepitelial de bajo riesgo o NIC 1), HSIL (lesión intraepitelial de bajo riesgo o NIC 2/NIC 3), biopsias de tumores y tejidos de células de cérvix normales, se observó que en LSIL algunas células presentaban acumulación en el citoplasma, mientras que en HSIL más de la mitad de las células la mostraron. En las biopsias de tumores de cérvix, el 85% presentaron acumulación citoplasmática y, aunque más tenue, también acumulación nuclear. Sin embargo, muestras de tejidos normales de cérvix no mostraron acumulación citoplasmática/nuclear de β -catenina (solo se observaba β -catenina en la membrana celular). Todo esto coincide con los antecedentes descritos previamente, donde la acumulación citoplasmática-nuclear de β -catenina es consecuencia de alteraciones de la vía Wnt, llevando a proponer que esto también parece ocurrir en el cáncer cérvico uterino (Shinohara et al., 2001; Rodríguez-Sastre et al., 2005).

Por otra parte, y como consecuencia de la acumulación citoplasmática/nuclear anormal de β -catenina en CaCu, permitió sugerir que el complejo β -catenina/TCF podría inducir la transcripción de genes importantes para el desarrollo y progresión del CaCu. La actividad transcripcional de β -catenina/TCF fue puesta en evidencia en líneas celulares derivadas de cáncer cérvico uterino, empleando el sistema TOP-FOP. En este sistema, la línea celular Caski mostró la mayor actividad transcripcional, seguida de SiHa y HeLa, mientras que C33A no mostró ninguna actividad (Mojica V, 2004; tesis de maestría). Por su parte, Huang y colaboradores (2006) mostraron mediante iRNA para β -catenina, que su interferencia inhibió la formación del complejo β -catenina/TCF en HeLa. Asimismo, se determinaron como genes blanco de este complejo: ciclo-oxigenasa-2, Cox2 (supervivencia celular); metaloproteínasa de matriz-7, MMP-7 (invasión) y el factor de crecimiento del endotelio vascular, VEGF (angiogénesis), genes que se reprimen en presencia del iRNA de β -catenina (Huang et al, 2006).

Por otro lado, un cultivo primario de queratinocitos fue inmortalizado por transfección de la oncoproteína E6 del VPH16. Posteriormente, dichos queratinocitos inmortalizados fueron tratados con ligando Wnt y/o transfectados con el oncogen CTNNB mutado en serina 45, en ambos casos se postula que la activación de la vía Wnt fue suficiente para inducir la transformación de los queratinocitos inmortalizados por la oncoproteína E6 del



HPV16. Por lo anterior, se demostró que β -catenina puede actuar como oncogen alterando la vía Wnt y podría inducir la transformación de células infectadas por VPH en este sistema experimental (Uren A et., 2005). Posteriormente, empleando dos modelos con murinos: 1) transgénicos para los oncogenes E7/HPV-16 o β -catenina mutada (serina 45) y 2) ratones doble-transgénicos para E7/HPV-16 y β -catenina, evaluaron su capacidad para inducir el inicio del proceso carcinogénico a los 6 meses, bajo un estímulo estrogénico. El desarrollo cáncer invasivo se observó en el 11% de los ratones transgénicos del oncogen β -catenina mutada (vía Wnt activa) y 50% de los ratones transgénicos del oncogen E7/HPV-16 (infección viral), mientras que se observó la carcinogénesis en el 94% de los ratones doble-transgénicos para los oncogenes E7/HPV-16// β -catenina (Bulut G, Uren A et., 2011).

A pesar de que varios estudios han sugerido que como sucede en otros tipos de cáncer, en CaCu, la alteración de la vía Wnt puede llevar a la acumulación citoplásmica/nuclear de β -catenina y, esto, puede favorecer la acción carcinogénica de las proteínas de HPV, poco se sabe sobre los mecanismos que conducen a la deslocalización y acumulación citoplásmica-nuclear de β -catenina. Con este objetivo, en estudios previos, se evaluó la presencia de mutaciones en el gen CTNNB (β -catenina) y, principalmente, en residuos serina-treonina del exón 3, que son los sitios de fosforilación para la degradación de la proteína, empleando para esto biopsias de tumores de cérvix. Sin embargo, no se identificaron mutaciones que permitan explicar su deslocalización (Pereira-Suarez et al., 2001; Tsung-Hsien et al., 2003). Esto, permite plantear que la deslocalización de la β -catenina podría ser consecuencia de la alteración de algún otro componente de la vía Wnt.

Cabe destacar, que desde la década pasada distintos grupos de investigación han centrado sus estudios en determinar la existencia de alteraciones epigenéticas en algunos componentes de la vía de señalización Wnt, particularmente hipermetilación de promotor de los genes APC, SFRP's, entre otros (Van der Meide et al, 2011; Kang S, et al, 2006; Yang H, et al 2010) .Sin embargo, ninguno de estos estudios determina la asociación entre la metilación del promotor 1A, la expresión del gen APC y la activación aberrante de la vía de señalización Wnt.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA



Finalmente, nuestro grupo, en un estudio previo (tesis de maestría), realizamos el análisis mutacional en aproximadamente el 80% de la región MCR del gen APC. En este estudio no observamos cambios en la secuencia, la cual incluía dos sitios reconocidos como “hot spot” (codones 1061 y 1450) en el exón 15 del gen APC, en el sistema de cáncer de colon. Sin embargo, dado que no completó el análisis de toda la región MCR, no podía descartarse que hubiera mutaciones en el 20% restante.



*Estudio de las alteraciones de Adenomatous Polyposis Coli;
(componente de la vía de señalización Wnt) en cáncer cervicouterino.*

JUSTIFICACIÓN



El cáncer cérvico uterino (CaCu) es la segunda causa de muerte por tumores malignos en mujeres en México y a nivel mundial, razón por la cual existe un particular interés en el estudio de las causas y factores que provocan esta patología, sobre todo a nivel molecular.

Es de resaltar, que la infección persistente por el Virus del Papiloma Humano es el factor de riesgo más importante para desarrollar CaCu, principalmente debido a la acción de las oncoproteínas E6 y E7, al inactivar los supresores de tumores p53 y pRB. Sin embargo, también se sabe que aunque la degradación de p53 y pRB es suficiente para inmortalizar células, es insuficiente para transformarlas. De ahí que se requiera otro tipo de alteraciones genéticas o epigenéticas que en su conjunto promuevan la transformación maligna de las células del cervix.

Por otra parte, algunos estudios previos asocian frecuentemente la activación anormal de la vía Wnt (acumulación de β -catenina) con alteraciones en el gen supresor tumoral *adenomatous polyposis coli* (APC, en varios tipos de tumores. En este sentido, se ha observado en biopsias y líneas celulares de CaCu la deslocalización y acumulación citoplasmática/nuclear de β -catenina, sugiriendo su participación potencial en la transformación maligna.

Cabe destacar que, aproximadamente, 80-90% de todas las mutaciones en el gen APC se localizan en el segmento MCR ("mutation cluster región"; codones 1286-1513), que dan lugar a una proteína truncada y sin la región de unión con β -catenina, lo que impide su reclutamiento y, posterior degradación. Asimismo, diferentes estudios han evidenciado que la hipermetilación de CpG's en la región promotora del gen APC es otro mecanismo de inactivación de su función en varios tipos de cáncer.

Basándonos en ésta revisión bibliográfica y en resultados obtenidos previamente en el grupo de investigación, se plantea que la alteración en la región codificante o promotora del gen APC permite la acumulación citoplasmática/nuclear anormal de β -catenina y, por tanto, la anormal expresión de genes blanco de la vía Wnt en células de cáncer cervico uterino infectadas con HPV.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA



En ese sentido, el presente estudio constituye un esfuerzo pertinente en el ámbito nacional, dado que pretende identificar moléculas blanco que puedan ser aplicadas en el diagnóstico o pronóstico de la patología, o incluso ser utilizadas con fines terapéuticos.



*Estudio de las alteraciones de Adenomatous Polyposis Coli;
(componente de la vía de señalización Wnt) en cáncer cervicovaginal.*

HIPÓTESIS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA



La pérdida o inactivación funcional (genética o epigenética) del gen APC está asociada con la desregulación de la vía de señalización Wnt/ β -catenina en el cáncer cérvico uterino.



*Estudio de las alteraciones de Adenomatous Polyposis Coli;
(componente de la vía de señalización Wnt) en cáncer cervicovaginal.*

OBJETIVOS



GENERAL

Identificar las alteraciones genéticas y epigenéticas del gen APC y su asociación con la desregulación de la vía de señalización Wnt/ β -catenina en cáncer cérvico uterino.

PARTICULARES

- 1. Identificar las posibles alteraciones en la secuencia de la región de mutaciones “cluster” (MCR) del gen APC, en líneas celulares de cáncer cérvico uterino.***
- 2. Evaluar la relación entre la hipermetilación del ADN en el promotor 1A y su efecto en la expresión del gen APC, en líneas celulares de cáncer cérvico uterino.***
- 3. Evaluar la asociación entre las alteraciones genéticas o epigenéticas del gen APC y la desregulación de vía Wnt/ β -catenina en cáncer cérvico uterino.***



*Estudio de las alteraciones de Adenomatous Polyposis Coli;
(componente de la vía de señalización Wnt) en cáncer cervicovaginal.*

METODOLOGÍA



1.- MUESTRAS DE ESTUDIO

En el presente trabajo se seleccionaron como modelo de estudio las líneas celulares de cáncer cervico uterino CasKi, HeLa, SiHa y C33A, debido a su relación característica con el virus del papiloma humano (VPH) (**Tabla 1**). Por su parte, las líneas celulares SW480 (cáncer de colon) y KATOII (cáncer gástrico) se utilizaron como controles positivos de alteración genéticas y/o epigenéticas, respectivamente (Rowan A, et al, 2000 and Takashi Tsuchiya et al, 2000). Las líneas CasKi, HeLa, C33A y SW480 fueron adquiridas de la compañía ATCC o donadas por el Dr. Alejandro M. García-Carranca (InCan, México), mientras la línea KatoIII (adquirida de la ATCC) fue donada por Dr. Ángel Zarain-Herzberg (UNAM, México). Además, se utilizó como control negativo, el cultivo primario de fibroblastos humanos (HFF) donadas por el M. en C. Alejandro López Saavedra (Incan-México). Las distintas líneas celulares y el cultivo primario fueron mantenidas en las condiciones descritas a cotinuación.

Tabla 1. Muestras de estudio; líneas de cáncer cervico uterino.

Líneas celulares	Virus del papiloma humano (VPH)	Características
Caski	Tipo 16	Línea celular de carcinoma.
HeLa	Tipo 18	Línea celular de adenocarcinoma.
SiHa	Tipo 16	Línea celular de adenocarcinoma.
C33A	Sin VPH's	Línea celular de carcinoma.

Por otra parte, biopsias de tejido normal y de cáncer cervico uterino fueron obtenidos del banco del Departamento de Ginecología del Hospital General Manuel Gea Gonzalez y del Departamento de Patología del Instituto Nacional de Cancerología-SSA (CDMX, Mexico). Las biopsias fueron caracterizadas previamente en base a sus parámetros clínicos-patológicos, tipo de infección con VPH y niveles/localización de β -catenina (Rodríguez-Sastre et al., 2005). Todas las biopsias fueron almacenadas en nitrógeno líquido hasta su empleo.



2.- PROCEDIMIENTOS GENERALES

Cultivo celular:

El mantenimiento y crecimiento de las líneas celulares y el cultivo primario, se realizó en cajas de p100 mm (Corning) a 37° C con 85% de humedad y 5% de CO₂, en medio de cultivo enriquecido con suero fetal bovino (SFB; HyClone);

- A) SiHa, HeLa, C33A y SW480: medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM-F12; Invitrogen) con 10% SFB.
- B) CaSki: medio RPMI 1640 (Invitrogen) con 10% SFB.
- C) Kat0III: medio de una mezcla con 50 % de DMEM-F12 (Invitrogen) y 50% de RPMI 1640 (Invitrogen) con 20% SFB.
- D) Cultivo primario de fibroblastos: medio de una mezcla con 50 % de DMEM-F12 (Invitrogen) y 50% de DMEM/High Glucose(Invitrogen) con 15 % SFB.

Todos los medios referidos, previo a su suplementación con SFB, fueron esterilizados por filtración (membrana 0.22 µm; Milipore) y almacenados a 4°C hasta su empleo.

El conteo de células se realiza empleando una cámara de Neubauer, a la cual se adiciona 10 µL de la solución de dilución celular. Se cuentan las células en los 4 cuadrantes y se aplica la siguiente fórmula:

$$Z = (Cc/4) (10000) (3) (VR) = \text{No. de células/mL}$$

Donde: Cc= número de células contadas en los 4 cuadrantes de la cámara. VR= Volumen de resuspensión

Para los experimentos de obtención de ADN-genómico, ARN-total y Proteínas-totales se cultivan las células en cajas p60 mm (Corning) a un 70%-90% de confluencia. Por otro lado, para los ensayos de microscopia se cultivan en slide p4, mientras, para los



ensayos de citotoxicidad en cajas de 98 pozos, en ambos casos con un número determinado de células.

Obtención y Purificación de ADN-genómico y ARN's-totales:

El ADN-genómico se obtuvo de todas las muestras, en el caso del cultivo primario de fibroblastos y las distintas líneas celulares, mantenidas hasta alcanzar una confluencia de entre el 80- 90 % en cajas de cultivo p60 mm (Corning). Previo a la lisis celular, las células adheridas a la superficie de la caja de cultivo, fueron lavadas con PBS estéril.

La extracción de ADN se realizó por lisis celular, usando 300 μ l (para cajas de 60 mm) o 700 μ l (para cajas de 100 mm) de solución de lisis (EDTA, Tris-HCl, SDS y proteinasa K) y posterior precipitación, según el protocolo Fenol/Cloroformo estándar modificado. Posteriormente, se cuantificó el ADN por espectrofotometría/UV.

Por otro lado, el RNA's total se obtuvo del cultivo primario de fibroblastos y líneas celulares (excepto SW480), mantenidas hasta alcanzar una confluencia de aproximadamente el 80 % en cajas de cultivo p60 mm (Corning). Previo a la lisis celular, las células adheridas a la superficie de la caja de cultivo, fueron lavadas con PBS estéril. La extracción de ARN se realizó mediante Trizol de acuerdo a las instrucciones del proveedor (Gibco BRL). Posteriormente, se cuantificó el ARN por el sistema Nanodrop. Finalmente, para analizar la integridad del ADN y ARN purificados, se separó una muestra de los mismos por electroforesis en agarosa.

3.- TÉCNICAS PARA DETERMINAR ALTERACIONES GENÉTICAS

Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR):

Una vez obtenido y cuantificado el ADN-genómico de las líneas celulares de cáncer cervicouterino (HeLa, SiHa, CaSki y C33A) y cáncer de colon (SW480), se



amplificó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) un segmento (codones 1230-1449; nucleótidos 3847-4655 pb y 151762-152570 pb, cDNA/ARN-referencia y ADN-genómico, respectivamente) que representa aproximadamente el 60 % de la región de mutaciones “cluster” (MCR; 1286-1513), ubicada en el exón 15 del gen APC. La secuencia de aminoácidos y nucleótidos de este segmento (P25054; NM-001127511.2 y NG-008481) fue obtenida de la base de datos del “National Center for Biotechnology Information” (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

La amplificación por PCR del producto de 808 pb se realizó con la secuencia de primers sentido (5'- CCC-CTC-GAG-**CAG-CTC-CAT-CCA-AG** -3') y antisentido (5'- CC-GGA-TCC-**CCA-TCT-GGA-GTA-C** -3'), mediante ensayos en reacciones a un volumen de 10 µl con 100ng de ADN genómico, 0.25mM de cada primer usando *Taq* DNA Polymerase-recombinat (Fermentas, Thermo S.); modificando las concentraciones de MgCl₂ (1.0 a 5.0 mM) y la temperatura de hibridación (**58°-68°C**).

Una vez establecidas las condiciones, el fragmento ubicado en la secuencia MCR del gen APC fue amplificado a partir del ADN-genómico de la muestras, en reacciones de PCR a un volumen de 200 µl (para posterior digestión y purificación), siguiendo las concentraciones y componentes descritas en la **Tabla 2** y las siguientes condiciones de amplificación: 5 min para pre-desnaturalizar a 95°C, 1 min a 95°C para desnaturalización, 1 min a 63°C para alinear, 2 min a 72°C para elongar y 5 min a 72°C para elongación final.

Tabla 2. Componentes y concentraciones de una reacción de PCR.

Reactivos	Concentración
Buffer PCR	1X
MgCl ₂	2 mM
dNTPs	2 mM
Oligonucleótidos F (sentido) y R (antisentido)	20 pmol
Taq polimerasa	2U
ADN	100-200 ng
H ₂ O	cbp



Como control de la técnica de PCR, se amplificó el gen de β -globina de las mismas muestras, según el protocolo de Thomas J (2006), empleando los oligonucleótidos: Fw 5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3' y Rv 5'-GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC-3'.

Para confirmar el tamaño de los distintos productos de amplificación, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1 % y se compararon los fragmentos separados con los del marcador de peso molecular (1 kb plus DNA ladder, Invitrogen).

Purificación y análisis de digestión a fragmentos amplificados:

Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en gel de agarosa (2.0%) y aislados mediante el kit GeneJET Gel Extraction Kit (Fermentas #k0691), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El protocolo del QIAquick Gel Extractio permite extraer y purificar ADN de 70 pb a 10 Kb de geles de agarosa en Buffer TAE, que puede ser utilizado para subsecuentes aplicaciones, digestiones enzimáticas, ligación, PCR y secuenciación.

Posteriormente, la secuencia de nucleótidos del fragmento se analizó con el programa NEBcutter V2.0, disponible públicamente en el sitio de Internet <http://tools.neb.com/NEBcutter2>. El programa permitió seleccionar dos enzimas de restricción PvuII (CGA-CTG) y PstI (TTA-TAA), que permite confirmar que los fragmentos obtenidos son los de interés, en función del perfil de digestión observado en una electroforesis en gel de agarosa. Finalmente, confirmada la secuencia por este análisis, se procedió a realizar la secuenciación de los productos amplificados en el Instituto Nacional de Cancerología.

Análisis mutacional:

Se secuenciaron los fragmentos ubicados en la región MCR del gen APC, de cada una de las líneas celulares mediante el sistema automático Applied BioSystem (INCan).



Para la secuenciación se utilizó el Kit v3.1 ABI BigDye Terminator (ABI, Foster City, CA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Las reacciones de secuenciación se realizaron en dirección sentido y antisentido por duplicado y de dos PCR independientes, generando cromatogramas que se analizaron para la búsqueda de mutaciones.

Posteriormente, las secuencias obtenidas se comparan con la región del exón 15 del gen APC (codones 1230-1449 -- P25054 -- ; nucleótidos 3847-4655 pb y 151762-152570 pb, cDNA/ARN-referencia -- NM-001127511.2 -- y ADN-genómico --NG-008481--, respectivamente) presente en la base de datos del "National Center for Biotechnology Information" (NCBI), mediante el programa "BLAST *Basic Local Alignment Search Tool*" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>), que permitió la determinación de posibles mutaciones.

4.- TÉCNICAS PARA DETERMINAR ALTERACIONES EPIGENÉTICAS

Analisis de metilación específica por PCR (MSP):

Una vez obtenido y cuantificado el ADN-genómico de las distintas muestras, el ADN del cultivo primario de fibroblastos (HFF), líneas celulares de cáncer (excepto SW480) y biopsias (tejido normal y tumores de cáncer) de cervico uterino fueron sometido a modificación por bisulfito de sodio para convertir las citosinas no metiladas en uracilo, utilizando el kit EZ DNA methylation (Zymo Research, Orange, CA) según especificaciones de fabricante.

Para el análisis de metilación específica por PCR (MSP) del promotor 1A (GenBank accession no. AC008575) del gen APC se utilizaron primers (sentido 5'-GTGTTTTATTGTGGAGTGTTGGT-3'; antisentido 5'-CCAATCAACAACTCCCAACAA) que amplifican la secuencia no metilada de 110-pb (posición 27098 a 27205), y primers (sentido 5'-TATTGCGGAGTGCGGGTC-3';



antisentido 5'- TCGACGAACTCCCGACGAA-3') que amplifican la secuencia metilada 100-bp (posición 27104 a 27201). Las condiciones de amplificación fueron 5 min para pre-desnaturalizar a 95°C, 1 min a 95°C para desnaturalización, 40 seg a 60°C para alinear, 1 min a 72°C para elongar y 4 min a 72°C para elongación final. La PCR fue realizada a un volumen de 50 µl con 100ng de ADN genómico, 0.25mM de cada primer usando *Taq* DNA Polymerase-recombinat (Fermentas, Thermo S.). Cada experimento se realizó por duplicado de forma independiente.

Para confirmar el tamaño de los distintos productos de amplificación, se realizó una electroforesis en gel de agarosa y se compararon los fragmentos separados con los de marcador de peso molecular (1 kb plus DNA ladder, Invitrogen).

RT-PCR (semicuantitativa):

Para examinar los niveles de expresión de transcritos del gen APC en las distintas líneas celulares (HeLa, SiHa, CaSki, C33A y Kat0III) y el cultivo primario de fibroblastos (HFF) se realizó la técnica de RT-PCR (semicuantitativa). A partir del ARN total obtenido de cada muestra mediante Trizol, anteriormente mencionado; 5 µl de ARN total fueron utilizados en cada reacción con el Kit RevertAid H. Minus First Strand cDNA Synthesis (Fermentas, Thermo S.).

Posteriormente, el cDNA de las distintas muestras se utilizó para la amplificación final de transcritos del gen APC (fragmento ubicado en el exón 15) por PCR, mediante los pares de primers sentido (5'- CCC-CTC-GAG-TCA-GAT-GAG-CAG-TTG-3') y antisentido (5'- CCG-GAT-CCC-TGC-TTC-CTG-TGT-CG -3'), que producen un segmento de 808 pb. Las condiciones de amplificación fueron optimizadas en reacciones de 10 µl con 2 µl de cDNA en el mix, 0.25mM de cada primer usando *Taq* DNA Polymerase-recombinat (Fermentas, Thermo S.); modificando las concentraciones de MgCl₂ y la temperatura de hibridación. Una vez establecidas las condiciones óptimas para la PCR, el fragmento fue amplificado bajo las siguientes condiciones: 5 min para pre-desnaturalizar a 95°C, 1 min a 95°C para desnaturalización, 1 min a 54°C para alinear, 2 min a 72°C para elongar y 5 min a 72°C para elongación final, en reacciones de PCR a un volumen de 20 µl. Como control interno, beta-globina fue amplificado (técnica de PCR anteriormente



descrita; secuencia de primers, componentes y condiciones) para evaluar la calidad y cantidad del cDNA en cada RT-PCR.

