

11281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

"ALTERACIONES EN LOS NIVELES Y LOCALIZACION DE β -CATENINA
(VIA WNT/E-CADERINA) EN EL CANCER CERVICO UTERINO"

TESIS PARA OBTENER EL TITULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS

P R E S E N T A :
BIOL. MARIA ALEXANDRA RODRIGUEZ SASTRE

DIRECTOR DE TESIS: DR. ALEJANDRO GARCIA CARRANCA



2005

0352133



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Doctorado en Ciencias Biomédicas

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

pdcB/grad/216Jur/2005.

ING. LEOPOLDO SILVA GUTIERREZ

Director General de la
Administración Escolar
Presente.

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión del Comité Académico del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas que tuvo lugar el 13 de abril de 2005, se acordó designar el siguiente jurado para examen de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Biol. **MARÍA ALEXANDRA RODRÍGUEZ-SASTRE** con no. de cuenta 501459080 con la tesis titulada: "Alteraciones en los niveles y localización de β -catenina (vía Wnt/E-caderina) en el Cáncer Cérvico Uterino", dirigida por el Dr. Alejandro García Carrancá.

Presidente:	Dr. José Patricio Gariglio Vidal
Secretario:	Dr. Alejandro García Carrancá
Vocal:	Dr. Alfonso Dueñas González
Vocal:	Dra. Carmen Aceves Velasco
Vocal:	Dr. Juan Riesgo Escovar
Suplente:	Dr. Vicente Madrid Marina
Suplente:	Dra. Marina Macías Silva

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente

"Por miraza hablará el espíritu"

Cd. Universitaria, D.F., 18 de abril de 2005.

Dr. Edmundo Lamoyi Velázquez
Responsable en el Instituto de
Investigaciones Biomédicas

Dr. J. Javier Espinosa Aguirre
Coordinador del Doctorado
en Ciencias Biomédicas

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM, y en el Departamento de Investigación Básica del Instituto Nacional de Cancerología, SSA., bajo la dirección del Dr. Alejandro García Carrancá.

Se contó con el apoyo de los proyectos de **PAPIT-UNAM IN20921**,
INCAN 01021IBI y
la beca otorgada por la **Dirección General de Estudios de Postgrado (DGEP)** a
María Alexandra Rodríguez Sastre

A mi mamá, por su gran apoyo, cariño y por toda la fortaleza que me
dio cada día.

A mi papá (q.e.p.d), por su amor y cariño.

A mis hermanos Enrique, Ricardo y Juan Carlos.

A mis amores Lina, Dany, Lau y Angelita.

A Edgar

Agradecimientos

Al Dr. Alejandro García Carrancá, por aceptarme en su laboratorio, por confiar en mí y por todo su apoyo.

A los Drs. Fabio Salamanca Gómez y Emilio Rojas del Castillo quienes formaron parte de mi comité tutorial.

A los Drs. Patricio Gariglio Vidal, Alfonso Dueñas González, Carmen Aceves Velasco, Juan Riesgo Escovar, Vicente Madrid Marina y Marina Macías Silva por sus sugerencias.

A la Dra. Marcela Lizano Soberón, por que su gran ayuda.

A la Dra. Leticia González Maya (Le) por las ideas, la ayuda y el tiempo que me dedico, de verdad gracias.

A **todos** mis compañeros de laboratorio, en especial a Miriam, Paty, Karina, Hilda, Raquel, Lupita, Esther y Valerio.

A mi amiga Gis, por estar siempre ahí. A mis amigos del INCan Adriana, Erick, Magali, Floria, Chela.

A todo el personal de Biomédicas, con el que compartí una sonrisa y a todos aquellos que me brindaron su valiosa ayuda y amistad.

A mis amigas del Doctorado, Zenaida, Angélica, Vero y Silvia, por que me ayudaron y disfrutaron con cada locura mía.

Al los Drs. Guillermo Alfaro y Ricardo Delgado, por compartir su conocimiento conmigo.

Finalmente quiero agradecer a la **DGEP** por la beca que me otorgó durante mi estudio y a la **UNAM** por darme la oportunidad de ser un miembro más de esta gran institución.