Para confirmar el tamaño de los distintos productos de amplificación, se realizó una electroforesis en gel de agarosa y se compararon los fragmentos separados con los de marcador de peso molecular (1 kb plus DNA ladder, Invitrogen). La visualización de cada banda fue en una imagen documentada con ChemXRS de Bio Rad con luz UV.

Por otra parte, con la finalidad de corroborar nuestros resultados de la RT-PCR con sus respectivos controles para la expresión del gen APC, este procedimiento se realizó por triplicado en las líneas celulares, y se realizó su análisis de densitometría de bandas con el software Image Lab de BioRad. Una vez obtenidos los datos se realizó un análisis estadístico de ANOVA y posteriormente se empleó la prueba de Tukey para comparar si existe diferencia significativa entre los grupos.

Tratamiento con 5-aza-2'-deoxycytidine/trichostatin-A (DAC/TSA):

Una vez determinada la asociación entre la hipermetilación en el promotor 1A y la pérdida de expresión del gen APC, como un mecanismo de silenciamiento epigenético, se procedió a realizar la evaluación del control de la transcripción del gen APC, tratando las distintas líneas celulares con 5-aza-2'-deoxycytidine o 5-aza-dC (DAC) y Trichostatin-A (TSA) que son inhibidores de las ADN metiltransferasas y desacetilasas de histonas, respectivamente. Primeramente, nosotros examinamos el posible efecto citotóxico, para después, evaluar la factibilidad del tratamiento con DAC 3 μ M y TSA 0.5 μ M, en las distintas muestras de forma similar a lo descrito por Cameron E, Herman J y Baylin S (1999) y Issa Jean-Pierre J y colaboradores. (2007).

Estudio citotóxico del tratamiento DAC/TSA por el método de cristal violeta:

Las líneas celulares fueron cultivadas en caja de 96 pozos (6000-8000 células/pozo con 100 microlitros de medio de cultivo), posteriormente, a las 24 hrs el medio se suplemento con concentraciones de 0.3, 3, 30 μ M de DAC, las posteriores 48 y 72 hrs se agrega a las distintas concentraciones de DAC una concentración de TSA a 0.5 μ M.



Durante este periodo, se cambia cada 24 hrs el medio de cultivo y se suplementa con las distintas concentraciones de DAC y/o TSA (previamente esterilizadas las diluciones por filtración, con filtros de 0.45µm). El control contuvo sólo medio de cultivo durante el tratamiento.

Posteriormente, a las 96 hrs se evalúa la viabilidad celular determinando el número de células por poso, mediante el método de cristal violeta. En cada poso de la placa se eliminó el sobrenadante y se realizó 2 lavados con PBS estéril, se adicionaron 100 µl de formol al 10 % y se conservó la placa por 24 horas en refrigeración. Después, se retiró el formol y se realizaron 2 lavados en PBS estéril, se agregaron 100 µl de cristal violeta al 0.01%, se colocó la placa en un agitador orbital por 10 min. A continuación, se realizaron 2 lavados con PBS estéril y se agregaron 100 µl de ácido acético al 33 %. Finalmente, se determinó la densidad óptica a 550 nm de la placa completa, en el lector de placas de ELISA (Bio Rad, Ultramark).

La determinación del porcentaje de inhibición del crecimiento celular fue calculado a las diferentes concentraciones de DAC (0.3, 3, 30 µM) con TSA a 0.5 µM usando la siguiente fórmula (Joubert, 1980):

$$I = 100 (1 - Ne/nc)$$

Donde: I = % de inhibición del crecimiento, Ne = densidad celular expuesta, Nc = densidad celular del control.

En el ensayo cada concentración de DAC (0.3, 3, 30 µM) con TSA a 0.5 µM se realiza por triplicado en las líneas celulares, y se repitió tres veces. Los datos fueron analizados mediante la prueba estadística ANOVA y prueba de "t" Student con el paquete computacional Prisma v5.0 (Graphpad Inc.). Los resultados del ensayo de citotoxicidad fueron analizados para determinar la EC₅₀ al tratamiento con DAC/TSA en cada línea celular.

Tratamiento DAC/TSA en las líneas celulares:

Una vez determinado el posible efecto citotóxico y factibilidad al tratamiento con DAC/TSA, se procedió a realizar el siguiente esquema de tratamiento, similar a lo descrito



por Cameron E, Herman J y Baylin S (1999) y Issa Jean-Pierre J y colaboradores. (2007): las células fueron cultivadas (día 0) y el medio de cultivo es suplementado a las cada 24 hrs con una concentración de DAC 3 μM , las posteriores 48 y 72 hrs con una concentración de DAC 3 μM y TSA 0.5 μM . Durante este periodo, se cambió cada 24 hrs el medio de cultivo y se agregó ambas concentraciones de DAC/TSA. Por último, a las 96 hrs se realizó los experimentos correspondientes; RT-PCR, inmunoblot e inmunohistoquímica.

RT-PCR (semicuantitativa) con/sin DAC-TSA:

Para examinar los niveles de expresión de transcritos del gen APC en las distintas líneas celulares (HeLa, SiHa, CaSki, C33A y Kat0III) y el cultivo primario de fibroblastos, bajo el tratamiento DAC/TSA (inhibidores de ADN metiltransferasas y desacetilasas de histonas, respectivamente) y en condiciones normales, nosotros realizamos la técnica de RT-PCR (semicuantitativa). A partir del ARN total obtenido y convertido a cDNA mediante Trizol y con el Kit RevertAid H. Minus First Strand cDNA Synthesis (Fermentas, Thermo S.), respectivamente, nosotros amplificamos el transcripto del gen APC (fragmento ubicado en el exón 15) por PCR, mediante las condiciones descritas anteriormente. Además, como control interno, beta-globina fue amplificado (técnica de PCR anteriormente descrita; secuencia de primers, componentes y condiciones) para evaluar la calidad y cantidad del cDNA en cada RT-PCR.

Para confirmar el tamaño de los distintos productos amplificados, se realizó una electroforesis en gel de agarosa y se comparan los fragmentos separados con los del marcadores de peso molecular (1 kb plus DNA ladder, Invitrogen). La densidad de cada banda en la RT-PCR fue determinada por escaneo con densitometría usando Quantity One 4.1 (Bio-Rad).



5.- TÉCNICAS PARA ESTABLECER LA ASOCIACIÓN ENTRE LAS ALTERACIONES DE APC Y LA REGULACIÓN DE LA VÍA WNT/ β -CATENINA

Western-blot (W.B.):

Para examinar los niveles de expresión de β -catenin en las distintas líneas celulares (HeLa, CaSki, C33A y Kat0III) y el cultivo primario de fibroblastos (HFF), bajo el tratamiento DAC/TSA y sin tratamiento, nosotros realizamos la técnica de W.B.

Obtención y cuantificación de proteínas totales:

Las proteínas totales fueron obtenidas del cultivo primario de fibroblastos y líneas celulares, mantenidas en condiciones normales (sin tratamiento) y bajo el tratamiento con DAC/TSA (descrito anteriormente), en cajas de cultivo p60 mm (Corning). Previo a la lisis celular, las células adheridas a la superficie de la caja de cultivo, fueron lavadas con PBS estéril. La extracción de proteínas se realizó con buffer RIPA (con mix de inhibidores de proteasas --2 mg/ml de leupeptin y aprotinin (Sigma, St Louis, MO, USA), 1 mg/ml pepstatin A (Sigma, St Louis, MO, USA), 200 mg/ml de Pefabloc (Roche). Posteriormente, la concentración de proteína se determinó, mediante el método de Bradford a 590 nm con el Kit BCA protein assay (Pierce) usando el Kit BCA protein assay (Pierce).

Electroforesis y Transferencia:

Una vez obtenidas y cuantificadas las proteínas totales, 15 μ g de proteínas de cada muestra fueron separados por electroforesis en gel de acrilamida (SDS-PAGE) al 15%; primero a 40 volts durante 15 min., posteriormente a 100-120 volts durante 1 hora. Al término de la electroforesis, se realizó la transferencia a una membrana de nitrocelulosa (immobilon) (The panther; semidry electroblotter (Apogent).

Inmunodetección:

La membrana con las proteínas totales de cada muestra separadas y transferidas, fue incubada en una solución 1:2000 con el anticuerpo primario β -catenina (monoclonal;



Transduction lab-B.D.Pharmingen #619154). El anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa fue usado para revelar con el Kit Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin Elmer, Life Sciences). Para confirmar que cantidades similares de proteína fueron cargadas en cada carril, se determinó los niveles de alfa-actina como un control interno con 1:1500 anticuerpo alfa-actina (monoclonal; Santa Cruz #sc8432). La densidad de cada banda en el Western-blot fue determinada por escaneo con densitometría usando Quantity One 4.1 (Bio-Rad).

Inmunohistoquímica (IHC):

Para detectar la localización de β -catenina en las distintas líneas celulares (HeLa, CaSki, C33A y Kat0III) y el cultivo primario de fibroblastos (HFF), bajo el tratamiento con tratamiento DAC/TSA y sin tratamiento, nosotros realizamos la técnica de IHC. Las líneas celulares fueron mantenidas en condiciones normales (sin tratamiento) y bajo el tratamiento con DAC/TSA (descrito anteriormente), en "slider" de cuatro pozos (p4). Posteriormente, las células adheridas a la superficie de la caja de cultivo, fueron lavadas con PBS estéril y fijadas con metanol:acetona (1:1), después, se incuban con una solución 1:400 de anti- β -catenina monoclonal (monoclonal; Transduction lab-B.D.Pharmingen #619154). Finalmente, se utiliza el Kit DAB HistoMouseMax (Zymed) para ser examinadas utilizando un microscopio de fluorescencia (nikon, eclipse 400) en cajas de cultivo p60 mm (Corning).

RT-PCR (semicuantitativa):

Para examinar los niveles de expresión de transcritos de los genes VEGF y MMP7 (blancos de la vía de señalización Wnt) en las distintas líneas celulares (HeLa, CaSki, C33A y Kat0III) y el cultivo primario de fibroblastos (HFF), bajo el tratamiento DAC/TSA y sin tratamiento, se realizó la técnica de RT-PCR (semicuantitativa). A partir del ARN total obtenido de cada muestra mediante Trizol, anteriormente mencionado; 5 μ g de ARN total fueron utilizados en cada reacción con el Kit RevertAid H. Minus First Strand cDNA Synthesis (Fermentas, Thermo S.). Posteriormente, 2 μ l del mix diluido de cDNA se utilizó para la amplificación final por PCR a un volumen de reacción final de 20



µl. La amplificación de segmentos de los genes VEGF y MMP7 se realizó con los pares de primers mostrados en la **Tabla 3**.

Tabla 3: Secuencia de primers para RT-PCR.

Gen	Sentido 5'-- 3'	Antisentido 5'--- 3'	Tamaño; pb
MMP7	TGTTAAACTCCCGCGTCATA	GCGTTCATCCTCATCGAAGT	379
VEGF	GAGGGCAGAATCATCACGAA	AACGCTCCAGGACTTATACC	395

Las condiciones óptimas para la amplificación de los fragmentos se ensayaron en reacciones de 10 µl con 100ng de ADN genómico, 0.25mM de cada primer usando *Taq* DNA Polymerase-recombinat (Fermentas, Thermo S.); modificando las concentraciones de MgCl₂ y la temperatura de hibridación. Una vez establecidas las condiciones óptimas para cada uno de los fragmentos de los genes VEGF y MMP7, estos fragmentos fueron amplificados bajo las siguientes condiciones: 5 min para pre-desnaturalizar a 95°C, 1 min a 95°C para desnaturalización, 1 min a 62°C y 58°C (respectivamente para cada gen) para alinear, 2 min a 72°C para elongar y 5 min a 72°C para elongación final, en reacciones de PCR a un volumen de 25 µl. Como control interno, beta-globina fue amplificado (técnica de PCR anteriormente descrita; secuencia de primers, componentes y condiciones) para evaluar la calidad y cantidad del cDNA en cada RT-PCR. Para confirmar el tamaño de los distintos productos amplificados, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1 % y se comparó los fragmentos separados con los del marcadores de peso molecular (1 kb plus DNA ladder, Invitrogen).



*Estudio de las alteraciones de Adenomatous Polyposis Coli;
(componente de la vía de señalización Wnt) en cáncer cervicovaginal.*

RESULTADOS



1.- Alteraciones en la secuencia de la región de mutaciones “cluster” (MCR) del gen APC, en líneas celulares de cáncer cérvico uterino.

Amplificación y digestión de la secuencia (ubicada en la región MCR) del gen APC:

Inicialmente, para determinar la factibilidad de utilizar este ADN genómico (**Figura S1**, Suplemento 1; **ANEXO II**) como molde para amplificar fragmentos específicos por PCR, se empleó como control positivo, la amplificación de un fragmento del gen de la β -globina a partir del ADN de las 5 líneas celulares antes descritas. Como se observa en la **Figura S2** (Suplemento 2; **ANEXO II**), todas las muestras fueron positivas para la amplificación de un fragmento de 265 pb, peso esperado para el fragmento de la β -globina. Por todo lo anterior, se puede comentar que la pureza del ADN-genómico de las muestras permitirá su uso en subsecuentes aplicaciones; PCR, digestiones enzimáticas y secuenciación.

Posteriormente, se establecieron las condiciones de PCR para la amplificación de un segmento que representa aproximadamente el 80% de la región MCR del gen APC, a partir del ADN genómico de todas las líneas celulares. Las condiciones fueron optimizadas empleando el ADN genómico de la línea celular C33A, en reacciones de 10 μ l. Además, el fragmento de aproximadamente 800 pb del gen APC, se amplificó por medio del programa APCGRANW15 (95°C x 1 min, desnaturalización; 56°C a 66°C por 1 min, alineación; 72°C x 5 min, elongación; por 35 ciclos), el cual se desarrolló con un gradiente de temperatura de alineación.

Como se observa en la **Figura 12**, la temperatura para la alineación de 63°C, fue la que permitió obtener el producto de amplificación de los 809 pb con la menor presencia de subproductos a la concentración de 2.5Mm de $MgCl_2$.

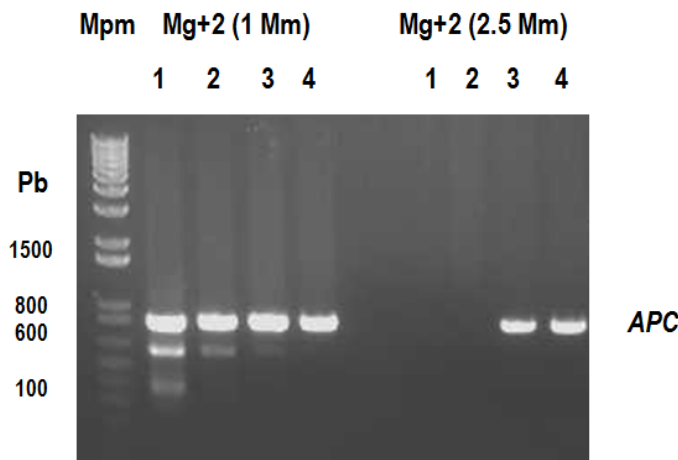


Figura 12. Amplificación del fragmento localizado en la región MCR del gen APC. Producto amplificado de 809 pb por PCR a partir del ADN-genómico de la línea celular de cáncer cérvico uterino C33A. Amplificados del lado izquierdo y derecho con distintas concentraciones de Mg+2 (cofactor, magnesio). Distintas temperaturas de alineación: números 1 (56°C), 2 (58°C), 3 (60°C) y 4 (63°C). Mpm= marcador de peso molecular.

Posteriormente, de acuerdo a las condiciones anteriores, se amplificó el fragmento para las líneas celulares restantes: Caski, Hela, SiHa y SW480. Estas líneas presentaron un patrón similar de amplificación para el fragmento de interés del gen APC, al de C33A previamente mostrado. Además, los productos amplificados de las distintas líneas fueron purificados mediante el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen®).

Finalmente, con el objetivo de validar que la secuencia de nucleótidos amplificada y purificada fuese la de interés, se realizó una digestión con las enzimas de restricción: PvuII (CAG-CTG; un corte en 565 pb) y PstI (TTA-TAA; dos cortes 160 y 259 pb). En la **Figura 13**, se observa el patrón de digestión para el fragmento de interés del gen APC de la línea celular C33A, presentando los fragmentos de acuerdo con lo esperado para cada enzima. Se presenta dos fragmentos de menor tamaño por el único corte de la enzima PvuII (Carril 2) comparado con el fragmento completo sin la presencia de la enzima (carril 3), mientras, que se observan varios fragmentos de menor tamaño por el doble corte de la enzima PstI (carril 4) comparado a la muestra sin enzima (carril 5).



FACULTAD DE FARMACIA

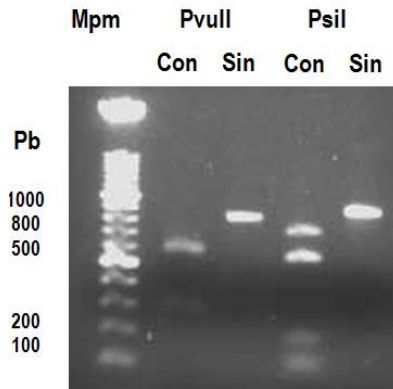


Figura 13. Digestión del amplificado de la región MCR del gen APC. Producto de 809 pb por PCR del ADN-genómico de la línea celular de cáncer cervico uterino C33A. Carril 1, marcador de peso molecular (Mpm); Carril 2, producto de amplificación con enzima PvuII; Carril 3 producto de amplificación sin enzima PvuII; Carril 4, producto de amplificación con enzima PstI; Carril 5 producto de amplificación sin enzima PstI.

En base a los resultados anteriores, se procedió a secuenciar el fragmento de todas las líneas celulares, por tratarse del segmento de interés; la secuencia correspondiente a los nucleótidos 3847-4655 pb y 151762-152570 pb (cDNA/ARN-referencia -- NM-001127511.2 -- y ADN-genómico --NG-008481--, respectivamente) en la región MCR del gen APC.

Secuenciación, análisis y comparación de la secuencia (ubicada en la región MCR) del gen APC:

El fragmento amplificado y purificado que corresponde a la región MCR del gen APC, obtenido a partir del ADN de cada una de las líneas celulares (Caski, SiHa, HeLa, C33A y SW480), fue secuenciado de acuerdo a las condiciones descritas en Material y Métodos, empleando el sistema automático Applied BioSystem. Las reacciones de secuenciación de cada fragmento se realizaron en dirección sentido y antisentido. Las reacciones de secuenciación de cada uno de los fragmentos de la región dividida de las distintas muestras se realizaron en dirección tanto sentido como antisentido. Los cromatogramas obtenidos de las secuenciaciones, se analizaron y compararon con la secuencia obtenida con la base de datos NCBi mediante el programa "BLAST Basic Local



Alignment Search Tool”, que permito su alineamiento para determinar posibles mutaciones.

La **Figura 14** muestra la alineación de la secuencia del fragmento amplificado, purificado y secuenciado de la línea celular de cáncer cérvico uterino C33A con la secuencia 001127511.2 (cDNA/ARN-referencia) reportada por la base de datos NCBI, correspondiente al gen APC (NG-008481, ADN-genómico) localizado en el cromosoma 5 (NC-000005.9, ADN-genómico). Cabe comentar, que la secuencia del fragmento de las distintas muestras también fue alineada, correspondiendo de la misma manera a la secuencia reportada.

Homo sapiens adenomatous polyposis coli (APC), RefSeqGene (LRG_130) on chromosome 5 Sequence ID: <u>refNG_008481.4</u> Related Information; range 1: 151762 to 152570 (GenBank)					
Alignment statistics for match #1					
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
1495 bits(809)	0.0()	809/809(100%)	0/809(0%)	Plus/Plus	
Features:					
Query 1	CAGCTCCATCCAAGTCTGCACAGAGTAGAAGTGGTCAGCCTCAAAGGCTGCCACTTGC	60			
Sbjct 151762	CAGCTCCATCCAAGTCTGCACAGAGTAGAAGTGGTCAGCCTCAAAGGCTGCCACTTGC	151821			
Query 61	AAAGTTTCTTCTATTAACCAAGAAACAATACAGACTTATTGTGTAGAAGATACTCCAATA	120			
Sbjct 151822	AAAGTTTCTTCTATTAACCAAGAAACAATACAGACTTATTGTGTAGAAGATACTCCAATA	151881			
Query 121	TGTTTTTCAAGATGTAGTTCATTATCATCTTTGTCATCAGCTGAAGATGAAATAGGATGT	180			
Sbjct 151882	TGTTTTTCAAGATGTAGTTCATTATCATCTTTGTCATCAGCTGAAGATGAAATAGGATGT	151941			
Query 181	AATCAGACGACACAGGAAGCAGATTCTGCTAATACCTGCAAATAGCAGAAATAAAAGAA	240			
Sbjct 151942	AATCAGACGACACAGGAAGCAGATTCTGCTAATACCTGCAAATAGCAGAAATAAAAGAA	152001			
Query 241	AAGATTGGAAGTAGGTCAGCTGAAGATCCTGTGAGCGAAGTCCAGCAGTGTACAGCAC	300			
Sbjct 152002	AAGATTGGAAGTAGGTCAGCTGAAGATCCTGTGAGCGAAGTCCAGCAGTGTACAGCAC	152061			
Query 301	CCTAGAACCAAATCCAGCAGACTGCAGGGTTCTAGTTTATCTTCAGAATCAGCCAGGCAC	360			
Sbjct 152062	CCTAGAACCAAATCCAGCAGACTGCAGGGTTCTAGTTTATCTTCAGAATCAGCCAGGCAC	152121			
Query 361	AAAGCTGTTGAATTTTCTTCAGGAGCGAAATCTCCCTCCAAAAGTGGTGCTCAGACACCC	420			
Sbjct 152122	AAAGCTGTTGAATTTTCTTCAGGAGCGAAATCTCCCTCCAAAAGTGGTGCTCAGACACCC	152181			
Query 421	AAAAGTCCACCTGAACACTATGTTCCAGGAGACCCACTCATGTTTAGCAGATGTACTTCT	480			
Sbjct 152182	AAAAGTCCACCTGAACACTATGTTCCAGGAGACCCACTCATGTTTAGCAGATGTACTTCT	152241			
Query 481	GTCAGTTCACCTTGATAGTTTTGAGAGTCGTTTCGATTGCCAGCTCCGTTCCAGAGTGAACCA	540			
Sbjct 152242	GTCAGTTCACCTTGATAGTTTTGAGAGTCGTTTCGATTGCCAGCTCCGTTCCAGAGTGAACCA	152301			
Query 541	TGCAGTGGAAATGGTAAGTGGCATTATAAGCCCCAGTGATCTTCCAGATAGCCCTGGACAA	600			
Sbjct 152302	TGCAGTGGAAATGGTAAGTGGCATTATAAGCCCCAGTGATCTTCCAGATAGCCCTGGACAA	152361			



Query	601	ACCATGCCACCAAGCAGAAGTAAACACCTCCACCACCTCCTCAAACAGCTCAAACCAAG	660
Sbjct	152362	ACCATGCCACCAAGCAGAAGTAAACACCTCCACCACCTCCTCAAACAGCTCAAACCAAG	152421
Query	661	CGAGAAGTACCTAAAAATAAAGCACCTACTGCTGAAAAGAGAGAGAGTGGACCTAAGCAA	720
Sbjct	152422	CGAGAAGTACCTAAAAATAAAGCACCTACTGCTGAAAAGAGAGAGAGTGGACCTAAGCAA	152481
Query	721	GCTGCAGTAAATGCTGCAGTTCAGAGGGTCCAGGTTCTTCCAGATGCTGATACTTTATTA	780
Sbjct	152482	GCTGCAGTAAATGCTGCAGTTCAGAGGGTCCAGGTTCTTCCAGATGCTGATACTTTATTA	152541
Query	781	CATTTTGCCACGGAAAGTACTCCAGATGG	809
Sbjct	152542	CATTTTGCCACGGAAAGTACTCCAGATGG	152570

Figura 14. Alineación de la secuencia del fragmento amplificado y secuenciado con la reportada por la base de datos NCBI. Secuencia analizada de los productos de PCR de fragmento de la región MCR del gen APC obtenido a partir del ADN genómico la línea celular de cáncer cérvico uterino C33A. Alineación con el programa “BLAST Basic Local Alignment Search Tool” para corroborar su localización.

Posteriormente, los cromatogramas obtenidos del fragmento secuenciado de las líneas celulares de cáncer cérvico uterino (HeLa, SiHa, CaSki y C33A) fueron comparados con los obtenidos de la línea celular de cáncer de colon (SW480), que presenta una mutación en la MCR del gen APC (como control positivo) y se ha asociado con su inactivación, según lo describe Rowan A y colaboradores (2000). Como se observa en la **Figura 15**, la sustitución CAG-TAG (heterocigotica en el codon 1338), observada en la línea SW480, no se encontró en las secuencias del gen APC derivada de las líneas celulares Caski, HeLa y C33A. En resumen, estos resultados sigieren que el fragmento amplificado, secuenciado y analizado (nucleótidos 3688-4496, que codifican a los codones 1230-1449), correspondiente a la región MCR del gen APC, no presentó alteraciones en sus secuencias que pudieran asociarse a la inactivación de su función, dentro de las líneas celulares Caski, SiHa, HeLa y C33A de cáncer cérvico uterino. Cabe comentar que la región evaluada comprendió dos mutaciones consideradas como “hot spot” (codones 1309 y 1338), que inactivan la función de APC dentro de la vía de señalización Wnt en cáncer de colon (Nakamura Y, et al., 1992; Miyoshit Y et al, 1992a y 1992b; Minde D et al, 2011).



FACULTAD DE FARMACIA

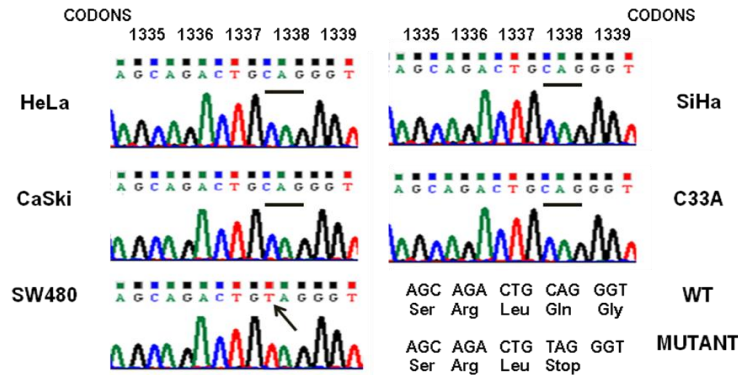


Figura 15. Análisis mutacional en la región MCR del gen APC. Secuencia analizada de los productos de PCR del segmento MCR en líneas celulares de cáncer de cervix. SW480 contiene una mutación en el codón 1338 (CAG/TAG).

2.- Determinación la hipermetilación del ADN en el promotor 1A y evaluar su efecto en la expresión del gen APC, en líneas celulares de cáncer cérvico uterino.

Hipermetilación del ADN en el promotor 1A en líneas celulares:

Estudiamos el silenciamiento transcripcional por hipermetilación de CpG's en el promotor 1A del gen APC, mediante análisis MS-PCR en las líneas celulares de cáncer cérvico uterino (HeLa, SiHa, CaSki y C33A), cáncer gástrico (Kat0III) y el cultivo primario de fibroblastos (HFF). Primero, el ADN-genómico purificado, cuantificado y evaluado de las muestras fue sometido a modificación por bisulfito de sodio para convertir las citosinas no metiladas en uracilo, mediante el kit EZ DNA methylation (Zymo Research, Orange, CA) bajo las condiciones descritas en la Metodología.

Posteriormente, para examinar el estado de metilación en el ADN del promotor 1A de las líneas celulares de cáncer cérvico uterino y el resto de las muestras que sirvieron como controles (Kat0III, promotor metilado y HFF, promotor no metilado), se procedió a amplificar con pares de oligonucleótidos específicos para alelos del promotor del gen APC metilados y no-metilados (metilación específica PCR, MS-PCR).

Como se observa en la **Figura 16**, el promotor 1A en la mayoría de las líneas celulares de cáncer cervico uterino (3 de 4, igual al 75%) no presenta hipermetilación que pudieran asociarse a un silenciamiento del gen APC, es decir, existe amplificación para alelos no metilados dentro de las líneas de cáncer cérvico uterino C33A, SiHa y HeLa. Sin embargo, las células de cáncer cervico uterino CaSki (VPH-16) presentan un estado de hipermetilación heterocigoto, es decir, muestran amplificación para alelos del promotor 1A de APC metilado y no metilado. Por su parte, estos resultados confirman que la línea celular de cáncer gástrico (KatolIII; control positivo) presenta hipermetilación de los dos alelos, como se ha reportado antes (Tsuchiya, G et al 2000), mientras que el cultivo primario de fibroblastos normales (HFF) no presentó metilación en ambos alelos del promotor 1A de APC (control negativo).

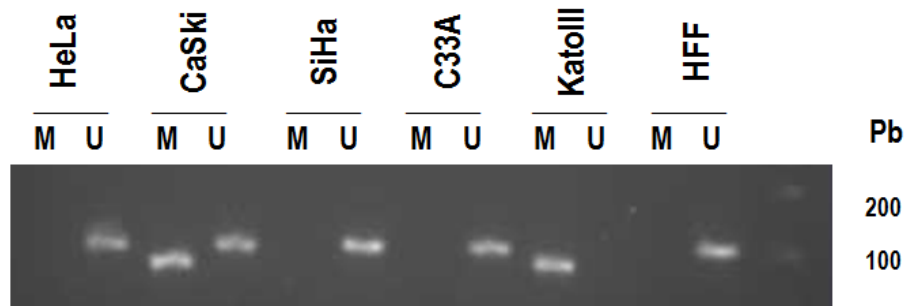


Figura 16. Metilación del promotor 1A del gen APC en líneas de cancer de cérvix.

ADN tratado con bisulfito de sodio y amplificación por PCR con pares de primers específicos para no metilado (U) y metilado (M) de los alelos del promotor de APC. (U=110pb y M=100pb; productos amplificados). Control positivo; línea celular de cancer gástrico KatolIII (con promotor 1A de APC metilado). Control negativo; HFF (Linfocitos normales).

Por otra parte, la posible asociación entre el estado de metilación en el ADN del promotor 1A del gen APC, los niveles de expresión/localización de β -catenin y el tipo de infección con VPH, fue evaluado con el mismo análisis a un pequeño grupo de biopsias de CaCu. Como se describió en metodología, se analizaron muestras con variaciones en la deslocalización/acumulación de β -catenina, así como en los tipos de VPH (VPH 16 o 18) (Rodríguez-Sastre et al., 2005). Nosotros observamos que la mayoría de biopsias de CaCu (6 de 9, aproximadamente igual 66 %) no presenta hipermetilación que pudieran asociarse a un silenciamiento del gen APC, es decir, existe amplificación para alelos no metilados. Sin embargo, como se observa en la **Figura 17**, sólo se amplificaron alelos



metilados (homocigotos) y alelos metilados/no metilados (heterocigotos) del promotor 1A del gen APC en biopsias con una localización subcelular anormal de β -catenina y estaban infectadas por el tipo HPV16. Estos resultados parecen indicar una posible asociación entre el estado de metilación del promotor 1A del gen APC, la localización anormal de β -catenina y la infección por HR HPV16.

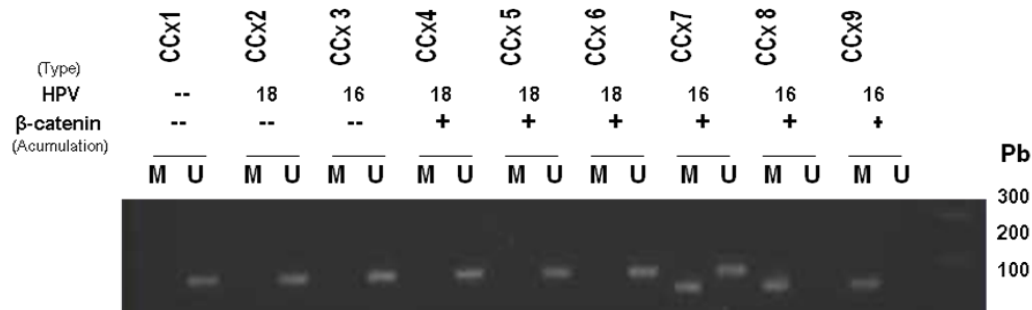


Figura 17. Metilación del promotor 1A del gen APC en biopsias de cáncer de cérvix.

ADN tratado con bisulfito de sodio y amplificación por PCR con pares de primers específicos para no metilado (U) y metilado (M) de los alelos del promotor de APC. (U=110pb y M=100pb; productos amplificados). La infección de VPH es descrita por el VPH específico presente (16/18) o negativo (-). La acumulación/deslocalización de β -catenin se describe en normal (-) y alterada (+).

Expresión de APC en líneas celulares:

Dado que hipermetilación del promotor 1A se ha asociado con la pérdida de expresión del gen APC, ausencia de los transcritos del exón 1A, 1B y exones 6-10 en cáncer gástrico (Tsuchiya T et al, 2000). Es por eso que, a continuación, evaluamos como la hipermetilación del promotor 1A puede afectar la expresión del exón 15 (representa la combinación de transcritos por los promotores 1A y 1B) del gen APC por RT-PCR (semicuantitativa), en las líneas celulares de cáncer cérvico uterino (HeLa, SiHa, CaSki y C33A), cáncer gástrico (Kat0III) y el cultivo primario de fibroblastos (HFF).

Posterior a la purificación, cuantificación y evaluación de ARN's-totales (**Figura S3**, Suplemento 3; **ANEXO II**), se procedió a realizar la reacción de transcripción reversa (RT) y la amplificación de transcritos del gen APC (fragmento ubicado en el exón 15) a partir del cDNA de cada muestra mediante la técnica de PCR, bajo las condiciones mencionada en la metodología.



Como se muestra en la **Figura 18**, observamos la expresión de transcritos de APC en el cultivo primario de fibroblastos (HFF), donde el promotor 1A del gen APC no presentó hipermetilación en el ADN (control negativo). Por su parte, la línea celular de KatolIII que mostró hipermetilación bialelica del promotor 1A, mostró niveles indetectables de ARNm, sugiriendo su silenciamiento transcripcional (control positivo). Al evaluar los niveles de expresión en las líneas celulares de CaCu no observamos diferencias aparentes entre las células C33A, SiHa, y HeLa, las cuales no presentaron hipermetilación del promotor 1A (ver Figura 16). Por otro lado, y de manera interesantemente, observamos la reducción del nivel de expresión de los transcritos del gen APC en la línea celular CaSki, lo cual coincide con el hecho de haber observado hipermetilación en uno de los dos alelos del gen (ver Figura 16). En términos generales, esto podría sugerir que se observa un nivel expresión bajo como consecuencia de que uno de los alelos se encuentra hipermetilado.

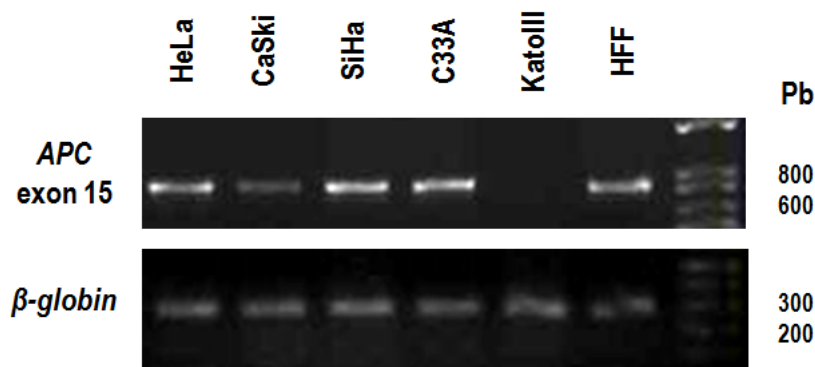


Figura 18. RT-PCR de transcritos del gen APC (exón 15). Producto amplificado de 809 pb a partir del cDNA de las distintas muestras. Expresión de β -globina es usada como control en todas las muestras para evaluar la calidad del cDNA. Mmp= marcador de peso molecular.

Finalmente, para evaluar los diferentes niveles de expresión de los transcritos del gen APC se realizó cada uno de los experimentos antes descritos (figura 18) por triplicado, y se aplicó un análisis estadístico con el software GraphPrism 5 para verificar si existe diferencia significativa entre los diferentes grupos. El análisis estadístico (**Figura 19**) muestra diferencia significativa de los niveles de expresión del gen APC entre las líneas celulares C33A, SiHa y HeLa de CaCu (incluido control negativo; HFF) con la línea celular CaSki. Además, la diferencia significativa en la expresión se observa entre todas



las líneas de CaCU (CaSki, C33A, SiHa y HeLa) y el control negativo (HFF) respecto a la línea celular KatolIII, control positivo del silenciamiento del gen APC.

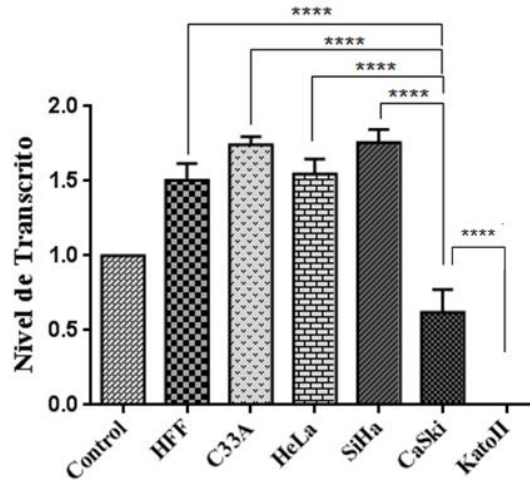


Figura 19: Nivel de transcritos del gen APC (exón 15) en las distintas muestras.
Análisis estadístico de ANOVA seguido de un análisis de Tukey, en donde $*p \leq 0.05$.

Expresión de APC en líneas celulares tratadas con inhibidores de DNA metiltransferasas y desacetilasas de histonas:

Estudiamos el papel de la hipermetilación de ADN y la desacetilación de histonas dentro del promotor 1A en el control de transcritos del gen APC, por tratamiento con DAC/TSA (inhibidores de ADN metiltransferasas y desacetilasas de histonas, respectivamente) en las células de cáncer cérvico uterino (HeLa, SiHa, CaSki y C33A), cáncer gástrico (KatolIII) y el cultivo primario de fibroblastos (HFF) bajo las condiciones descritas en la metodología.

Primero, observamos una viabilidad celular óptima (mayor al 70% (**Figura S3**, Suplemento 3; **ANEXO II**)) al tratamiento con DAC (3 μM) / TSA (0.5 μM) similar a lo descrito por Cameron E. (1999) y Issa Jean-Pierre J (2007), que permiten evaluar el efecto de los inhibidores con los experimentos posteriores: RT-PCR, inmunoblot e inmunohistoquímica.



Como se muestra en la **Figura 20**, después del tratamiento con DAC/TSA observamos re-expresión de transcritos del gen APC en las células Kat0III, este resultado es asociado con la desmetilación del ADN y con la remodelación de heterocromatina a eucromatina por acetilación de histonas, dentro del promotor 1A. Además, un aspecto sobresaliente fue observar que la expresión del exón 15 del gen APC de las células CaSki se incrementó, hasta aparentemente alcanzar los niveles de expresión observados en las otras líneas celulares, como consecuencia del tratamiento. Estos resultados sugieren que la expresión del gen APC es regulada por mecanismos epigenéticos dentro del promotor 1A en las líneas celulares Caski y Kat0III. Por otra parte, como era de esperarse, la expresión de APC en las células HeLa, SiHa, C33A y HFF no fue modificada por el tratamiento DAC/TSA, dado que la región promotora no presentó niveles detectables de hipermetilación; sugiriendo que la expresión del gen APC no está relacionada por regulación epigenética en estas células.

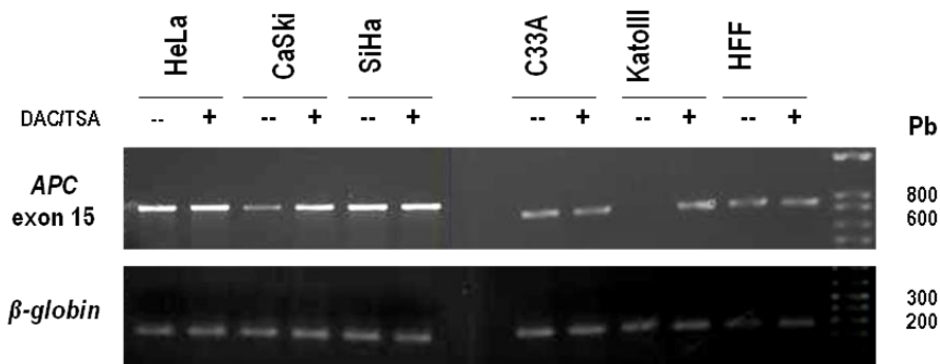


Figura 20. Análisis de la re-expresión del gen APC por efecto del tratamiento con inhibidores del silenciamiento transcripcional. RT-PCR del gen APC en líneas de cáncer de cervix, con y sin DAC (0.3 μ M) y TSA (0.5 μ M). Producto amplificado de 809 pb a partir del cDNA de las distintas muestras. Expresión de β -globina es usada como control en todas las muestras para evaluar la calidad del cDNA. Pb= marcador de peso molecular.

3. Asociación entre la alteración del gen APC y la regulación de Wnt/ β -catenina en cáncer cérvico uterino

Con el objetivo de fortalecer nuestra propuesta de que las alteraciones epigenéticas del promotor del gen APC ocasionan la inactivación de su expresión y, en consecuencia,



se favorece la deslocalización de β -catenina y expresión de genes promotores de la transformación carcinogénica en pacientes con CaCu, propusimos evaluar el efecto de la re-expresión del gen de APC por tratamiento con DAC/TSA sobre la vía de señalización Wnt.

Expresión y localización de β -catenina en líneas celulares tratadas con los inhibidores DAC y TSA:

Como se observa en la **Figura 21**, en condiciones normales (sin tratamiento con DAC/TSA) encontramos un nivel proteico abundante de β -catenina en células Kat0III y CasKi, mientras que en HeLa y fibroblastos (HFF) los niveles de β -catenina fueron bastante mas bajos, siendo mucho menores para Hela. Posterior al tratamiento con DAC/TSA observamos una marcada disminución en los niveles proteicos de β -catenina solo en las células Kat0III y CasKi. Sin embargo, posterior a su tratamiento con DAC/TSA, las células Hela y fibroblastos no mostraron alteración en los niveles aparentes de β -catenina. Hay que hacer notar que la disminución de los niveles de β -catenina parece ser dependiente del tratamiento de desmetilación (DAC/TSA), toda vez que no se observaron diferencias aparentes en los niveles de β -actina, que sirvió como control de carga. Por otra parte, en el lado derecho de la **Figura 21**, se muestra los niveles proteicos de β -catenina en las células C33A y SW480 de manera constitutiva, que fueron incluidos como controles negativo y positivo, respectivamente.

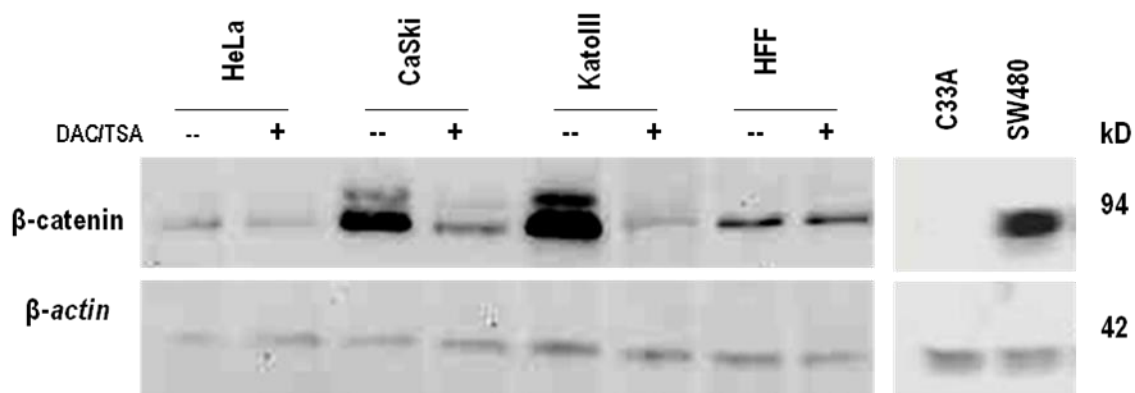


Figura 21. Niveles proteicos de β -catenina en líneas celulares de cáncer de cérvix. El análisis por Western permitió determinar los niveles de proteína β -catenina, con y sin DAC (3 mM) y TSA (0.5 mM). Control de carga anti-beta-actina.