INDICE GENERAL

INDICE GENERAL	I
INDICE DE FIGURAS Y TABLAS	IV
LISTADO DE ABREVIATURAS	VI
RESUMEN	VII
ABSTRACT	IX
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. El Cáncer Cérvico Uterino (CaCU)	1
1.1.1. El Virus del Papiloma Humano (VPH)	2
1.2. Las Uniones Adherentes	5
1.2.1. Organización del complejo caderina/catenina y su unión al citoesqueleto de actina	7
1.2.2. Alteración de la función de E-caderina	12
1.3. La vía de señalización Wnt	16
1.3.1. β -catenina como factor de transcripción	19
1.4. Alteraciones del complejo E-caderina/ β -catenina en el cáncer (CaCU)	22
2. JUSTIFICACIÓN	25
3. HIPÓTESIS	26
4. OBJETIVOS	26
4.1 Objetivo General	26
4.2 Objetivos Específicos	26
5. METODOLOGÍA	27
5.1. Población de estudio	27

5.2. Líneas celulares	27
5.3. Extracción y análisis de proteínas	28
5.3.1. Análisis por Western Blot (WB)	28
5.3.2. Inmunoprecipitación	29
5.3.3. Inmunohistoquímica	29
5.4. Extracción de ADN y tipificación del VPH	30
5.5. Análisis mutacional del gen CTNNB1	31
5.6. Actividad transcripcional del gen de β -catenina	32
5.7. Análisis estadístico	33
6. RESULTADOS	34
6.1. Análisis de la localización y expresión de las proteínas β -catenina y E-caderina en líneas celulares derivadas de cáncer de cuello uterino	34
6.1.1. Localización de las proteínas β -catenina y E-caderina en líneas celulares	34
6.1.2. Detección de las proteínas β -catenina y E-caderina en líneas celulares	34
6.2. Análisis de la localización y presencia de las proteínas β -catenina y E-caderina en tejido normal de cérvix, lesiones premalignas y tumores de cuello uterino	37
6.2.1. Características ginecológicas de las pacientes cuyas muestras se analizaron en este trabajo	37
6.2.2. Localización de las proteínas β -catenina y la E-caderina	38
6.2.3. Detección de las proteínas β -catenina y E-caderina	39
6.3. Análisis del complejo E-caderina/ β -catenina en las líneas celulares Caski y HaCat y en biopsias de CaCU	41
6.4. Análisis mutacional del exón 3 del gen CTNNB1 por SSCP y secuencia	41

6.5. Actividad transcripcional del gen de β -catenina en líneas celulares derivadas de tumores de cuello uterino (Tesis de Licenciatura Luis H. Mojica, 2004)	44
6.6. Localización de genes blanco del complejo β -catenina/Tcf/Lef en líneas celulares derivadas de tumores y en lesiones premalignas y tumores de cuello uterino	44
6.6.1. Localización celular de las proteínas ciclina D1, fra-1, c-jun y c-myc en líneas celulares	44
6.6.2. Localización celular de la proteína ciclina D1 en tejido normal, lesiones premalignas y cáncer invasor	48
6.6.3. Localización celular de la proteína fra-1 en tejido de cérvix normal, lesiones premalignas y cáncer invasor	52
6.6.4. Localización celular de la proteína c-jun en tejido de cérvix normal, lesiones premalignas y cáncer invasor	55
6.6.5. Localización celular de la proteína c-myc en tejido de cérvix normal, lesiones premalignas y cáncer invasor	57
6.7. Análisis de la localización de las proteínas ciclina E, A y B1 en líneas celulares, tejido de cérvix normal, lesiones premalignas y tumores de cuello uterino	59
6.7.1 Localización celular de las proteínas ciclina E, A y B1 en líneas celulares.....	59
6.7.2. Localización celular de las proteínas ciclina E y A en tejido de cérvix normal, lesiones premalignas y tumores de cuello uterino	62
7. DISCUSIÓN	68
8. CONCLUSIONES	77
9. REFERENCIAS	78
10. RESUMEN DE ARTICULOS POR PUBLICAR	101

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figuras

Figura 1. Estructura y organización de los Papilomavirus humanos	3
Figura 2. Localización general de los distintos tipos de uniones celulares	6
Figura 3. Estructura general de las caderinas	9
Figura 4. Estructura de la proteína β -catenina	11
Figura 5. El papel de β -catenina en su interacción con la E-caderina y en la vía de señalización Wnt	18
Figura 6. Localización de las proteínas β -catenina y E-caderina en líneas celulares	35
Figura 7. Detección de las proteínas β -catenina y E-caderina en líneas celulares y del complejo caderina/catenina en las líneas celulares Caski y HaCat	36
Figura 8. Detección de β -catenina y E-caderina en tejido normal de cérvix y tumores de cuello uterino	40
Figura 9. Análisis del complejo de E-caderina/ β -catenina por Western Blot en biopsias de CaCU	42
Figura 10. Análisis mutacional del exón 3 del gen CTNNB1 y secuencia en tumores de cuello uterino	43
Figura 11. Análisis transcripcional de β -catenina en líneas celulares	45
Figura 12. Localización de la proteína ciclina D1 en líneas celulares	46
Figura 13. Localización de la proteína fra-1 en líneas celulares	48
Figura 14. Localización de la proteína c-jun en líneas celulares	49
Figura 15. Localización de la proteína c-myc en líneas celulares	50