Posteriormente, se decidió evaluar si el tratamiento con DAC/TSA para re-expresar el gen APC podría alterar la deslocalización citoplásmico/nuclear de β -catenina, en las líneas celulares C33A, CasKi (CaCu) y Katolll (cáncer gástrico) mediante IHC. Considerando que Hela mostró niveles basales muy bajos y estos no fueron alterados por el tratamiento por desmetilación, se decidió no incluirlos en este análisis.

Como se observa en la **Figura 22**, en condiciones sin tratamiento con DAC/TSA se observó una marcada expresión y localización (heterogénea) de β -catenina en la membrana celular, citoplasma y núcleo en las células Katolll y CasKi, mientras, en las células C33A los niveles de β -catenina no fueron detectables. Por su parte, después del tratamiento con DAC/TSA se observó, de manera similar a la **Figura 22**, una marcada disminución en los niveles de expresión asociado a la re-relocalización de β -catenina (localizada principalmente en membrana celular) en las células Katolll y CasKi. Estos resultados se correlacionan con la reducción de niveles totales de β -catenina (endógena) previamente observados, y esto puede ser asociado con la re-expresión del gen APC por el tratamiento de inhibidores DAC y TSA en las células de cáncer cérvico uterino en las células CaSki y Katolll.

Expresión genes blancos del complejo β -catenin/TCF en líneas celulares tratadas DAC y TSA:

Los resultados obtenidos mostraron que bajo las mismas condiciones donde se observó la re-expresión de transcritos del gen APC y disminución de niveles/re-localización de β -catenina, se observó una disminución en la expresión de los genes VEGF y MMP-7 después del tratamiento con DAC/TSA, en las células Katolll y CaSki, pero no en las células de cáncer de cérvix C33A, HeLa y cultivo primario de fibroblastos (HFF) (**Figura 23**). Nuestros datos sugieren que la re-expresión de APC por el tratamiento con DAC/TSA podría activar el complejo regulador de la vía Wnt para inducir la degradación de β -catenina y bloquear la expresión de genes blancos, en las células CaSki.

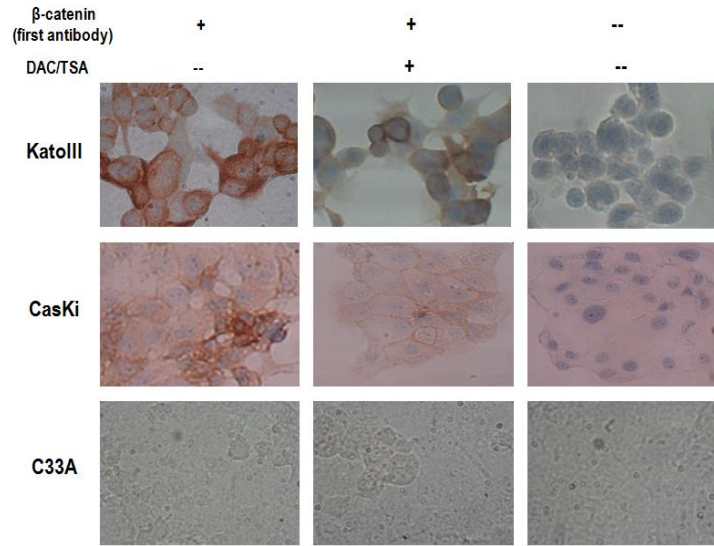


Figura 22. Localización celular de β -catenina en líneas celulares. Localización determinada por inmunohistoquímica. Observadas a X100.

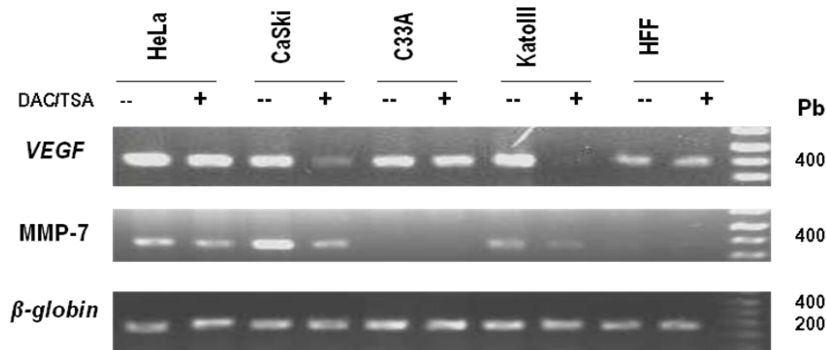


Figura 23. Análisis de la expresión de genes blancos de la vía WNT.

RT-PCR de VEGF and MMP-7 en líneas celulares, con y sin 5-aza-dC—DAC-- (0.3 IM) y TSA (1 IM). Expresión de beta-globina es usada como control en todas las muestras para evaluar la calidad del CDNA.



*Estudio de las alteraciones de Adenomatous Polyposis Coli;
(componente de la vía de señalización Wnt) en cáncer cervicovaginal.*

DISCUSIÓN



El cáncer cérvico uterino (CaCu) es una de las causas más comunes de muerte por tumores malignos en mujeres en México y a nivel mundial. Cabe señalar que se han identificado tipos específicos del HPV en prácticamente el 100% de los cánceres de cuello uterino, pero se estima que menos del 1% de las mujeres infectadas con VPH desarrollan cáncer (Stanley M, 2010). Las onco-proteínas E6 y E7 de los VPH de “alto riesgo” inactivan a los supresores de tumor p53 y pRb, respectivamente, permitiendo la alteración y/o inactivación de distintos procesos celulares/moleculares que resultan en una inestabilidad genómica, alteración de la expresión genética, evasión del sistema inmune y, principalmente, una proliferación anormal de las células infectadas (Moody C et al, 2010). Esto permite plantear que las infecciones persistentes por los VPH de “alto riesgo” son el factor de riesgo más importante para promover la transformación maligna de las células del cérvix (Clarke and Chetty, 2001; Bosch et al., 2002; Milde-Langosch et al., 2003; Young-Tae and Min-Zhao, 2005; Collins, 2006).

En este sentido, una de las vías de señalización intracelular donde las alteraciones genéticas y epigenéticas son más frecuentes en diferentes tipos de cáncer, es la vía de señalización Wnt, donde la proteína β -catenina constituye un elemento central. En células normales diferenciadas (somáticas), la vía *Wnt* se encuentra apagada por la ausencia de los ligandos Wnt, lo que permite la fosforilación de β -catenina por un complejo multiproteico regulador (APC, AXINA, GSK3 β , CK1 α y PPA2) y, su posterior, degradación por la acción del proteasoma (Valenta T y Hausmann G, 2012). Sin embargo, en Polakis y col. (2012) se recopilan varios estudios donde se reporta la activación anormal de la vía Wnt, que coincide con la acumulación y deslocalización de β -catenina, así como la expresión de los genes involucrados en el proceso carcinogénico (Polakis P et al, 2012). En el caso particular del cáncer cervico uterino, distintos estudios sugieren una asociación entre la activación anormal de la vía de señalización Wnt y la infección persistente de VPH's de “alto riesgo” en el desarrollo y progresión del CaCu. Por ejemplo, queratinocitos humanos inmortalizados por la sobre-expresión del oncogén E6 del VPH tipo 16 (HFK-HPV/E6) fueron transformados mediante la alteración de la vía Wnt en un modelo “in-vitro”. El ligado wnt1a suplementado en el medio de cultivo de los HFK-HPV/E6 permitió la activación anormal (acumulación de citoplasmática/nuclear de β -catenina) de la vía de señalización Wnt y, posterior, transformación. Por otro lado, la transfección del oncogén smt (antígeno “t” pequeño del SV40; control positivo) o de β -catenina mutada en la región



amino terminal (β -catenina-mut-S37A), permitieron el bloqueo de la degradación de β -catenina y de igual forma la transformación de los HFK-HPV/E6. Sin embargo, hay que hacer notar que la activación anormal de la vía Wnt por sí sola no fue capaz de llevar a la transformación celular, confirmando que los oncogenes virales de HPV generan la primera señal dentro del proceso de carcinogénesis (Uren A et al, 2005). Mas recientemente, el mismo grupo de investigación, confirmo sus resultados mediante un estudio “*in-vivo*”, donde el 94% de ratones doble transgénicos (oncogén E7/HPV-16 y β -catenina-mutada, ambos con expresión constitutiva) desarrollan cáncer cervico uterino, mientras, solo el 11% y 50% de ratones transgénicos con el oncogén E7/HPV-16 y β -catenina-mutada con expresión constitutiva, respectivamente (Bulut G et al, 2011). Estas observaciones sugieren que la vía de s Wnt juega un papel importante en las etapas de transformación de células de cérvix infectadas por HPV.

Por otro lado, la deslocalización (acumulación citoplasmática-nuclear) de β -catenina como indicador potencial de la activación anormal de la vía, fue observada en tumores cervicales, hecho que ha sido reportado por distintos grupos de investigación. En biopsias de lesiones intraepiteliales de bajo riesgo (LSIL o NIC 1) se observó mediante inmunohistoquímica, que algunas células presentaban acumulación en citoplasma de β -catenina, mientras, que en lesiones intraepiteliales de bajo riesgo (HSIL o NIC 2/NIC 3) más de la mitad de las células la mostraban. Sin embargo, en las biopsias de tumores de cérvix el 85% presentaban acumulación citoplasmática, y aunque más tenue también acumulación nuclear. Esto comparado con tejidos normales de cérvix, donde, β -catenina solo se observaba en la membrana citoplasmática (Shinohara et al., 2001; Rodríguez-Sastre et al., 2005). Además, en nuestro grupo de investigación confirmamos que la acumulación anormal de β -catenina se relaciona con la actividad transcripcional del complejo β -catenina/TCF, la cual fue determinada por el sistema de luciferasa pTOP/pFOP, en líneas celulares de cérvix infectadas por VPH's de alto riesgo. La línea celular Caski (VPH 16) mostró la mayor actividad seguida de SiHa (VPH 16) y Hela (VPH 18), mientras que C33A (sin VPH) no mostró ninguna actividad transcripcional del complejo β -catenina/TCF, comparado a lo observado en la línea celular SW480 (Control positivo; mutación en el codon 1338 del gen APC, que produce una proteína truncada sin la capacidad de controlar los niveles de β -catenina) (Mojica V, 2006; tesis de maestría). Interesante, Chung M y colaboradores (2009) presentaron resultados similares a los



obtenidos en nuestro laboratorio, esto es mayor acumulación de β -catenina y actividad transcripcional de β -catenina/TCF en células CaSki, que en células HeLa (Chung M et al, 2009).

Por muchos años, un amplio número de estudios se han enfocado en identificar alteraciones genéticas presentes en componentes de la vía de señalización Wnt. En algunos tipos de cáncer las mutaciones identificadas principalmente se localizan en el gen CTNNB (β -catenina) y se asociaron con una ganancia de función (oncogén), mientras que en otros, las mutaciones identificadas se asociaron con pérdida de la función, como las encontradas en los miembros del complejo degradador de β -catenina (APC, AXINA, GSK3 β , CK1 α y PPA2; algunos identificados como genes supresores de tumores) (Polakis P et al, 2007 y 2012). En relación a las alteraciones genéticas del primer caso, la activación de la vía Wnt/ β -catenina está asociada a mutaciones en el exón 3 de CTNNB1 (serina/treonina; codones 45, 41, 33 y 37), que tiene como resultado el bloqueo de la interacción de β -catenina con su complejo multiproteico regulador, para su fosforilación, ubiquitinación y subsiguiente destrucción proteolítica vía proteosoma, por lo cual la proteína se estabiliza en citoplasma (Kimelman D et al, 2006; Valenta T et al, 2012). Entre ellos podemos mencionar los carcinomas: colorectal (Akisik E et al 2011); hepatocelular (Cieply B et al, 2009); gástrico (Jang W and Kim W, 2011); páncreas (Gerder B et al, 1999) y otros, aunque menos frecuentes. Sin embargo, en diversos estudios no observaron mutaciones en la secuencia del gen CTNNB1 en biopsias de tumores de cérvix (Ariyoshi Shinohara et al, 2001; Pereira-Suarez et al, 2001). Esto permite plantear que la anormal activación de la vía Wnt/ β -catenina podría ser consecuencia de una alteración genética en algún componente del complejo regulador intracelular de la vía Wnt, asociada a su pérdida de función.

El gen supresor de tumor APC, un componente fundamental del complejo que regula la vida media de la β -catenina, presenta el 80-90% de todas sus mutaciones en el segmento denominado MCR ("mutation cluster region"; codones 1286-1513) del exón 15, que dan lugar a una proteína truncada sin los aminoácidos indispensables para unión a β -catenina, que son regmentos repetitivos (7rep/20aa) (Roberts D et al, 2011). Las alteraciones genéticas del gen APC se encuentran en los carcinomas de colon hereditarios (germinales, familiar adenomatous polyposis; FAP) y espontáneos



(somáticas), ambas se encuentran en más del 85% de todos los casos (Nakamura Y, et al. 1992). Además, están presente en adenomas gástricos (Horii A et al, 1992), cáncer de mama (Furuuchi K et al, 2000), cáncer hepático (Oda H et al, 1996), cáncer de ovario (Wu R et al, 1996), cáncer de páncreas (Horii A et al, 1992) y cáncer de tiroides (Zeki K et al, 1994).

Uno de los objetivos del presente estudio fue identificar alteraciones en la secuencia de la región de mutaciones “cluster” (MCR: codones 1286-1513) del gen APC, como un mecanismo potencialmente responsable de la activación anormal de la vía de señalización Wnt/ β -catenina en CaCu. La secuencia analizada (nucleótidos 3688-4496, que codifican a los codones 1230-1449) que representa aproximadamente el 80% de la región de mutaciones “cluster” del gen APC, no presentó alteraciones en sus secuencias que pudieran asociarse a la inactivación de su función, dentro de las líneas celulares Caski, SiHa, HeLa y C33A de cáncer cérvico uterino. Cabe comentar que la región evaluada comprendió dos mutaciones consideradas como “hot spot” (codones 1309 y 1338), que inactivan la función de APC dentro de la vía de señalización Wnt en cáncer de colon (Nakamura Y, et al., 1992; Miyoshit Y et al, 1992a y 1992b; Minde D et al, 2011). Además, resultados obtenidos en un estudio previo de nuestro grupo de investigación, mostraron que la secuencia restante (20%) tampoco presenta mutaciones, incluyendo las también consideradas como “hot spot” (codones 1061 y 1450) dentro del gen APC, con resultando y asociación a cáncer de colon, como se menciono anteriormente. En sentido diferente a la propuesta inicialmente planteada, por los resultados del análisis mutacional en el presente y previo estudio, parecería que en cáncer cérvico uterino la anormal activación de la vía Wnt no está asociada a alteraciones genéticas en la región MCR del gen APC. Es decir, nosotros sugerimos que la anormal acumulación de β -catenina y la actividad transcripcional de β -catenina/TCF presente en las células CaSki y HeLa (Pereira-Suárez, et al., 2001; Moli-Huangy et al, 2006; Chung M et al, 2009), no son resultado de la perdida de la función por cambios en su secuencia MCR del supresor de tumor APC; componente fundamental del complejo que regula la vida media de la β -catenina.



Por otro lado, el silenciamiento epigenético y por tanto, la represión de la expresión, es un mecanismo alternativo que permite la inactivación de genes supresores de tumor en distintos tipos de cáncer (Rodríguez-Paredes y Esteller 2011). En el caso de alteraciones epigenéticas presentes en componentes de la vía de señalización Wnt, la hipermetilación del ADN en la región promotora del gen APC es una de las más examinadas en diversos estudios (Agular O, Estelle M et al, 2007). Esteller M y colaboradores fueron los primeros en demostrar la mono o bialelica (heterocigota u homocigota) hipermetilación anormal en el promotor 1A del gen APC presente en distintos tipos de cáncer gastrointestinal, incluido colorectal, gástrico, pancreático, esofágico y hepático (Esteller M, et al., 2000). Estudios posteriores, identifican un similar estado de hipermetilación del promotor 1A de APC en distintos tipos de cáncer, aunque cáncer gástrico muestra mayor frecuencia; con más del 50% de las muestras (Tsuchiya T et al, 2000; Bai A et al, 2004; Kosuke Hosoya et al, 2009). Fu X. y colaboradores (Fu X. et al, 2009) sugieren que la hipermetilación del promotor 1A en el gen APC permite una activación moderada de la vía de señalización Wnt en cáncer colorectal, más que por mutaciones que inactivan los genes APC y β -catenina. En el caso particular de carcinomas de cervix, existen diferencias muy marcadas entre los estados de metilación en el promotor 1A del gen APC reportados por varios autores (Kang S. et al, 2006; Yang N. et al, 2010), aunque ninguno evaluó la asociación entre la metilación del promotor 1A, la expresión del gen APC y la activación aberrante de la vía de señalización Wnt.

En relación a lo comentado anteriormente, para evaluar el efecto de la anormal inactivación epigenética como mecanismo alterno a la mutación, nosotros examinamos la frecuencia de hipermetilación en el promotor 1A, dentro de las líneas celulares y biopsias de cáncer cérvico uterino. Estas muestras presentan diferentes niveles de acumulación/deslocalización de β -catenin y tipo de infección por HPV 16 o 18. Nuestros resultados muestran que la frecuencia de hipermetilación está en el rango de $\frac{1}{4}$ (25%) y $\frac{3}{9}$ (aproximadamente 33%) en



líneas y biopsias, respectivamente. Este resultado es contrario a un estudio previo, que muestran una frecuencia de hipermetilación del promotor 1A en el 90% de las biopsias de cáncer cervico uterino (Zambrano et al, 2005). Sin embargo, nuestros resultados son similares a otros estudios, los cuales postulan que la hipermetilación del promotor 1A del gen APC, determinada mediante la técnica de metilación específica PCR (MS-PCR) o la técnica de MS-PCR cuantitativa (qMS-PCR), es poco común en células de cáncer cervico uterino; una frecuencia entre el 12% y 35% ((Dong et al, 2001; Wisman et al, 2006 and van der Meide WF et al, 2011). Interesante, los resultados del presente estudio indican una posible correlación entre el estado de metilación del promotor 1A del gen APC y la acumulación/deslocalización de β -catenin observada en biopsias que presentan infección por HPV tipo 16. Además, alelos del promotor 1A completamente no metilados (homocigotos) se observan en las líneas celulares C33A (sin HPV) y HeLa (HPV 18) de cáncer de cérvix. El mecanismo que permite la activación de la vía Wnt por la infección de HPV 16 requiere futuras investigación. Sin embargo, silenciamiento de E6/E7 del HPV 16 por RNAinterferencia reduce la activación de la vía Wnt en células CasKi, mientras la sobreexpresión de E6/E7 del HPV 16 incrementan la activación de la vía Wnt en células C33A (Ma C et al, 2015).

Para confirmar el papel de la hipermetilación del promotor 1A en la regulación transcripcional del gen APC, la expresión del gen APC fue analizada en las líneas celulares de cáncer cervico uterino. Nuestros resultados no muestran diferencias significativas en los niveles de transcritos de APC en las líneas celulares de cáncer cervico uterino (HeLa, CaSki y C33A), cáncer gástrico (Kat0III) en comparación con el cultivo primario de fibroblastos (HFF), que presentan promotor 1A del gen APC no metilado. Además, nosotros confirmamos la ausencia de ARNm de APC en la línea celular de Kat0III, que presenta hipermetilación bialélica (homocigota) de alelos del promotor 1A., mientras que identificamos en células CaSki una marcada reducción del nivel de ARNm, las cuales mostraban un patrón de metilación heterocigota en el promotor 1A del gen APC. La técnica de RT-PCR y metilación específica por PCR (MSP) muestran una correlación entre los niveles de expresión de ARNm y la hipermetilación del promotor



1A del gen APC en nuestras muestra. Resultados similares son mostrados en distintos estudios, donde la anormal hipermetilación del promotor 1A de APC es asociada claramente con el silenciamiento de su transcripto (inactivación epigenética), principalmente en cáncer gástrico (Tsuchiya T et al, 2000; G.H. Kang et al, 2003).

Adicionalmente, varios estudios demuestran que la expresión anormal (ausencia total y/o parcial de ARNm) de genes supresores de tumor es revertida por el tratamiento con inhibidores del silenciamiento epigenético (inhibidores de ADN metiltransferasas y de desacetilasas de histonas; DNMT y HDAC) en células de cáncer (Cameron E et al, 1999; Yang X et al, 2001; Meng C et al, 2008). Por lo tanto, nosotros empleamos esta estrategia para evaluar el efecto de los inhibidores de ADN metiltransferasas y de desacetilasas de histonas, DAC/TSA, sobre el control de la expresión de transcriptos del gen APC, en las líneas celulares de cáncer cérvico uterino. En nuestros resultados, observamos un marcado incremento de transcriptos después del tratamiento con DAC/TSA en las células CaSki, mientras, no observamos diferencia significativa en los niveles de transcriptos del gen APC comparados a las células C33A, SiHa y HeLa de cáncer cervico uterino. Resultados similares presentaron líneas celulares de cáncer gástrico y melanoma con hipermetilación monoalelica (heterocigota) y/o hipermetilación completa en los alelos (homicigota) del promotor 1A, en ambos casos la ausencia total y/o bajos niveles de transcriptos del gen APC fue revertida después del tratamiento con DAC/TSA (Worm J et al, 2004; Kosuke Hosoya et al, 2009). Estos resultados sugieren que la hipermetilación del promotor 1A permite el silenciamiento transcripcional del gen APC, contribuyendo a la inactivación del supresor tumoral APC en células CaSki de cáncer cervico uterino.

Por todo lo anterior, nosotros finalizamos el presente trabajo realizando la evaluación del efecto de la alteración epigenética del gen APC dentro de la vía Wnt, de forma particular en las células de cáncer cérvico uterino CaSki, con un



estado de hipermetilación monoalelica (heterocigota) y disminución de los niveles de transcritos del gen APC, que fue revertida después del tratamiento con DAC/TSA. En primer lugar, determinamos los niveles de β -catenina y encontramos abundante concentración proteica en las células Kat0III y CasKi, significativamente opuesto a lo observado en nuestros controles, el cultivo primario de fibroblastos y las células C33A. Resultados similares, fueron observados por Pereira-Suárez y Col. Donde moderados nivel de expresión de β -catenina presentaron las líneas celulares CaSki (VPH 16) y Calo (VPH 18), mientras que fue bajo en HeLa (VPH 18) y SiHa (VPH 16), nulo en C33A (sin VPH's) (Pereira-Suárez et al., 2001). Cabe destacar que después del tratamiento DAC/TSA, nosotros observamos una disminución en los niveles proteicos de β -catenina solo en las células Kat0III y CasKi, donde anteriormente se mostro la re-activación y el incremento de la expresión de transcritos del gen APC. Resultados similares fueron observados en células de carcinoma primario de tiroides (PC1), donde la acumulación de β -catenina asociada a la alteración epigenética del gen APC disminuyo con el tratamiento de DAC, inhibidores de ADN metiltransferasas (Svedlund J et al, 2010) Posteriormente, determinamos que la localización de β -catenina se pueden correlacionar con los niveles proteicos, y observamos una marcada expresión y deslocalización en la membrana celular, citoplasma y núcleo de β -catenina, en las células Kat0III y CasKi, mientras en las células C33A los niveles de β -catenina fueron indetectables. Sin embargo después del tratamiento con DAC/TSA, observamos una disminución en los niveles de expresión de β -catenina localizada en citoplasma y núcleo, en ambas células, Kat0III y CasKi.

Finalmente, la anormal activación de la vía Wnt, caracterizada por una acumulación y deslocalización de β -catenina, se correlaciona con la expresión de los genes blancos de complejo transcripcional β -catenina/TCF involucrados en la transformación maligna; entre los que regulan el ciclo celular, se encuentran: ciclina D1, c-myc, fra-1, c-jun, gastrin, WISP-1, ITF-2; los que regulan la sobrevivencia celular: Id2, MDR1, COX2; y aquellos implicados en la invasión o



diseminación del tumor: MMP-7, matrilysin, laminin y VEGF. (Polakis P et al, 2007 y 2012). En el caso particular de células de cáncer de cérvix, Huang y col. (2006) emplearon un iRNA de β -catenina (un ARN de interferencia específico para el ARN mensajero de β -catenina) en líneas celulares de cáncer de cérvix que presentan activación anormal de la vía Wnt. Sus resultados mostraron que la represión de la expresión de β -catenina, fue suficiente para observar disminución de los niveles de expresión de los genes blancos VEGF y MMP7. Por lo tanto, nosotros evaluamos la expresión de los genes blancos de la vía Wnt, VEGF y MMP-7, para correlacionar la alteración epigenética del gen APC con una vía Wnt activa, capaz de dar como resultado la expresión de genes involucrados en la transformación maligna. En las células de cáncer cérvico uterino CaSki, los resultados obtenidos mostraron que después del tratamiento DAC/TSA, bajo las mismas condiciones donde se observó la re-expresión de transcritos del gen APC y disminución de niveles/re-localización de β -catenina, se observó una significativa disminución en la expresión de los genes VEGF y MMP-7. Cabe señalar que bajo una estrategia opuesta, Stefania Segditsas y col. (2008) mostraron que el bloqueo/silenciamiento por iRNA del gen APC (un ARN de interferencia específico para el ARN mensajero de APC) permite el incremento en la expresión de los genes blancos de la vía Wnt MMP-7, C-myc, entre otros, en líneas celulares de cáncer de colon.

De manera general (**Figura 23**), nuestros resultados muestran que el silenciamiento del gen APC por hipermetilación del promotor 1A es un mecanismo que contribuye a la activación de la vía de señalización Wnt en células de cáncer cervico uterino infectadas con VPH 16. La reducción en los niveles de expresión de APC por hipermetilación del promotor 1A del gen APC, más que una mutación, conduce a la acumulación/deslocalización de β -catenina, que a su vez aumenta la actividad transcripcional de la vía Wnt. Este mecanismo permite el incremento de la transcripción de genes involucrados en el proceso carcinogénico.

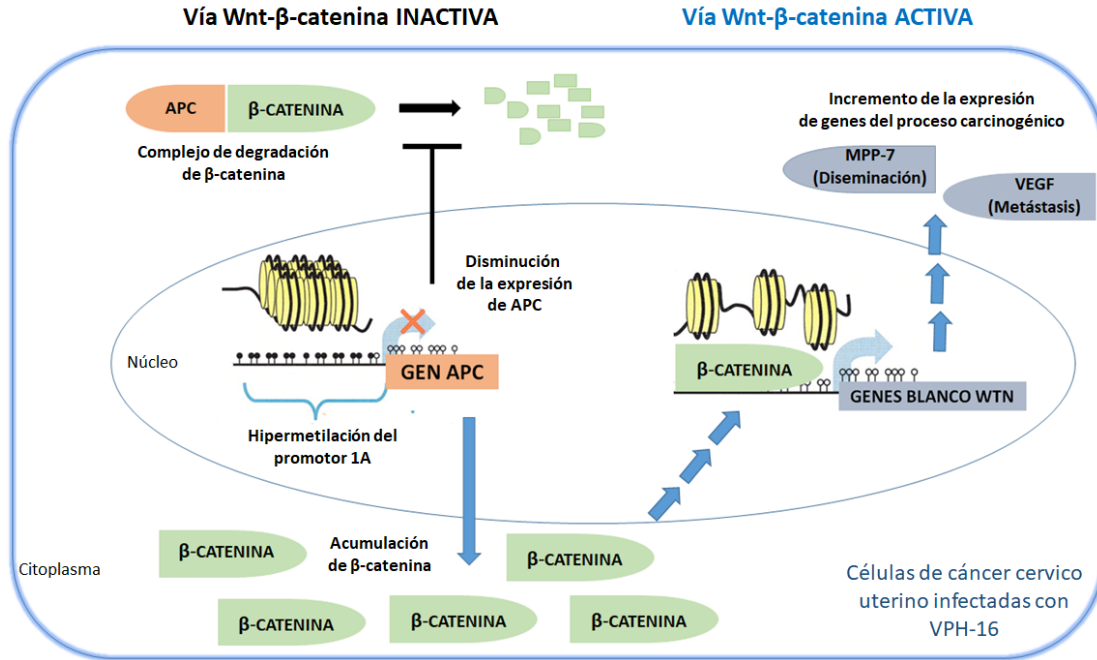


Figura 23. Modelo propuesto de resultados obtenidos en el presente estudio.



*Estudio de las alteraciones de Adenomatous Polyposis Coli;
(componente de la vía de señalización Wnt) en cáncer cervicovaginal.*

CONCLUSIONES



FACULTAD DE FARMACIA

CONCLUSIÓN GENERAL

El silenciamiento epigenético dependiente de la metilación del promotor 1A del gen APC, más que una mutación en la secuencia, parece ser un mecanismo que contribuye en la inhibición de la expresión del gen de APC, la disminución de acumulación/deslocalización de b-catenina y la expresión de genes blanco (activación de la vía Wnt) en líneas celulares de cáncer cervicouterino infectadas con VPH.

Conclusiones particulares:

- 1) El análisis en la secuencia MCR (Mutation cluster region) del gen APC no presentó cambios que pudieran asociarse a la inactivación de su función como gen supresor de tumores en líneas celulares de cáncer cervicouterino.
- 2) La hipermetilación monoalélica (heterocigota) del promotor 1A del gen APC en las células CasKi coincidió con una disminución de la expresión de los transcritos del gen APC. Asimismo, su tratamiento con DAC/TSA indujo un incremento en los niveles de expresión de APC sugiriendo que la reducción de transcritos de APC es resultado de una inactivación epigenética.
- 3) El estado de metilación del promotor 1A (hipermetilación bi y/o moalélica) del gen APC se asocia con localización anormal de β -catenina en líneas celulares y biopsias de carcinoma cervical infectadas por HR HPV16.
- 4) La reactivación del gen de APC, posterior al tratamiento con DAC/TSA, coincidió con la disminución de acumulación/deslocalización de b-catenina y disminución de la expresión de genes blanco (VEGF y MMP-7) en la línea celular de cáncer cervicouterino CaSki infectadas con VPH-16.



*Estudio de las alteraciones de Adenomatous Polyposis Coli;
(componente de la vía de señalización Wnt) en cáncer cervicovaginal.*

PERSPECTIVAS



Estudiar la activación de la vía de señalización Wnt por el silenciamiento epigenético del gen APC, en líneas celulares y biopsias cáncer cervico uterino infectadas por HPV-16.

Primera parte

Determinar el perfil de CpG's metiladas e histonas modificadas (acetilación y metilación) en el promotor 1A del gen APC, en líneas celulares y tumores de cáncer cervico uterino.

1. Analizar el perfil de metilación en el promotor 1A del gen APC por pyrosecuenciación en líneas celulares y tumores de cáncer cervico uterino.
2. Analizar el perfil de acetilación (Ac-H3 y Ac-H4) y metilación (trimethyl-H3K4; methyl-H3K9; trimethyl-H3K27) de histonas en el promotor 1A del gen APC por inmuno-precipitación de la cromática (ChIP), en líneas celulares y tumores de cáncer cervico uterino.

Segunda parte

Estudiar la sobre-regulación (activación) de la vía Wnt por el silenciamiento del gen APC, en líneas celulares de cáncer cervico uterino y queratinocitos inmortalizados por HPV-16.

1. Analizar los niveles de expresión de genes blanco de la vía Wnt (c-myc, Cox2, matriz metaloproteinasa-7, VEGF) con/sin tranfección de RNAi-APC y/o β -catenina-mutada en líneas celulares de cáncer cervico uterino por RT-PCR.
2. Estudiar el efecto en el crecimiento y la apoptosis al transfectar RNAi-APC por análisis de formación de colonias (MMT) y citometría de flujo (FACS), respectivamente.



*Estudio de las alteraciones de Adenomatous Polyposis Coli;
(componente de la vía de señalización Wnt) en cáncer cervicovaginal.*

BIBLIOGRAFÍA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA



Aguiler O, Muñoz A, Esteller M and Fraga M (2007). Epigenetic Alterations of the Wnt/b-Catenin Pathway in Human Disease. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*, 7(1); 13-21.

Akisik E, Buğra D, Yamaner S, Dalay N (2011). Analysis of β -catenin alterations in colon tumors: a novel exon 3 mutation. *Tumour Biol*, 32(1); 71-76.

Almoguera C. et al. (1988). Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell*, 53; 549-554.

Aoki K, Taketo M (2007). Adenomatous polyposis coli (APC): a multi-functional tumor suppressor gene. *J Cell Sci*, 120(19); 3327-3335.

Arnold CN, Goel A, Niedzwiecki D, Dowell JM, Wasserman L, Compton C, Mayer J, Bertagnolli MM, Boland CR (2004). APC promoter hypermethylation contributes to the loss of APC expression in colorectal cancers with allelic loss on 5q. *Cancer Biol Ther*, 3; 960-964.

Ashley DJ (1969) Colonic cancer arising in polyposis coli. *J. Med. Genet*, 6; 376–378.

Avraham R, Yarden Y (2012). Regulation of signalling by microRNAs. *Biochem Soc Trans*, 40(1); 26-30.

Bai A, Tong J, To K, Chan M, Man E, Lo K, Lee J, Sung J and Leung W (2004). Promoter hypermethylation of tumor-related genes in the progression of colorectal neoplasia. *Int J Cancer*, 112; 846-853.

Barchitta M, Quattrocchi A, Maugeri A (2014). LINE-1 hypomethylation in blood and tissue samples as an epigenetic marker for cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 9 (10):e109478.

Berger SL (2007). The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature*, 447; 407–412.



Bird AP 1986. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature*, 321; 209–13

Bird A (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*, 16; 6–21.

Biswas S, Rao CM (2007). Epigenetics in cancer: Fundamentals and Beyond. *Pharmacol Ther*, 173;118-134.

Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJ and Shah KV (2002). The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J. Clin. Pathol*, 55 (4); 244–265

Bustos VH, Ferrarese A, Venerando A, Marin O, Allende JE, Pinna (2006). The first armadillo repeat is involved in the recognition and regulation of beta-catenin phosphorylation by protein kinase CK1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103; 19725–19730.

Bosch FX, Broker TR, Forman D, Moscicki AB, Gillison ML, Doorbar J, Stern PL, Stanley M, Arbyn M, Poljak M (2013). Comprehensive control of human papillomavirus infections and related diseases. *Vaccine*, 31; 1–31.

Bottomly D, Kyler SL, McWeeney SK, Yochum GS (2010). Identification of (beta)-catenin binding regions in colon cancer cells using ChIP-Seq. *Nucleic Acids Res*, 38; 5735–5745

Brocardo M, Henderson BR (2008). APC shuttling to the membrane, nucleus and beyond. *Trends Cell Biol*, 18(12); 587-96.

Bulut G, Fallen S, Beauchamp EM, Drebing LE, Sun J, Berry DL, Kallakury B, Crum CP, Toretsky JA, Schlegel R, Üren A (2011). Beta-catenin accelerates human papilloma virus type-16 mediated cervical carcinogenesis in transgenic mice. *PLoS One*, 6(11)e27243.

Cameron E, Bachman K, Myöhänen S, Herman J, & Baylin S. (1999). Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nature genetics*, 21;103-107.



Cancer Genome Atlas Research Network (2008). Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*, 455; 1061–1068

Cancer Genome Atlas Research Network (2011). Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature*, 474: 609–615

Castellsagué X (2008). Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecol Oncol*, 110(3-2); S4-7.

Cieply B, Zeng G, Proverbs-Singh T, Geller DA, Monga SP (2009). Unique phenotype of hepatocellular cancers with exon-3 mutations in beta-catenin gene. *Hepatology*, 49(3):821-31.

Chakravarthi BV, Nepal S, Varambally S (2016). Genomic and Epigenomic Alterations in Cancer. *Am J Pathol*, 186(7); 1724-35.

Chang CQ, Yesupriya A, Rowell JL, Pimentel CB, Clyne M, Gwinn M, Khoury MJ, Wulf A, Schully SD (2014). A systematic review of cancer GWAS and candidate gene meta-analyses reveals limited overlap but similar effect sizes. *Eur. J. Hum. Genet*, 22(3); 402-408.

Charames GS, Ramyar L, Mitri A, Berk T, Cheng H, Jung J (2008). A large novel deletion in the APC promoter region causes gene silencing and leads to classical familial adenomatous polyposis in a Manitoba Mennonite kindred. *Hum Genet*, 124; 535–541.

Chrun ES, Modolo F, Daniel FI (2017). Histone modifications: A review about the presence of this epigenetic phenomenon in carcinogenesis. *Pathol Res Prac*, S0344-0338(17); 30318-7.

Chung MT, Lai HC, Sytwu HK, Yan MD, Shih YL, Chang CC, Yu MH, Liu HS, Chu DW, Lin YW. (2009). SFRP1 and SFRP2 suppress the transformation and invasion abilities of cervical cancer cells through Wnt signal pathway. *Gynecol Oncol*, 112(3); 646-53.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA



Clare B, and Chetty R (2001). Cell cycle aberrations in the pathogenesis of squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol*, 82 (2); 240-246.

Clevers H, Nusse R (2012). Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell*,149(6);1192-205.

Cooper DB, McCathran CE (2017). Cervical, Dysplasia. *StatPearls [Internet], Treasure Island (FL)*.

De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324; 17–27.

Dong S, Kim H, Rha S, and David Sidransky (2001). Promoter Hypermethylation of Multiple Genes in Carcinoma of the Uterine Cervix. *Clinical Cancer Research*, 7; 1982–1986.

Doorbar J (2005).The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol*, 32(Suppl 1); S7–S15.

EkstromEJ, SherwoodV, AnderssonT (2011). Methylation and loss of Secreted Frizzled-Related Protein 3 enhances melanoma cell migration and invasion. *PLoS ONE*, 6; e18674.

En Li (2002). Chromatin modificaction and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nature reviews genetics*, 3; 662-673

Esteller M, Sparks A, Toyota M, Sanchez-Cespedes M, Capella G, Peinado MA,Gonzalez S, Tarafa G, Sidransky D, Meltzer SJ, Baylin SB, Herman JG (2000). Analysis of adenomatous polyposis coli promoter hypermethylation in human cancer. *Cancer Res*, 60; 4366-71.

Esteller M (2007). Cancer epigenomics: DNA methylomes and histonemodification maps. *Nat Rev Genetics*, 8; 286–298

Fearnhead NS, Britton MP, Bodmer WF (2001). The ABC of APC. *Hum Mol Genet*, 10 (7); 721-33.



Felsenfeld G, Groudine M (2003). Controlling the double helix. *Nature*, 421 (6921); 448-453.

Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM (2010). GLOBOCAN 2008, Cancer incidence and mortality worldwide. *IARC CancerBase No. 10 [Internet]*. Lyon (France).

Fisher JC (1958). Multiple-mutation theory of carcinogenesis. *Nature*, 181; 651–652

Fletcher O and Houlston R (2010). Architecture of inherited susceptibility to common cancer. *Nature reviews*, 10; 353-361.

Forbes SA (2008). The Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC). *Curr. Protoc. Hum. Genet*, Chapter 10, Unit 10.11

Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, Bonaldi T, Haydon C, Ropero S, Petrie K (2005). Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet*, 37; 391-400.

Fu X, Li J, Li K, Tian X, Zhang Y (2009). Hypermethylation of APC promoter 1A is associated with moderate activation of Wnt signalling pathway in a subset of colorectal serrated adenomas. *Histopathology*, 55; 554-563.

Fukui T, Kondo M, Ito G, Maeda O, Sato N, Yoshioka H, Yokoi K, Ueda Y, Shimokata K, Sekido Y (2005). Transcriptional silencing of secreted frizzled related protein 1 (SFRP 1) by promoter hypermethylation in non-small-cell lung cancer. *Oncogene*, 24; 6323–6327.

Furuuchi K, Tada M, Yamada H, Kataoka A, Furuuchi N, Hamada J, Takahashi M, Todo S, Moriuchi T (2000). Somatic mutations of the APC gene in primary breast cancers. *Am J Pathol*, 156(6);1997-2005



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA



Gerdes B, Ramaswamy A, Simon B, Pietsch T, Bastian D, Kersting M, Moll R, Bartsch D (1999). Analysis of beta-catenin gene mutations in pancreatic tumors. *Digestion*, 60(6); 544-8.

Goldmann WH (2012) Mechanotransduction in cells. *Cell Biol Int*, 36(6); 567-70.

Goll MG, Bestor TH (2005). Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem*, 74; 481–514.

Guo-Cheng Y (2012). Linking Genome to Epigenome Wiley Interdiscip. *Rev Syst Biol Med*, 4(3); 297–309.

Hanahan D, Weinberg RA (2000).The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1); 57-70.

Hanahan D, Weinberg RA (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5); 646-74.

Heppner Goss K and Groden J (2000). Biology of the Adenomatous Polyposis Coli Tumor Suppressor. *Journal of Clinical Oncology*,18 (9);1967-1979.

Hethcote HW and Knudson AG (2005). Model for the incidence of embryonal cancers: application to retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 75(5); 2453-7.

Hoffmann MJ, Schulz WA (2005). Causes and consequences of DNA hypomethylation in human cancer. *Biochem Cell Biol*, 83; 296–321.

Horii A, Nakatsuru S, Miyoshi Y, Ichii S, Nagase H, Kato Y, Yanagisawa A, Nakamura Y (1992). The APC gene, responsible for familial adenomatous polyposis, is mutated in human gastric cancer. *Cancer Res*, 52(11); 3231-3.



Horii A, Nakatsuru S, Miyoshi Y, Ichii S, Nagase H, Ando H, Yanagisawa A, Tsuchiya E, Kato Y, Nakamura Y (1992). Frequent somatic mutations of the APC gene in human pancreatic cancer. *Cancer Res*, 52(23); 6696-8.

Horii A, Nakatsuru S, Ichii S, Nagase H, Nakamura Y (1993). Multiple forms of the APC gene transcripts and their tissue-specific expression. *Hum Mol Genet*, 2; 283–287.

Hosoya K, Yamashita S, Ando T, Nakajima T, Itoh F, Ushijima T (2009). Adenomatous polyposis coli 1A is likely to be methylated as a passenger in human gastric carcinogenesis. *Cancer Lett*, 285; 182–189.

Huang M, Wang Y, Sun D, Zhu H, Yin Y, Zhang W, Yang S, Quan L, Bai J, Wang S, Chen Q, Li S and Xu N. (2006). Identification of genes regulated by Wnt/ β -catenin pathway and involved in apoptosis via microarray analysis. *BMC Cancer* 2006, 6; 221.

Irizarry RA, Ladd-Acosta C, Wen B, Wu Z, Montano C, Onyango P, Cui H, Gabo K, Rongione M, Webster M (2009). The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nat Genet*, 41; 178-186

Issa J (2004). CpG island methylator phenotype in cancer. 4; 988 993
etinoblastoma. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 75, 2453–2457 (1978).

Issa J, Kondo Y, Zhang L, Ahmed S, Saira A, Shu J, Chen X and Waterland RA (2007). Genome-wide profiling of DNA reveals a class of normally methylated CpG island promoters. *Plosgenetics*, 3,(10); 2023-2034.

Jang BG, Kim WH (2011). Molecular pathology of gastric carcinoma. *Pathobiology*, 78(6); 302-10.

Jemal A, Center MM, DeSantis C, Ward EM (2010). Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 19(8): 1893-907.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA



Jing-Liu, Yi-Xing, Hinds TR, Jie Zheng and Wenqing Xu (2001). The Third 20 Amino Acid Repeat Is the Tightest Binding Site of APC for beta-Catenin. *Experimental Cell Research*, 264; 126–134.

Jones PA (1999). The DNA methylation paradox. *Trends Genet*, 15; 34–7.

Jones PA, Baylin SB (2007). The epigenomics of cancer. *Cell*, 128; 683-692.

Kang GS, Lee J, Jung H (2003). Profile of aberrant CpG island methylation along the multistep pathway of gastric carcinogenesis. *Lab Invest*, 83; 635–641.