Figura 16. Localización de la proteína ciclina D1 por IHQ, en tejido de cérvix normal y en muestras de CaCU	51
Figura 17. Localización de la proteína fra-1 por IHQ, en tejido de cérvix normal y en muestras de CaCU	54
Figura 18. Localización de la proteína c-jun por IHQ, en tejido de cérvix normal y en muestras de CaCU	56
Figura 19. Localización de la proteína c-myc por IHQ, en tejido de cérvix normal y en muestras de CaCU	58
Figura 20. Localización de la proteína ciclina E en líneas celulares	60
Figura 21. Localización de la proteína ciclina A en líneas celulares	61
Figura 22. Localización de la proteína ciclina B1 en líneas celulares	63
Figura 23. Localización de la proteína ciclina E por IHQ en tejido de cérvix normal y en muestras de CaCU	65
Figura 24. Localización de la proteína ciclina A por IHQ en tejido de cérvix normal y en muestras de CaCU	66

Tablas

Tabla 1. Distribución de la localización de las proteínas ciclina D1, fra-1, c-jun y c-myc en muestras de CaCU	53
Tabla 2. Distribución de la localización de las proteínas ciclina E y A en muestras de CaCU	64

LISTADO DE ABREVIATURAS

CaCU	Cáncer Cérvico Uterino
VPH	Virus del Papiloma Humano
NIC I, II y III	Neoplasia Intraepitelial Cervical I, II, III
UAs	Uniones Adherentes
CDH1	Gen que codifica para la proteína E-caderina
CTNNB1	Gen que codifica para la proteína β -catenina
CTNNG1	Gen que codifica para la proteína γ -catenina
CTNND1	Gen que codifica para la proteína p120 ^{CTN}
CTNNA1	Gen que codifica para la proteína α -catenina
Wnt	Vía de señalización Wingless
GSK3 β	Proteína cinasa de serina/treonina 3 beta
CKI y II	Cinasa de Caseína tipo I y II
“arm”	Repetidos de la proteína Armadillo
APC	Gen supresor de tumor <i>adenomatous polyposis coli</i>
Tcf/Lef	Factores de transcripción de la familia, T-cell factor/lymphocyte enhancer factor
pRb	Proteína de Retinoblastoma
Src	Oncoproteína con actividad cinasa
EGFR	Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal
Her-2	Proteína perteneciente a la superfamilia de receptores de tirosina cinasas. También conocida como c-Erb-2.
Fz	Receptor transmembranal Frizzled
LRP	Lipoproteínas de Baja densidad
Dkk-1 y 2	Miembros de la familia Dickkopf
Dsh	Proteína citoplasmática Disheveled
HMG	Grupo de proteínas que pertenecen a esta familia (High Mobility Group)

RESUMEN

El Cáncer Cérvico Uterino (CaCU) es la principal causa de muerte en mujeres con cáncer en países en desarrollo. A pesar de que las infecciones persistentes con el Virus del Papiloma Humano (VPH), principalmente los tipos de “alto” grado, son necesarias para que se desarrolle este cáncer, otras alteraciones celulares que son necesarias para su desarrollo, no se conocen aún. Las Uniones Adherentes (UAs), incluyen a miembros de las caderinas y cateninas. La β -catenina es una proteína de adhesión celular que interacciona con el dominio citoplasmático de la E-caderina y juega un papel clave en el desarrollo del cáncer. La β -catenina es además conocida por su papel como molécula de transducción de señales, ya que actúa como factor de transcripción en la vía Wnt. En muchas neoplasias, se han encontrado niveles aumentados de β -catenina asociados con su localización citoplasmática y/o nuclear. Por otro lado, la distribución anormal de E-caderina ha sido asociada con un alto potencial metastásico. En este trabajo se analizó la distribución celular de las proteínas E-caderina y β -catenina por inmunohistoquímica, en 126 muestras de cáncer de cuello uterino (68 carcinomas epidermoides, 31 adenoescamosos y 27 adenocarcinomas), 43 lesiones premalignas y 20 muestras de tejido normal. De la misma forma, se comparó la deslocalización de β -catenina con la de proteínas codificadas por genes blanco de la vía Wnt (ciclina D1, fra-1, c-jun y c-myc). Los resultados obtenidos mostraron que E-caderina y β -catenina se encuentran distribuidas anormalmente en el citoplasma en un 60% de las lesiones premalignas y en más del 70% de las muestras de cáncer invasor. En pocas muestras de CaCU se observó localización nuclear de β -catenina, aunque en líneas celulares sí se observó una leve actividad transcripcional de β -catenina. También, la localización de proteínas codificadas por genes blanco se observó alterada, principalmente