Kang S, Kim J, Kang G, Lee S, Park N, Song Y, Park S, Kang S, Lee H (2006). Comparison of DNA hypermethylation patterns in different types of uterine cancer: Cervical squamous cell carcinoma, cervical adenocarcinoma and endometrial adenocarcinoma. *Int J Cancer* 118 (9); 2168–2171.

Karoui M, Tresallet C, Brouquet A, Radvanyi H, Penna C (2007). Colorectal carcinogenesis; Hereditary predisposition and colorectal cancer. *J Chir (Paris)*, 144(1); 13-8.

Kikuchi Akira (2003). Tumor formation by genetic mutations in the components of the Wnt signaling pathway. *Cancer Sci*, 94(3); 225–229.

Kimelman D, Xu W (2006). Beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene*, 25; 7482–7491.

Kondo Y, Shen L, Ahmed S, Bumber Y, Sekido Y, Haddad BR, Issa JP (2008). Downregulation of histone H3 lysine 9 methyltransferase G9a induces centrosome disruption and chromosome instability in cancer cells. *PLoS One*, 3; e2037.

Kouzarides T (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128; 693–705



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA



Kozaki K, Imoto I, Mogi S, Omura K, Inazawa J: Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral cancer. *Cancer Res* 2008, 68:2094-2105.

Laird P, Jackson-Grusby L, Fazeli A, Dickinson S, Jung W, Li E, Weinberg R, Jaenisch R (1995). Suppression of intestinal neoplasia by DNA hypomethylation. *Cell* 81: 197–205.

Lawrence MS, Stojanov P, Mermel CH, Robinson JT, Garraway LA, Golub TR, Meyerson M, Gabriel SB, Lander ES, Getz G (2014). Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature*, 4 (505); 495–501.

Lengauer C, Kinzler K, Vogelstein B (1998). Alteration in cancer. *Nature*, 396; 643-649.

Li Z, Nathke IS (2005). Tumor-associated NH₂-terminal fragments are the most stable part of the adenomatous polyposis coli protein and can be regulated by interactions with COOH-terminal domains. *Cancer Res*, 65; 5195-5204.

Lim DH, Maher ER (2010). Genomic imprinting syndromes and cancer. *Adv Genet*, 70; 145-175.

Litwin TR, Clarke MA, Dean M, Wentzensen N (2017). Somatic Host Cell Alterations in HPV Carcinogenesis. *Viruses*, 9(8); pii: E206.

Liz J, Esteller M (2016). lncRNAs and microRNAs with a role in cancer development. *Biochim Biophys Acta*, 1859; 169e176.

Lodygin D, Epanchintsev A, Menssen A, Diebold J, Hermeking H (2005) Functional epigenomics identifies genes frequently silenced in prostate cancer. *Cancer Res* 65: 4218–4227

Loh KM, van Amerongen R, Nusse R (2016). Generating Cellular Diversity and Spatial Form: Wnt Signaling and the Evolution of Multicellular Animals. *Dev Cell*, 38(6); 643-55.



Macgregor, S (2011). Genome-wide association study identifies a new melanoma susceptibility locus at 1q21.3. *Nat. Genet*, 43: 1114–1118.

Masliah-Planchon J, Bieche I, Guinebretiere JM, Bourdeaut F, Delattre O (2015). SWI/SNF chromatin remodeling and human malignancies. *Annu Rev Pathol*, 10; 145e171.

Meng C, Zhu X, Peng G, Dai D (2007). Re-expression of methylation-induced tumor suppressor gene silencing is associated with the state of histone modification in gastric cancer cell lines. *World J Gastroenterol*, 3(46); 6166-71.

Minde DP, Anvarian Z, Rüdiger SG, Maurice MM (2011). Messing up disorder: how do missense mutations in the tumor suppressor protein APC lead to cancer?. *Mol Cancer*, 10; 101.

Miyoshit Yasuo, Ando Hiroshi (1992). Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation clusters region in the APC gene. *Human molecular genetics*, 1(4); 229-233.

Miyoshit Yasuo, Ando Hiroshi et al. (1992). Germ-line mutations of the APC gene in 53 familial adenomatous polyposis patients. *Medical Sciences Proc. Natl. Acad. Sci*, 89; 4452-4456.

Muñoz N, Bosch FX, De Sanjose S, et al. (2003). Epidemiologic classification o human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*, 348; 518–27.

Moody CA, Laimins LA (2010). Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer*, 10(8); 550-60.

Mosimann C, Hausmann G, Basler K (2009). Beta-catenin hits chromatin: regulation of Wnt target gene activation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10; 276–286

Nakamura Y, Nishisho I, Kinzler KW, Vogelstein B, Miyoshi Y, Miki Y, Ando H, Horii A, Nagase H (1991). Mutations of the adenomatous polyposis coli gene in familial polyposis coli patients and sporadic colorectal tumors. *Princess Takamatsu Symp*, 22; 285-92.



Narayan G, Arias-Pulido H, Koul S, Vargas H, Zhang FF, Villella J, Schneider A, Terry MB, Mansukhani M, Murty VV (2003). Frequent promoter methylation of CDH1, DAPK, RARB, and HIC1 genes in carcinoma of cervix uteri: its relationship to clinical outcome. *Mol Cancer*, 2; 24.

Negrini S, Gorgoulis VG, and Halazonetis TD (2010). Genomic instability—an evolving hallmark of cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*, 11; 220–228.

Nowell PC (1997). Genetic alterations in leukemias and lymphomas: impressive progress and continuing complexity. *Cancer Genet. Cytogenet*, 94; 13-19.

Nusse R (2012) .Wnt signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4(5); pii 011163.

Nusse R and Varmus V (2012).Three decades of Wnts: a personal perspective on how a scientific field developed roel. *The EMBO Journal*, 31; 2670–2684.

Oda H, Imai Y, Nakatsuru Y, Hata J, Ishikawa T (1996). Somatic mutations of the APC gene in sporadic hepatoblastomas. *Cancer Res*, 56(14); 3320-3.

Ohm JE, McGarvey KM, Yu X, Cheng L, Schuebel KE, Cope L, Mohammad HP, Chen W, Daniel VC, Yu W, Berman DM, Jenuwein T, Pruitt K, Sharkis SJ, Watkins DN, Herman JG and Baylin SB (2007). A stem cell–like chromatin pattern may predispose tumor suppressor genes to DNA hypermethylation and heritable silencing. *Nat Genet*, 39(2); 237-243.

Ooi SK, Bestor TH (2008). The colorful history of active DNA demethylation. *Cell*,133(7); 1145-8.

Pavicic W, Perkio“ E, Kaur S, Peltoma“ ki P (2011). Altered methylation at microRNA-associated CpG islands in hereditary and sporadic carcinomas: a methylation-specific



multiplex ligation-dependent probe amplification (MS-MLPA)-based approach. *Mol Med*, 17; 726-735.

Pereira-Suarez A, Mearz M, Lizano M, Estrada-Chavez C, Hernandez F, Olivera P, Pérez E, Padilla P, García-Carrancá A. (2002). *Tumor biology*. 23, 45-53.

Phesse TJ, Parry L, Reed KR, Ewan KB, Dale TC, Sansom OJ, Clarke AR (2008). Deficiency of Mbd2 attenuates Wnt signaling. *Mol Cell Biol*, 28; 6094–6103.

Podlaha O, Riester M, De S, Michor F. (2012) Evolution of the cancer genome. *Trends Genet*, 28(4); 155-63.

Pogribny IP (2006). Histone H3 lysine 9 and H4 lysine 20 trimethylation and the expression of Suv4–20h2 and Suv39h1 histone methyltransferases in hepatocarcinogenesis induced by methyl deficiency in rats. *Carcinogenesis*, 27; 1180–1186.

Polakis P (2007). The many ways of Wnt in cancer. *Curr Opin Genet Dev*, 17; 45–51.

Polakis P. (2012) Wnt signaling in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4(5).

Prakash S, Swaminathan U (2015). β catenin in health: A review. *J Oral Maxillofac Pathol*, 19(2); 230-8.

Ray-Gallet D, Almouzni G (2010). Nucleosome dynamics and histone variants. *Essays Biochem*, 48(1): 75-78.

Roberts DM, Pronobis MI, Poulton JS, Waldmann JD, Stephenson EM, Hanna S, Peifer M (2011). Deconstructing the beta-catenin destruction complex: mechanistic roles for the tumor suppressor APC in regulating Wnt signaling. *Mol Biol Cell*, 22; 1845–1863.

Rodriguez-Paredes M, Esteller M (2011). Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nat Med*, 17; 330–339.



Rodriguez-Sastre M, Gonzalez-Maya L, Mohar A, Carranca-García A. (2005). Abnormal distribution of E-cadherin and h-catenin in different histologic types of cancer of the uterine cervix. *Gynecologic Oncology*, 97; 330–336.

Saito Y, Liang G, Egger G, Friedman JM, Chuang JC, Coetzee GA, Jones PA (2009). Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatinmodifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell*, 9; 435-443.

Salahshor S, Woodgett JR (2005). The links between axin and carcinogenesis. *J Clin Pathol*, 58; 225–236.

Sandoval J and Esteller M (2012). Cancer epigenomics: beyond genomics. *Current Opinion in Genetics & Development*, 22; 50–55.

Sansom OJ, Berger J, Bishop SM, Hendrich B, Bird A, Clarke AR (2003). Deficiency of Mbd2 suppresses intestinal tumorigenesis. *Nat Genet* 34: 145–147.

Schübeler D (2015). Function and information content of DNA methylation. *Nature*; 517; 321–326.

Seeger RC (1985). Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N. Engl. J. Med*, 313; 1111-1116.

Segditsas S, Sieber OM, Rowan A, Setien F, Neale K, Phillips RK (2008). Promoter hypermethylation leads to decreased APC mRNA expression in familial polyposis and sporadic colorectal inactivation of promoter 1B of APC in Rohlin et al tumours, but does not substitute for truncating mutations. *Exp Mol Pathol*, 85; 201–206.

Serman L, Nikuseva T, Serman A, Vranic S (2014). Epigenetic alterations of the Wnt signaling pathway in cancer: a mini review. *Bosn J Basic Med Sci*, 14(4); 191-194.

Shi, Y (2011). A genome-wide association study identifies new susceptibility loci for non-cardia gastric cancer at 3q13.31 and 5p13.1. *Nat. Genet*, 43; 1215–1218



Siegel R, Naishadham D, Jemal A (2013). Cancer statistics. *Cancer J. Clin*, 63 (1); 11–30.

Shinohara A, Yokoyama Y, Wan X, Takahashi Y, Mori Y, Takami T, Shimokawa, Tamaya T. (2001) Cytoplasmic/Nuclear expression without mutation of exon 3 of the β -catenin gene is frequent in the development of the neoplasm of the uterine cervix. *Gynecol Oncol*, 82 (3); 450–455.

Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R (2007). Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer*, 121; 621–32

Stanley M (2010). Pathology and epidemiology of HPV infection in females *Gynecol Oncol*, 117(2); S5-10.

Stoehr R, Wissmann C, Suzuki H, Knuechel R, Krieg RC, Klopocki E, Dahl E, Wild P, Blaszyk H, Sauter G, Simon R, Schmitt R, Zaak D, Hofstaedter F, Rosenthal A, Baylin SB, Pilarsky C, Hartmann A (2004). Deletions of chromosome 8p and loss of sFRP1 expression are progression markers of papillary bladder cancer. *Lab Invest*, 84; 465–478.

Stratton M, Campbell P, and Andrew P (2009). The cancer genome. *Nature*, 458 (7239); 719-724.

Suzuki H, Gabrielson E, Chen W, Anbazhagan R, van Engeland M, Weijnenberg MP, Herman JG, Baylin SB (2002). A genomic screen for genes upregulated by demethylation and histone deacetylase inhibition in human colorectal cancer. *Nat Genet*, 31; 141–149.

Suzuki H., Watkins D.N., Jair K-M., Shuebel K.E., Markowitz S.D. Chen W.D., Pretlow T.P. Tang B., Akiyama Y., Engeland M., Hinoda Y., Toyota M, Imai K, and Tokino T, Herman J.G. and Baylin SB (2008). Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive Wnt signaling in colorectal cancer. *Nature Genetics*, 36; 417-422.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA



Suzuki H., Toyota M, Caraway H. Gabrielson E, Ohmura T, Fujikane T, Nishikawa N, Sogabe Y, Nojima M, Sonoda M, Mori M, Hirata K, Imai K, Shinomura Y, Baylin SB and Tokino T (2008). Frequent epigenetic inactivation of Wnt antagonist genes in breast cancer. *British Journal of Cancer*, 98; 1147 – 1156.

Svedlund J, Aurén M, Sundström M, Dralle H, Akerström G, Björklund P, Westin G (2010). Aberrant WNT/ β -catenin signaling in parathyroid carcinoma. *Mol Cancer*, 9; 294.

Syrjanen K (1996). Spontaneous evolution of intraepithelial lesions according to the grade and type of the implicated human papillomavirus (HPV). *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod*, 65(1); 45-53.

Timp W, Feinberg AP (2013). Cancer as a dysregulated epigenome allowing cellular growth advantage at the expense of the host. *Nat. Rev. Cancer*, 13 (7); 497–510.

Thomas Joseph a, Priya Chacko a, Remani Wesley b, P.G. Jayaprakash c, Francis V., et al. (2006): Germline genetic polymorphisms of CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 genes in Indian cervical cancer: Associations with tumor progression, age and human papillomavirus infection *Gynecologic Oncology*, 101; 411–417.

Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J. Clin.* 65 (2), 87–108.

Tryndyak VP, Kovalchuk O, Pogribny IP: Loss of DNA methylation and histone H4 lysine 20 trimethylation in human breast cancer cells is associated with aberrant expression of DNA methyltransferase 1, Suv4-20h2 histone methyltransferase and methyl-binding proteins. *Cancer Biol Ther* 2006, 5:65-70.

Tsuchiya T, Tamura G, Sato K, Endoh Y, Sakata K, Jin Z et al. (2000). Distinct methylation patterns of two APC gene promoters in normal and cancerous gastric epithelia. *Oncogene* 19: 3642–3646.

Tsung-Hsien Su, Jan-Gowth Chang, Kun-Tu Yeh, Ting-Hsu Lin, Tai-Ping Lee, Jui-Chang. Chen and Cheng-Chieh Lin (2003). Mutation analysis of CTNNB1 (β -catenin) and AXIN1,



the components of Wnt pathway, in cervical carcinomas. *Oncology Reports*, 10;1195-1200.

Uren Aykut, Shannon Fallen, Hang Yuan, Alp Usubutun, Turkan Kucukali, Schlegel R and Toretsky JA (2005). Activation of the Canonical Wnt Pathway during Genital Keratinocyte Transformation: A Model for Cervical Cancer Progression. *Cancer Res*, 65 (14); 6199-6206.

Valenta T, Hausmann G (2012). The many faces and functions of b-catenin. *The EMBO Journal*, 31; 2714–2736.

van der Meide WF, Snellenberg S, Meijer CJ, Baalbergen A, Helmerhorst TJ, van der Sluis WB, Snijders PJ, Steenbergen RD (2011). Promoter methylation analysis of WNT/ β -catenin signaling pathway regulators to detect adenocarcinoma or its precursor lesion of the cervix. *Gynecol Oncol*, 123(1);116-22.

van Veelen W, Le NH, Helvensteijn W, Blonden L, Theeuwes M, Bakker ER, Franken PF, van Gorp L, Meijlink F, van der Valk MA, Kuipers EJ, Fodde R, Smits R (2011). b-catenin tyrosine phosphorylation increases Wnt signalling and intestinal tumorigenesis. *Gut*, 60; 1204–1212.

VincentA, OmuraN, HongSM, JaffeA, EshlemanJ, GogginsM. 2011. Genome-wide analysis of promoter methylation associated with gene expression profile in pancreatic adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*, 17; 4341–4354.

Vlad A, Ro“hrs S, Klein-Hitpass L, Mu“ller O (2008). The first five years of the Wnt targetome. *Cell Signal*, 20; 795–802.

Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu E, Zhou A, Diaz Jr. LA, Kinzler KW (2013). Cancer genome landscapes, *Science*, 339 (6127);1546–1558.

Wang, SI (1997). Somatic mutations of PTEN in glioblastoma multiforme. *Cancer Res*, 57; 4183-4186.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA



Waller A, Findeis S, Lee MJ (2016). Familial Adenomatous Polyposis. *J Pediatr Genet*, 5(2); 78-83.

Wisman G, Nijhuis E, Hoque M, Reesink-Peters N, Koning A, Volders H, Buikema H, Boezen M, Hollema H, Schuurin Ed, Sidransky D and van der Zee A. (2006). Assessment of gene promoter hypermethylation for detection of cervical neoplasia. *Int. J. Cancer*, 119; 1908–1914.

Worm J, Christensen C, Grønbaek K, Tulchinsky E, Guldberg P (2004). Genetic and epigenetic alterations of the APC gene in malignant melanoma. *Oncogene*, 23 (30); 5215-5226.

Wu R, Zhai Y, Fearon ER, Cho KR (1996). Diverse mechanisms of beta-catenin deregulation in ovarian endometrioid adenocarcinomas. *Cancer Res*, 56(14); 3320-3.

Yang N, Nijhuis E, Volders H, Eijsink J, Lendvai A, Zhang B, Hollema H, Schuurin E, Wisman G, van der Zee A (2010). Gene promoter methylation patterns throughout the process of cervical carcinogenesis. *Cellular Oncology* , 32 (1-2); 131–143.

Yang X, Phillips D, Ferguson A, Nelson W, Herman J, Davidson N (2001) Synergistic activation of functional estrogen receptor (ER)-alpha by DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition in human ER-alpha-negative breast cancer cells. *Cancer Res*, 61(19); 7025-9.

Yutaka Kondo, Lanlan Shen, Alfred S, Saira Ahmed, Yanis Bumber, Chantale Charo, Tadanori Yamochi, Takeshi Urano, Koichi Furukawa, Bernard Kwabi-Addo, David L Gold, Yoshitaka Sekido, Tim Hui-Ming Huang & Jean-Pierre J Issa (2008). Gene silencing in cancer by histone H3 lysine 27 trimethylation independent of promoter DNA methylation. *Nat Genet*, 40(6); 741-750.

Zambrano P, Segura-Pacheco B, Perez-Cardenas E, Cetina L, Revilla-Vazquez A, Taja-Chayeb L, Chavez-Blanco A, Angeles E, Cabrera G, Sandoval K, Trejo-Becerril C, Chanona-Vilchis J and Duenas-González A (2005). A phase I study of hydralazine to



demethylate and reactivate the expression of tumor suppressor genes. *BMC Cancer*, 5; 44.

Zeki K, Spambalg D, Sharifi N, Gonsky R, Fagin JA (1994). Mutations of the adenomatous polyposis coli gene in sporadic thyroid neoplasms. *J Clin Endocrinol Metab*, 79(5); 1317-21.

Zhan T, Rindtorff N, Boutros M (2017). Wnt signaling in cancer. *Oncogene*, 36; 1461–1473

Zhuang Z (1998). Trisomy 7-harboring non-random duplication of the mutant MET allele in hereditary papillary renal carcinomas. *Nature Genet*, 20; 66-69.

zur Hausen H, Gissmann L (1980). Partial characterization of viral DNA from human genital warts (*Condylomata acuminata*). *Int J Cancer*, 25; 605–9.

zur Hausen H, de Villiers EM, Gissmann L (1981). Molecular cloning of viral DNA from human genital warts. *J Virol*, 40; 932–5.

zur Hausen H, Dürst M, Gissmann L, Ikenberg H (1983). A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80; 3812–5.

zur Hausen H, Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W (1984). A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J*, 3; 1151–7.



*Estudio de las alteraciones de Adenomatous Polyposis Coli;
(componente de la vía de señalización Wnt) en cáncer cervicovaginal.*

ANEXOS



SUPLEMENTOS (Figuras)

Para corroborar la pureza y determinar la factibilidad de ser utilizado para la amplificación por PCR, el ADN-genómico fue separado por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (**Figura S1**) y sirvió como molde para amplificar correctamente un fragmento del gen de la β -globina (control positivo de amplificación: **Figura S2**), en base a las condiciones descritas en la Metodología. Por todo lo anterior, se puede comentar que la pureza del ADN-genómico de las muestras permitirá su uso en subsecuentes aplicaciones; modificación con bisulfito y MS-PCR.

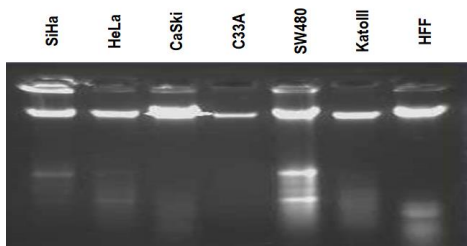


Figura S1. Electroforesis del ADN obtenido de las distintas muestras. Líneas celulares de cáncer cervico uterino (Caski, HeLa, SiHa y C33A), cáncer de colon (SW480) y cáncer gástrico (KatollI), cultivo primario de fibroblastos (HFF). Se cargo 1 μ g para cada muestra. El gel de agarosa fue al 0.8%.



Figura S2. Electroforesis del gen β -globina amplificado por PCR. Producto amplificado de 265 pb; a partir del ADN-genómico de las líneas celulares de cáncer cervico uterino (Caski, SiHa, HeLa y C33A), cáncer de colon (SW480) y cáncer gástrico (KatollI), cultivo primario de fibroblastos (HFF).

Mmp= marcador de peso molecular.

De igual manera, para corroborar la pureza determinada por la cuantificación en base la relación 260/280 nm, el ARNm fue separado por electroforesis en gel de agarosa

al 0.8%. Como se puede observar en la **Figura S3** el ARN obtenido de las diferentes líneas celulares no muestra problemas de fragmentación. Estos resultados nos permiten confirmar que las condiciones de extracción/purificación fueron adecuadas.

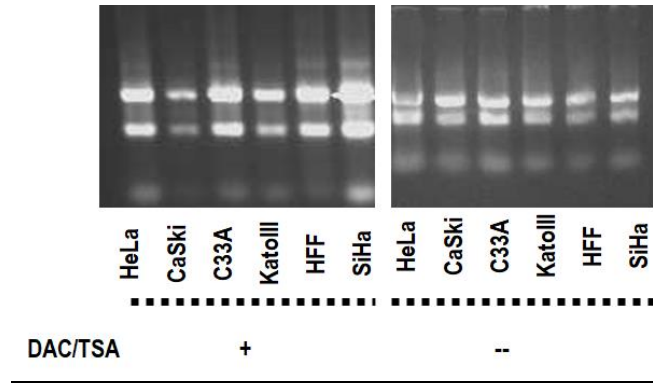


Figura S3. Electroforesis de RNA's totales de las distintas muestras. Líneas celulares de cáncer cervico uterino (Caski, HeLa y C33A), cáncer de colon (SW480) y cáncer gástrico (Kat0III), cultivo primario de fibroblastos (FB) y linfocitos purificados (LF) normales. Se cargo 1 μ L para cada muestra. El gel de agarosa fue al 0.8%.

Como se observa en la **Tabla S1** (Suplemeto 1), la EC_{50} al tratamiento con DAC/TSA es más alta en la línea celular de cáncer cervico uterino CaSki, mientras que es más baja en la línea celular de cáncer cervico uterino HeLa, es decir, un tratamiento con DAC (137.02 μ M) / TSA (0.5 μ M) y DAC (73.52 μ M) / TSA (0.5 μ M) afectaría la viabilidad del 50% de las células CaSki y HeLa, respectivamente.

Línea Celular	CI50 de DAC + 0.5 μ M TSA
CasKi	137.02 μ M
HeLa	73.52 μ M
C33	88.45 μ M
Fibroblastos	82.2 μ M
Kat0III	113.13 μ M

Tabla 1S. CI50 obtenidas al evaluar el tratamiento con DAC7TSA en las distintas muestras.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA





Wnt/ β -catenin pathway activation and silencing of the APC gene in HPV-positive human cervical cancer-derived cells

ERICK AYALA-CALVILLO¹, LUIS HUMBERTO MOJICA-VÁZQUEZ²,
ALEJANDRO GARCÍA-CARRANCA³ and LETICIA GONZÁLEZ-MAYA¹

¹Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, CP 62209; ²Centro de Ciencias de la Atmósfera, Genotoxicología Ambiental-Universidad Nacional Autónoma de México; ³Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas-Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX, CP 14080, México

Received June 23, 2017; Accepted September 6, 2017

DOI: 10.3892/mmr.2017.7853

Abstract. Although persistent infections with high-risk human papilloma virus (HPV) constitute the most significant cofactor for the development of cervical cancer, they are insufficient on their own. Mutations or epigenetic inactivation of the tumor suppressor adenomatous polyposis coli (APC), the two acting as prominent oncogenic mechanisms in a number of types of cancer, are frequently associated with aberrant activation of the Wnt/ β -catenin pathway. According to these observations, it was hypothesized that APC alteration may lead to β -catenin deregulation and the abnormal expression of direct targets of the Wnt pathway in HPV-infected cervical cancer cells. The present study confirmed that the stabilization of β -catenin correlates with enhanced transcriptional activity of the β -catenin/T-cell factor complex in cervical cancer cell lines. Sequence analysis of the 'hot-spot' in the mutation cluster region did not exhibit genetic alterations that may be associated with APC gene inactivation. In addition, it was identified that there was a good correlation with the hypermethylation status of the APC promoter 1A and the abnormal accumulation of endogenous β -catenin in cell lines and biopsies infected with HPV16, although not HPV18. Removal of the epigenetic markers led to an increase in APC levels and a reduction of β -catenin expression in two transcriptional targets of the Wnt pathway: Matrix metalloproteinase-7 and vascular endothelial growth factor. The present study suggested that the increase in Wnt activity in certain cervical cancer-derived cells may be associated with an alteration in the methylation status of the APC gene promoter 1A.

Introduction

The Wnt/ β -catenin pathway serves critical functions in the sequential development of the neoplastic process from initiation, proliferation and transformation in a broad range of types of cancer. Aberrant activation of the Wnt pathway may lead to β -catenin stabilization and accumulation in the cytoplasm, allowing its translocation into the nucleus to act as a transcriptional co-activator of members of the T-cell factor (TCF)/lymphoid enhancing factor (LEF) family of transcription factors. It is known that the β -catenin/TCF-LEF complex induces the transcription of genes involved in carcinogenesis including c-myc, matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) and the vascular endothelial growth factor (VEGF) (1). The tumor suppressor adenomatous polyposis coli (APC), an essential part of a multi-protein complex together with protein phosphatase 2A (PP2A), axin, glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β), and casein kinase I (CK1), serves an important function in turning off the β -catenin signaling pathway. When this complex is active, GSK-3 β and CK1 phosphorylate the amino terminal serine and threonine residues of β -catenin, an initial step which targets it for degradation by the proteasomal machinery (2).

Cervical carcinoma, one of the most common malignancies in women worldwide (3), is associated with persistent infection with oncogenic or high-risk human papillomavirus (HR-HPV). Although HR-HPV infection is required, it is insufficient on its own to cause cervical cancer (4). Several lines of evidence have indicated a potential association between activation of the Wnt signaling pathway and HPV-mediated cervical cancer. For instance, Uren *et al* (5) and Bulut *et al* (6) generated two models that mimicked the effects of HPV infection on the human cervical epithelium for cancer progression: i) HPV-immortalized human keratinocytes, either expressing mutated S37A β -catenin or overexpressing Wnt1; and ii) double-transgenic mice overexpressing β -catenin and HPV16-E7 oncogenes. In addition, β -catenin has been observed to be localized and expressed in the cytoplasm and nucleus in human cervical carcinoma samples (7,8) and cell lines (9), indicating the activation of the Wnt pathway. The results of these previous studies suggested that activation of

Correspondence to: Dr Leticia González-Maya, Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, 1001 Avenida Universidad, Cuernavaca, Morelos, CP 62209, México
E-mail: letymaya@uaem.mx

Key words: cervical cancer, DNA methylation, adenomatous polyposis coli, β -catenin, Wnt signaling pathway



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA





the canonical Wnt pathway may represent one of the key events required for the malignant transformation of HPV-infected epithelial cells.

Previous studies have demonstrated that β -catenin deregulation is frequently associated with alterations in the APC gene, and ~80 to 90% of all APC gene mutations are confined to codons 1,286 to 1,513, a region known as the mutation cluster region (MCR), these mutations typically lead to a truncated protein lacking the β -catenin binding and regulatory sites, as is frequently observed in colon cancer (10,11). In addition, transcriptional silencing via promoter hypermethylation may impair APC function, a phenomenon of epigenetic inactivation observed in tumors in the absence of APC gene mutations. For example, in gastric cancer, a decrease in or loss of APC expression has been identified to be associated with the APC gene promoter A1 hypermethylation (12,13).

According to these observations, it has been suggested that the stabilization and activation of β -catenin in cervical cancer-derived cells are a consequence of alterations in APC gene expression. To test this hypothesis, the present study first sought to determine the transcriptional activity of β -catenin/TCF among a group of cervical cancer cell lines. Subsequently, MCR-region mutational and methylation status analyses of the APC gene and its promoter 1A, respectively, were performed and the impact of APC gene mutations and/or its epigenetic silencing on two known Wnt target genes in cervical carcinoma cell lines was analyzed.

Materials and methods

Cell cultures and clinical samples. Human cervical cancer-derived cell lines CaSki, SiHa and HeLa, in addition to C33A and the colon cancer cell line SW480 were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). The gastric cancer cell line KATOIII was provided by Dr Angel Zarain-Herzberg (Facultad de Medicina-UNAM, CDMX, México). Human foreskin fibroblasts (HFF) were provided by Dr. María Luisa Villarreal Ortega (Centro de Investigaciones en Biotecnología-UAEM, Cuernavaca, Morelos, México). HFF and CaSki cells were grown in RPMI-1640 (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA); SiHa, HeLa, C33A, SW480 and KATOIII cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium/F-12 (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc.), and all the cultured cells were supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc.) and 2 mM L-glutamine (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc.). Cells were cultured at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Normal tissue samples and tumors from the uterine cervix were obtained from archives of the Department of Gynecology at the Hospital General Manuel Gea González and the Department of Pathology at the Instituto Nacional de Cancerología-SSA (CDMX, México). This set of samples has been characterized previously for clinical pathological parameters, type of HPV and β -catenin protein status (7). All the samples were frozen in liquid nitrogen immediately following resection and stored at -70°C until processing.

Reporter assay. The TOPflash/FOPflash TCF reporter system (Upstate Biotechnology, Inc., Lake Placid, NY, USA) was

used to directly measure the levels of Wnt signaling in human cervical cancer cell lines. A total of 4,000 cells were cultured in 96-well plate and transfected, with either TOPflash or FOPflash (100 ng) and the internal control plasmid pRL-Renilla (5 ng; Promega Corporation, Madison, WI, USA) expressing *Renilla* luciferase, using Lipofectamine reagent (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc.). The TOPflash and FOPflash reporters contain two sets of three copies of wild-type (TOP) or mutant (FOP) β -catenin/TCF binding sites, respectively, in addition to the thymidine kinase minimal promoter upstream of the firefly luciferase open reading frame. Luciferase activity was measured with Dual-Glo™ Luciferase Assay System (Promega Corporation) 48 h following transfection, according to the manufacturer's protocol. Firefly luciferase activity was normalized to *Renilla* luciferase activity. All results are expressed as TOPflash/FOPflash correlation mean \pm standard deviation for independent triplicate cultures.

Mutational analysis of APC. Genomic DNA was isolated from cells using the standard Proteinase K treatment followed by phenol/chloroform extraction (14). Briefly, the cells were incubated in the lysis buffer (Tris 10 mM, EDTA 20 mM, SDS 0.5% and Proteinase K 100 μ M/ml) for 20 min at 45°C. The lysate was extracted by phenol/chloroform (1:1, v/v), DNA was precipitated with isopropanol (1:1, v/v), then washed with 75% ethanol and the pellet DNA was dissolved in water. The mutation cluster region of the APC gene was amplified as three overlapping fragments (codons 1032-1703) in a nested polymerase chain reaction (PCR) strategy. In addition to the previously described primers (15), new primers were used to adapt the size of different amplicons (Table I). PCR was performed in a 50- μ l volume containing 100 ng genomic DNA and 0.25 μ M each primer using Taq DNA Polymerase-recombinant (Fermentas; Thermo Fisher Scientific, Inc.). The PCR reactions were run at 95°C for 5 min followed by 35 cycles at 95°C for 40 sec, followed by 54°C, 63°C and 60°C for 60 sec as the annealing step of the three overlapping fragments, respectively, and finally at 72°C for 60 sec. The PCR products were purified using the Qiaquick PCR purification kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). Mutational analysis by direct sequencing was performed using the BigDye Terminator version 3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc.). All sequencing analyses were performed at least twice on two independent PCR products.

Methylation analysis. DNA methylation patterns in the CpG islands of the APC gene promoter A1 were determined by methylation-specific PCR (MSP), according to protocols described previously (16). Genomic DNA (1 μ g) was treated with sodium bisulfite using the EZDNA methylation kit (Zymo Research Corp., Irvine, CA, USA). For the MSP analysis of APC gene promoter 1A, the primers for the unmethylated reaction amplify a 108-bp PCR product, and the primers for the methylated reaction amplify a 98-bp product; all primer sequences used are listed in Table I. PCR amplification was carried out at 95°C for 5 min followed by 35 cycles at 95°C for 60 sec, 60°C for 40 sec and 72°C for 60 sec. PCR was run in a 50- μ l volume containing 100 ng genomic DNA, 0.25 μ M each primer using Taq DNA Polymerase-recombinant (Fermentas; Thermo Fisher Scientific, Inc.). Each experiment was repeated twice.



Table I. Primer sequences used in the present study.

Gene and method	Sense 5'-3'	Antisense 5'-3'	Product length (bp)
Mutational analysis			
Fragment A	CCCCTCGAGTCAGATGAGCAGTTG	CCGGATCCCTGCTTCCTGTGTCG	796
Fragment B	CCCCTCGAGCAGCTCCATCCAAG	CCGGATCCCCATCTGGAGTAC	809
Fragment C	CCCCTCGAGCCAGATAGCCCTGG	CCGGATCCCTCCTTGAGCCTC	839
MSP			
APCprom1AUNMet	GTGTTTTATTGTGGAGTGTGGGTT	CCAATCAACAAACTCCCAACAA	108
APCprom1AMet	TATTGCGGAGTGC GGTC	TCGACGAACTCCCGACGAA	98
RT-PCR			
MMP7	TGTTAAACTCCC GCGTCATA	GCGTTCATCCTCATCGAAGT	379
VEGF	GAGGGCAGAATCATCACGAA	AACGCTCCAGGACTTATACC	395
β -globin	CAACTTCATCCACGTTACCC	GAAGAGCCAAGGACAGGTAC	260
APC-exon 15	CCCCTCGAGTCAGATGAGCAGTTG	CCGGATCCCTGCTTCCTGTGTCG	796

bp, base pair; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; MMP-7, matrix metalloproteinase-7; VEGF, vascular endothelial growth factor; APC, adenomatous polyposis coli.

Treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine (Aza) and trichostatin-A (TSA). Cells were cultured at 60% confluence and incubated for 48 h in a medium containing 3 μ M DNA methyltransferase (DNMT) inhibitor Aza (Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Germany). The medium was refreshed every 24 h. The cells were treated with the histone deacetylase (HDAC) inhibitor TSA (Sigma-Aldrich; Merck KGaA) at 0.5 and 3 μ M of decitabine for further 24 h to complete 72 h of treatment. The medium was removed and the cells were processed to perform assays by reverse transcription (RT)-PCR and western blot analysis.

RNA isolation and RT-PCR. Total RNA was extracted from cells by using TRIzol reagent (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc.), according to the manufacturer's protocol. For RT-PCR, total RNA (5 μ g) was used for cDNA synthesis by reverse transcription using a RevertAid H. Minus First Strand cDNA Synthesis kit (Fermentas; Thermo Fisher Scientific, Inc.), according to the manufacturer's protocol, in a total volume of 20 μ l. The PCR reactions of APC, VEGF, MMP7 and β -globin genes were performed using the specific primers presented in Table I, and standard PCR conditions were used: 95°C for 5 min, followed by 35 cycles at 95°C for 60 sec, annealing at 60°C, 62°C, 58°C and 55°C for each gene, respectively, for 60 sec, and extension at 72°C for 60 sec. The PCR products were visualized by electrophoresis in 2% agarose gels.

Western blot analysis. Cells were homogenized in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.5% sodium deoxycholate and 0.1% SDS), containing protease inhibitors cocktail (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). The protein concentration was determined by the bicinchoninic acid assay (Pierce; Thermo Fisher Scientific, Inc.). Total proteins (25 μ g) was separated by a 7% SDS-PAGE and transferred onto polyvinylidene fluoride membranes (EMD Millipore, Billerica, MA, USA). The antibodies and dilutions used included anti- β -catenin (cat. no. C19220; 1:2,000; BD Biosciences,

San Jose, CA, USA) and anti- β -actin (cat. no. 81178, 1:100; Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA), both incubated for 5 h at room temperature and following extensive washing the membranes were incubated with anti-mouse immunoglobulin G-horseradish peroxidase-conjugated antibody (cat. no. Nr7074, 1:5,000; Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA) for 1 h at room temperature and revealed with Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, USA). Membranes were probed for β -actin to normalize for loading.

Statistical analysis. Data were analysed using the GraphPad Prism 5.0 statistical program (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) and statistical differences were evaluated using one-way analysis of variance followed by Tukey's multiple comparisons test. $P < 0.05$ was considered to indicate a statistically significant difference.

Results

β -catenin expression and transcriptional activity of the β -catenin/TCF complex in cervical cancer cell lines. β -catenin levels in different cell lines were analyzed using western blotting and there was abundant β -catenin in CaSki cells, low levels in HeLa cells, intermediate levels in SiHa and none detected in C33A cancer-derived cells (Fig. 1A). The transcriptional activity of the β -catenin/TCF complex in these four cell lines (CaSki, SiHa, HeLa and C33A) was subsequently analyzed using a luciferase reporter assay with TCF reporter constructs (TOPflash and FOPflash). The results demonstrated that the activity of the TCF reporter TOPflash was increased compared with the FOPflash reporter in all cell lines except C33A cells. The transcriptional activity of the β -catenin/TCF complex was higher in CaSki cells, with higher β -catenin levels, compared with the transcriptional activity observed in SiHa and HeLa cells (Fig. 1B). The CaSki cells, infected with HPV16, thus exhibited the highest levels

of β -catenin expression and transcriptional activity. These results demonstrated that the activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway responded in a concentration-dependent manner to the levels of β -catenin in these cell lines.

APC gene mutations in cervical cancer cell lines. To investigate the existence of sequence variation in APC, one of the most important members of the β -catenin degradation complex, the MCR region, was evaluated via PCR and direct sequencing. As a positive control, DNA extracted from the colon cancer cell line SW480 was used, homozygous for a mutation at codon 1338 that generates a truncated APC protein (17), leading to abnormal accumulation/delocalization of β -catenin. The sequence analysis of the MCR did not reveal any mutations that were associated with the activation of APC in the cervical cancer cell lines CaSki, SiHa, HeLa and C33A (Fig. 2). None of the known 'hot-spots' in codons 1061, 1338 and 1450 were mutated, the most common sites of mutation in colorectal cancers (18). The mutation at codon 1338 (CAG/TAG) in SW480 cell line was detected (Fig. 2), confirming the single base specificity of the sequence analysis detection level. These results suggested that APC mutations are not responsible for the β -catenin accumulation observed in the cervical cancer cell lines analyzed.

Methylation of the APC gene promoter 1A in cervical cancer cell lines and biopsies. It has been demonstrated that APC downregulation may be associated with epigenetic rather than genetic alterations in other tumor cell types (19,20). To investigate that possibility, the methylation status of the APC gene promoter 1A in cervical cancer cell lines was analyzed by MSP. The gastric cancer cell line KATOIII, which exhibits bi-allelic methylation (12) and HFF, without methylation, were used as positive and negative controls, respectively. The APC gene promoter 1A did not exhibit DNA methylation at CpG dinucleotides in the C33A, HeLa and SiHa cell lines. However, CaSki cells demonstrated heterozygous signals, indicating methylated and unmethylated alleles of the APC gene promoter 1A. (Fig. 3A).

To further investigate a possible association between the methylated status of the APC promoter, the levels of expression of β -catenin or its aberrant localization and HPV infection, the same MSP analysis was applied to a small group of biopsies from tumors of the uterine cervix. Different samples, with variations in the delocalization/accumulation of β -catenin and the types of HPV (HPV-16 or -18), were analyzed (7). Notably, the MSP results demonstrated that methylated alleles (homozygous) or unmethylated/methylated alleles (heterozygous) of the APC gene promoter 1A were only amplified in cervical tumor samples that exhibited abnormal subcellular localization of β -catenin and were infected by the HPV16 type (Fig. 3B). These observations indicated a clear association between the methylation status of the APC gene promoter 1A and the abnormal localization of β -catenin observed in cervical carcinoma specimens infected by HR-HPV16.

APC expression and Aza/TSA treatment. To determine how the methylation patterns of APC gene promoter 1A identified in certain cervical cancer cell lines may affect APC transcript levels, their abundance was examined by quantifying exon

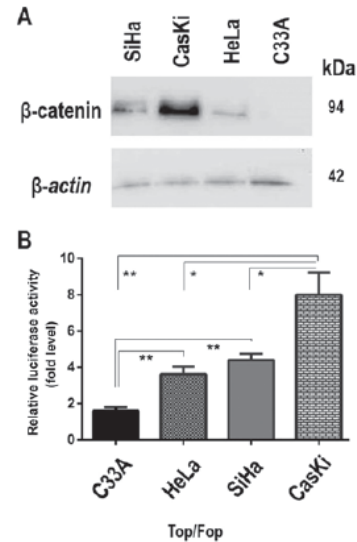


Figure 1. β -catenin expression and transcriptional activity in cervical cancer cell lines. (A) β -catenin protein was determined by western blot analysis. An anti- β -actin antibody was used as the control for total protein loading. (B) Cell lines were transfected with TOPFLASH or FOPFLASH luciferase reporter constructs. Luciferase activity was determined in triplicate and the results are expressed as TOP/FOP correlation mean \pm standard deviation for independent triplicate cultures. Significant induction of β -catenin activity (*P<0.05; **P<0.001) was calculated using an one-way analysis of variance and Tukey's multiple comparisons test. Top, TOPFLASH; Fop, FOPFLASH.

15 of APC by RT-PCR analysis. Abundant APC transcript expression in C33A, SiHa and HeLa cell lines and HFF was identified where the APC promoter 1A was not methylated, whereas the KATOIII cell line, which demonstrated bi-allelic methylation, exhibited undetectable levels of APC mRNA. As expected, a marked reduction of APC transcripts in CaSki cells, which presented a heterozygous methylation pattern, was identified (Fig. 4A). These observations indicated that methylation of the APC gene promoter 1A led to the repression of APC expression. To further confirm this role of the methylation of APC gene promoter 1A in the transcriptional repression of the APC gene, KATOIII cells carrying fully methylated APC alleles and all cervical cancer cell lines were treated with the DNA methyltransferase inhibitor, Aza, together with TSA. Following treatment, the KATOIII cells demonstrated high levels of APC transcripts, a result associated with the demethylation of APC gene promoter 1A and the chromatin remodeling by histone acetylation (13). Of note, CaSki cells also demonstrated a marked increase in APC transcript expression following treatment (Fig. 4B), whereas the HFF, C33A, SiHa and HeLa cells did not demonstrate changes in APC expression levels. Taken together, these results highlighted that the levels of APC gene expression were negatively regulated by the methylation status of the promoter 1A in CaSki and KATOIII cells.

β -catenin expression and Wnt signaling pathway activity. It was observed that low levels of APC were linked to the methylation status of its promoter 1A. Since APC is a direct

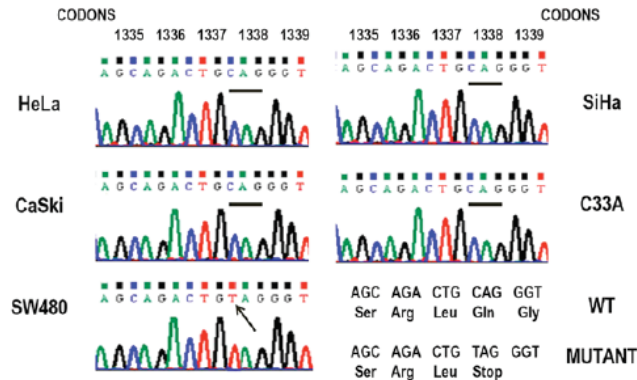


Figure 2. Sequence analysis of the APC gene. The APC mutation cluster regions from HeLa, CaSki, SiHa, C33A and SW480 cells were amplified by polymerase chain reaction and sequenced. The histogram from the codons 1335 to 1339 are shown as representative results of the sequence analysis with a mutation at codon 1338 (CAG/TAG) in the control SW480 cells. APC, adenomatous polyposis coli.

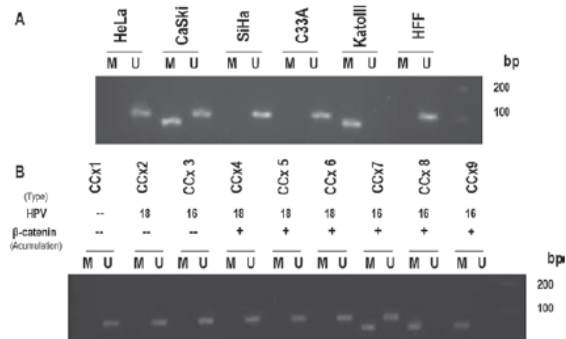


Figure 3. Hypermethylation analysis of APC gene promoter 1A. Methylation-specific PCR analysis were performed to determine APC promoter 1A methylation patterns in (A) cervical cancer cell lines and (B) biopsies. The DNA was treated with sodium bisulphite and PCR-amplified with primer pairs specific for unmethylated (108 bp) and methylated (98 bp) APC gene promoter 1A alleles. The PCR products were separated on an agarose gel. The HPV status of specimens is depicted as the specific HPV type present (16/18) or negative (-). The status of β -catenin is depicted as altered (+) or normal (-). KatoIII cells were included as positive control. APC, adenomatous polyposis coli; PCR, polymerase chain reaction; bp, base pair; HPV, human papilloma virus; U, unmethylated; M, methylated.

regulator of β -catenin, it was hypothesized that the reactivation of APC gene expression may lead to a reduction in β -catenin accumulation and a decrease in Wnt signaling pathway activity. To test this hypothesis, the expression of endogenous β -catenin and the expression of two β -catenin/TCF complex target genes in CaSki cells were evaluated prior to and following treatment with Aza and TSA. Prior to treatment, CaSki cells demonstrated abundant β -catenin protein levels, while following treatment; the β -catenin levels were significantly reduced. Consistently, alterations in β -catenin protein expression levels were observed in KATOIII cells, prior to and following treatment with Aza and TSA. In HFF, the negative control, the β -catenin protein levels did not alter following treatment (Fig. 5A). To further confirm the link between the presence of high β -catenin levels and high β -catenin/TCF complex activity, RT-PCR analysis was used to evaluate the expression of VEGF and MMP-7, two well-known target genes of the Wnt canonical pathway. The VEGF and MMP-7 mRNA levels were notably reduced following treatment in

CaSki and KATOIII cells, while no alteration was observed in HFF (Fig. 5B). Taken together, these results confirmed that the methylation of the APC gene promoter 1A in CaSki cells had a direct effect on the expression of β -catenin and on the activity of the β -catenin/TCF complex, leading to increased levels of at least two Wnt target genes: VEGF and MMP-7. This suggested that this epigenetic modification of the APC gene promoter 1A may directly contribute to the expression of Wnt signaling pathway target genes involved in tumor growth and invasion.

Discussion

It has been widely accepted that abnormal activation of the Wnt signaling pathway leads to the stabilization and accumulation of β -catenin in the cytoplasm, then to its translocation to the nucleus, where it promotes the transcription of multiple genes involved in tumor growth and invasion (2,21,22). In certain types of cancer, including colorectal and hepatocellular

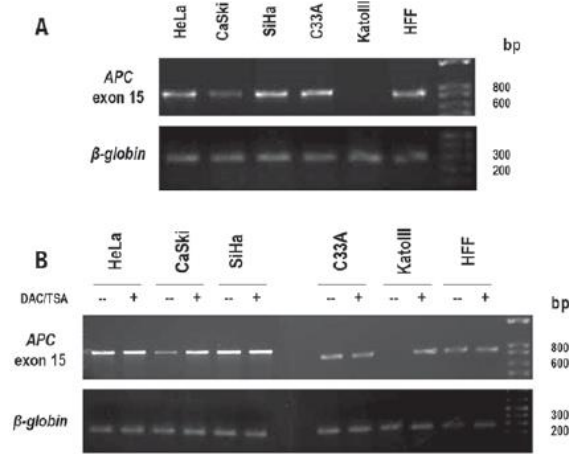


Figure 4. Analysis of APC gene expression in cervical cancer cell lines. (A) The expression of the APC gene in cancer cell lines was analyzed by RT-PCR. (B) The effect of the demethylating agents DAC (3 μ M) and TSA (0.5 μ M) on APC gene expression was measured by RT-PCR in cancer cell lines. Expression of β -globin mRNA was assessed in all samples as the control. The PCR products were separated on an agarose gel. APC, adenomatous polyposis coli; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; DAC, decitabine; TSA, trichostatin-A; bp, base pair.

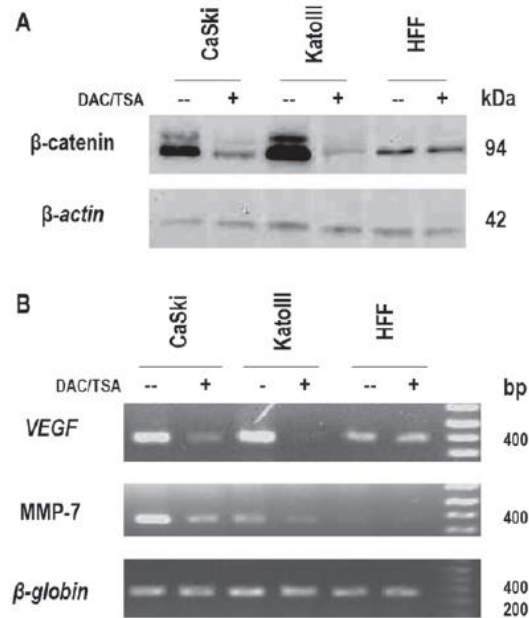


Figure 5. β -catenin repression and Wnt pathway activity. (A) β -catenin protein levels were determined by western blot analysis in CaSki, KatoIII and HFF cells prior to and following treatment with DAC (3 μ M) and TSA (0.5 μ M). An anti β -actin antibody was used as the control for total protein loading. (B) VEGF and MMP-7 mRNA levels were analyzed via RT-PCR in CaSki, KatoIII and HFF cells prior to and following treatment with DAC (3 μ M) and TSA (0.5 μ M). The expression of β -globin mRNA was assessed in all samples as the control. The PCR products were separated on an agarose gel. HFF, human foreskin fibroblasts; DAC, decitabine; TSA, trichostatin-A; VEGF, vascular endothelial growth factor; MMP-7, matrix metalloproteinase-7; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; bp, base pair.

carcinomas, deregulation of this pathway occurs almost invariably through mutation of the two key regulators: APC and β -catenin. These mutations lead to the reduced regulatory activity of APC and enhanced protein stability of β -catenin, respectively (23,24). No mutations in CTNNB1

(β -catenin gene) have yet been detected in cervical neoplasia or cancer-derived cell lines (8,9). Therefore, the present study aimed to identify mutations in the APC gene. However, no significant mutations were observed at the 'hot-spot' codons (1061, 1338 and 1450) within the MCR, the most common site



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA





of alterations that usually lead to a truncated protein lacking β -catenin binding and regulation sites (25).

A number of studies have suggested aberrant methylation in promoter regions as an epigenetic mechanism leading to the deregulation of tumor suppressor genes. Esteller *et al* (16) first demonstrated the mono- or bi-allelic methylation of APC gene promoter 1A in tumors of the gastrointestinal tract, including colon, gastric, pancreatic, esophageal and hepatic carcinomas. Subsequent studies have detected a similar status of promoter 1A methylation in several cancers, although in gastric cancer it has been identified with particularly high frequencies, in >50% of the cases (12,13,26). Fu *et al* (27) suggested that the hypermethylation of APC gene promoter 1A led to moderate activation of Wnt signaling pathway in colorectal cancer, instead of the usual mutations involving the APC and β -catenin genes. In apparent contradiction with these results, studies in cervical cancer samples have reported a great diversity in the APC gene promoter 1A methylation status (28,29), although none evaluated the association between APC promoter methylation, APC gene expression and the aberrant activation of the Wnt signaling pathway. To reconcile these data, the methylation patterns of the APC gene promoter 1A were evaluated in cell lines and biopsies from cervical cancer, in order to determine the frequency of this epigenetic regulation. These samples exhibited different levels of accumulation/delocalization of β -catenin and were either infected by HR-HPV type 16 or 18. The results demonstrated that the methylation frequency ranged from 1/4 (25%) to 3/9 (~33%) in cell lines and biopsies, respectively. These results are in conflict with a previous report, which demonstrated a 90% frequency of APC promoter 1A methylation in biopsies from cervical cancer (30). However, the results of the present study are comparable to other studies, which have proposed that the methylation of the APC promoter 1A, analyzed by MSP or by quantitative MSP, is not as common in cervical cancer cells, ranging between 12 and 35% (31-33). Notably, the results of the present study indicated a strong correlation between the methylation status of the APC gene promoter 1A and the delocalization/accumulation of β -catenin observed in biopsies that were infected by HPV16. Furthermore, alleles of APC promoter 1A which were completely unmethylated (homozygous) were observed in C33A (HPV negative), and HeLa cells (HPV18). The mechanism through which HPV16 promotes Wnt signaling requires further investigation. However, knocking down HPV16 E6/E7 reduced the Wnt signal in CaSki (HPV16) cells, while overexpressing HPV16 E6 and/or E7 increased the Wnt signal in C33A cells (34).

To confirm the role of the methylation of promoter 1A in the transcriptional regulation of the APC gene, APC gene expression was examined over the same panel of cervical cancer cell lines. The results demonstrated no significant difference in APC transcript levels in C33A, SiHa and HeLa cell lines when compared with HFF, where the APC gene promoter 1A was not methylated. The absence of APC mRNA in the KATOIII cell line, which presented bi-allelic hypermethylation, was confirmed (12), and it was identified that CaSki cells, which demonstrated a heterogeneous methylation pattern, exhibited a marked reduction of APC mRNA levels. The RT-PCR and MSP analyses thus demonstrated a correlation between APC expression levels and the APC gene promoter 1A

methylation status in the cell lines. Additionally, since some studies have demonstrated that the lack of expression of tumor suppressor genes may be reversed by treatment with epigenetic silencing inhibitors (inhibitor of DNMT and HDAC) in cancer cells (35,36), this strategy was employed to evaluate the recovery of APC gene expression. The results demonstrated a significant increase in APC mRNA levels following treatment with Aza and TSA in CaSki cells, whereas no significant alteration was observed in C33A, SiHa and HeLa cells. Similar results were observed in melanoma and gastric cancer cell lines carrying a mono- or bi-allelic methylation of APC gene promoter 1A, in which the low or absent APC expression levels were modified following Aza and TSA treatment, leading to its active transcription and recovery of APC expression (13,37). These results indicated that the presence of promoter methylation suppressed APC gene transcription and contributed to inactivating the APC tumor suppressor function in CaSki cells.

Conversely, previous studies with human cervical carcinoma samples observed an abnormal accumulation/delocalization of β -catenin, which constitutes a hallmark of the activated Wnt pathway (7,8). The present study confirmed through western blot analyses and luciferase reporter assays that the abnormal expression of β -catenin is associated, in a concentration-dependent manner, with the transcriptional activity of the β -catenin/TCF complex in CaSki, SiHa and HeLa cervical cancer cells infected with HR-HPV16 or 18. In CaSki cells (HPV16), with the greatest β -catenin expression, the strongest transcriptional activity was observed, whereas neither expression of β -catenin, nor β -catenin/TCF transcriptional activity was observed in non-HPV infected C33A cervical cancer cells (38,39). To determine the role of the APC promoter methylation in the regulation of Wnt/ β -catenin signaling, the expression of endogenous β -catenin and the expression of β -catenin/TCF complex target genes were evaluated following treatment with Aza and TSA. In CaSki cells, a reduction of β -catenin levels was observed, in addition to a decrease in the transcripts of two β -catenin/TCF target genes, VEGF and MMP-7. These results suggested that stimulating the expression of the APC gene via treatment with epigenetic silencing inhibitors reduced the abnormal activation of the Wnt pathway in CaSki cells. This conclusion is further supported by a study from Svedlund *et al* (40), which demonstrated that the treatment of a primary PC cell culture with the DNA hypomethylating agent Aza induced APC expression and reduced β -catenin levels. Taken together, these data suggested that the re-expression of the APC gene in CaSki cells appears to be sufficient to assemble a functional complex of Axin/PP2A/GSK-3 β /CK1/APC, capable of phosphorylating the β -catenin protein, eventually leading to its degradation and switching off the Wnt/ β -catenin signaling pathway (41).

In conclusion, the present study proposed that methylation-dependent silencing of the APC gene promoter 1A is a mechanism that contributes to the activation of Wnt signaling pathway in cervical cancer cells infected by high risk HPV16. The reduction of APC levels induced by hypermethylation of the APC gene promoter 1A, rather than direct mutations in the APC or β -catenin genes, leads to accumulation of β -catenin, which in turn increases the Wnt/ β -catenin transcriptional activity. This mechanism may lead to an increase



in the transcription of genes involved in cancer development. Therefore, the development of an epigenetic therapy to reactivate the expression of APC could be advantageous for the treatment of cervical cancer cells-infected with HPV16. However, further studies need to be performed to confirm the above results.

References

- Polakis P: Wnt signaling in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4: a008052, 2012.
- Munemitsu S, Albert I, Souza B, Rubinfeld B and Polakis P: Regulation of intracellular beta-catenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor-suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 3046-3050, 1995.
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ and Muñoz N: Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 189: 12-19, 1999.
- Moody CA and Laimins LA: Human papillomavirus oncoproteins: Pathways to transformation. *Nat Rev Cancer* 10: 550-560, 2010.
- Uren A, Fallen S, Yuan H, Usubittin A, Küçükali T, Schlegel R and Toretsky JA: Activation of the canonical Wnt pathway during genital keratinocyte transformation: A model for cervical cancer progression. *Cancer Res* 65: 6199-6206, 2005.
- Bulut G, Fallen S, Beauchamp EM, Drebing LE, Sun J, Berry DL, Kallakury B, Crum CP, Toretsky JA, Schlegel R and Uren A: Beta-catenin accelerates human papilloma virus type-16 mediated cervical carcinogenesis in transgenic mice. *PLoS One* 6: e27243, 2011.
- Rodríguez-Sastre M, González-Maya L, Delgado R, Mohar A and García-Carrancá A: Abnormal distribution of E-cadherin and β -catenin in different histologic types of cancer of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 97: 330-336, 2005.
- Shinohara A, Yokoyama Y, Wan X, Takahashi Y, Mori Y, Takami T, Shimokawa K and Tamaya T: Cytoplasmic/nuclear expression without mutation of exon 3 of the beta-catenin gene is frequent in the development of the neoplasm of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 82: 450-455, 2001.
- Pereira-Suárez A, Meraz MA, Lizano M, Estrada-Chávez C, Hernández F, Olivera P, Pérez E, Padilla P, Yaniv M, Thierry F and García-Carrancá A: Frequent alterations of the beta-catenin protein in in cancer of the uterine cervix. *Tumor Biol* 23: 45-53, 2002.
- Nakamura Y, Nishisho I, Kinzler KW, Vogelstein B, Miyoshi Y, Miki Y, Ando H, Horii A and Nagase H: Mutations of the adenomatous polyposis coli gene in familial polyposis coli patients and sporadic colorectal tumors. *Princess Takamatsu Symp* 22: 285-292, 1991.
- Horii A, Nakatsuru S, Miyoshi Y, Ichii S, Nagase H, Kato Y, Yanagisawa A and Nakamura Y: The APC gene, responsible for familial adenomatous polyposis, is mutated in human gastric cancer. *Cancer Res* 152: 3231-3233, 1992.
- Tsuehaya T, Tamura G, Sato K, Endoh Y, Sakata K, Jin Z, Motoyama T, Usuba O, Kimura W, Nishizuka S, *et al.*: Distinct methylation patterns of two APC gene promoters in normal and cancerous gastric epithelia. *Oncogene* 19: 3642-3646, 2000.
- Hosoya K, Yamashita S, Ando T, Nakajima T, Itoh F and Ushijima T: Adenomatous polyposis coli 1A is likely to be methylated as a passenger in human gastric carcinogenesis. *Cancer Lett* 285: 182-189, 2009.
- Javadi A, Shamaei M, Mohammadi Ziazi L, Pourabdollah M, Dorudinia A, Seyedmehdi SM and Karimi S: Qualification study of two genomic DNA extraction methods in different clinical samples. *Tanaffos* 13: 41-47, 2014.
- Miyoshi Y, Ando H, Nagase H, Nishisho I, Horii A, Miki Y, Mori T, Utsunomiya J, Baba S, Petersen G, *et al.*: Germ-line mutations of the APC gene in 53 familial adenomatous polyposis patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 4452-4456, 1992.
- Esteller M, Sparks A, Toyota M, Sanchez-Cespedes M, Capella G, Peinado MA, Gonzalez S, Tarafa G, Sidransky D, Meltzer SJ, *et al.*: Analysis of adenomatous polyposis coli promoter hypermethylation in human cancer. *Cancer Res* 60: 4366-4371, 2000.
- Rowan AJ, Lamlum H, Ilyas M, Wheeler J, Straub J, Papadopoulou A, Bicknell D, Bodmer WF and Tomlinson IP: APC mutations in sporadic colorectal tumors: A mutational 'hotspot' and interdependence of the 'two hits'. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 3352-3357, 2000.
- Minde DP, Anvarian Z, Rüdiger SG and Maurice MM: Messing up disorder: How do missense mutations in the tumor suppressor protein APC lead to cancer? *Mol Cancer* 10: 101, 2011.
- Hiltunen M, Alhonen L, Koistinaho J, Myöhänen S, Paakkönen M, Marin S, Kosma VM and Jänne J: Hypermethylation of the APC (adenomatous polyposis coli) gene promoter region in human colorectal carcinoma. *Int J Cancer* 70: 644-648, 1997.
- Virmani A, Rathi A, Sathyanarayana U, Padar A, Huang C, Cunningham H, Farinas A, Milchgrub S, Euhus D, Gilcrease M, *et al.*: Aberrant methylation of the adenomatous polyposis coli (APC) gene promoter 1A in breast and lung carcinomas. *Clin Cancer Res* 7: 1998-2004, 2001.
- Aguiler O, Muñoz A, Esteller M and Fraga M: Epigenetic alterations of the Wnt/beta-catenin pathway in human disease. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 7: 13-21, 2007.
- Kikuchi A: Tumor formation by genetic mutations in the components of the Wnt signaling pathway. *Cancer Sci* 94: 225-229, 2003.
- Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B and Kinzler KW: Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 275: 1787-1790, 1997.
- Cieply B, Zeng G, Proverbs-Singh T, Geller DA and Monga SP: Unique phenotype of hepatocellular cancers with exon-3 mutations in beta-catenin gene. *Hepatology* 49: 821-31, 2009.
- Roberts DM, Pronobis MI, Poulton JS, Waldmann JD, Stephenson EM, Hanna S and Peifer M: Deconstructing the beta-catenin destruction complex: Mechanistic roles for the tumor suppressor APC in regulating Wnt signaling. *Mol Biol Cell* 22: 1845-1863, 2011.
- Bai A, Tong J, To K, Chan M, Man E, Lo K, Lee J, Sung J and Leung W: Promoter hypermethylation of tumor-related genes in the progression of colorectal neoplasia. *Int J Cancer* 112: 846-853, 2004.
- Fu X, Li J, Li K, Tian X and Zhang Y: Hypermethylation of APC promoter 1A is associated with moderate activation of Wnt signalling pathway in a subset of colorectal serrated adenomas. *Histopathology* 55: 554-563, 2009.
- Kang S, Kim J, Kang G, Lee S, Park N, Song Y, Park S, Kang S and Lee H: Comparison of DNA hypermethylation patterns in different types of uterine cancer: Cervical squamous cell carcinoma, cervical adenocarcinoma and endometrial adenocarcinoma. *Int J Cancer* 118: 2168-2171, 2006.
- Yang N, Nijhuis E, Volders H, Eijnsink J, Lendvai A, Zhang B, Hollema H, Schuurin E, Wisman G and van der Zee A: Gene promoter methylation patterns throughout the process of cervical carcinogenesis. *Cell Oncol* 32: 131-143, 2010.
- Zambrano P, Segura-Pacheco B, Perez-Cardenas E, Cetina L, Revilla-Vazquez A, Taja-Chayeb L, Chavez-Blanco A, Angeles E, Cabrera G, Sandoval K, *et al.*: A phase I study of hydralazine to demethylate and reactivate the expression of tumor suppressor genes. *BMC Cancer* 5: 44, 2005.
- Dong S, Kim H, Rha S and Sidransky D: Promoter hypermethylation of multiple genes in carcinoma of the uterine cervix. *Clin Cancer Res* 7: 982-986, 2001.
- Wisman GB, Nijhuis ER, Hoque MQ, Reesink-Peters N, Koning AJ, Volders HH, Buikema HJ, Boezen HM, Hollema H, Schuurin E, *et al.*: Assessment of gene promoter hypermethylation for detection of cervical neoplasia. *Int J Cancer* 119: 1908-1914, 2006.
- van der Meide WF, Snellenberg S, Meijer CJ, Baalbergen A, Helmerhorst TJ, van der Sluis WB, Snijders PJ and Steenbergen RD: Promoter methylation analysis of WNT/ β -catenin signaling pathway regulators to detect adenocarcinoma or its precursor lesion of the cervix. *Gynecol Oncol* 123: 116-122, 2011.
- Ma C, Zeng C, Jin L, Yang Y, Li P, Chen L and Wang J: GSK3 β mediates the carcinogenic effect of HPV16 in cervical cancer. *Sci Rep* 5: 16555, 2015.
- Cameron EE, Bachman KE, Myöhänen S, Herman JG and Baylin SB: Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat Genet* 21: 103-107, 1999.