en las proteínas ciclina D1 y fra-1. No se observó una correlación entre la localización alterada de β -catenina y proteínas que codifican sus “genes blanco”, ni tampoco con la presencia de VPH. Finalmente, estos hallazgos indican que las alteraciones tanto de β -catenina como de E-caderina, son frecuentes en tumores de cuello uterino de diferente tipo histológico, sugiriendo que estas proteínas juegan un papel importante en el desarrollo de esta neoplasia.

Palabras claves: Cáncer Cérvico Uterino, β -catenina, E-caderina, carcinoma epidermoide, adenoescamoso, adenocarcinoma.

ABSTRACT

Uterine cervix cancer is a major cause of death among women with cancer in developing countries. Although persistent infections with “high” risk human papillomavirus are necessary, other cellular alterations needed are still largely unknown. Adherent Junctions (AJ’s) are key components in cellular adhesion, being cadherin and catenin molecules central players. β -catenin is a cell-cell adhesion protein that binds the cytoplasmic domain of E-cadherin, the epithelial component of AJ’s, and whose alterations play a role in cancer development and metastasis. β -catenin is also well known for its role as a signal transduction molecule, functioning as transcription factor for the Wnt signaling pathway. In many malignancies, increased levels of β -catenin have been found associated with its nuclear and/or cytoplasmic accumulation. On the other side, abnormal distribution of E-cadherin has been associated with higher metastatic potential. In this study we analyzed the cellular distribution of β -catenin and E-cadherin proteins by immunostaining samples from 126 cancers of the uterine cervix of different histologic type, 43 premalignant lesions, and 20 normal tissues. Also, we compare abnormal localization of β -catenin with other proteins encoded by target genes of the Wnt pathway (cyclin D1, fra-1, c-jun and c-myc). β -catenin and E-cadherin were found distributed abnormally in the cytoplasm of 60% of premalignant lesions and more than 70% of invasive cancers (68 squamous carcinomas, 31 adenosquamous carcinomas and 27 adenocarcinomas), in contrast to an apparent reduction in both proteins in 40% of premalignant lesions. Nuclear staining of β -catenin was rarely seen in any case, and a low transcription activity of β -catenin/Tcf/Lef complex was observed in cell lines. The localization of proteins cyclin D1 and fra-1 was observed altered, mainly in the cytoplasm. We does not observed a correlation between altered

localization of β -catenin and proteins encoded by target genes, nor with the presence of HPV. Our findings indicate that alterations of both β -catenin and E-cadherin are frequent in tumors of the uterine cervix of different histologic type, suggesting they may play an important role in their development.

Key words: cervical cancer, β -catenin, E-cadherin, squamous carcinoma, adenosquamous carcinoma adenocarcinoma.

1. INTRODUCCIÓN

El crecimiento y diferenciación de las células de organismos multicelulares están controlados por la acción concertada de un conjunto de genes cuyas alteraciones resultan en procesos patológicos como el cáncer. El cáncer es una enfermedad genética y como tal, el foco de atención para la investigación en cáncer ha sido dirigido a entender como muchos de los oncogenes y genes supresores de tumores están desregulados en muchas neoplasias humanas.

1.1. El Cáncer Cérvico Uterino (CaCU)

Se conoce que al año aproximadamente 250,000 mujeres en el mundo mueren por Cáncer Cérvico Uterino (CaCU), ocupando éste el segundo lugar de muerte por cáncer en mujeres. Cerca del 80% de los 500,000 casos nuevos de CaCU reportados cada año se dan en países en desarrollo, haciendo de esta enfermedad la principal causa de muerte de mujeres en países en desarrollo [1]. En México, representa la primera causa de muerte en mujeres entre los 25 y 64 años de edad. Se ha estimado que ocurren 4,300 muertes anuales por esta neoplasia [2] y se detectan 16,000 nuevos casos cada año [3].

La principal causa del CaCU en mujeres ha sido atribuida a las infecciones por el virus del papiloma humano (VPH). Estudios epidemiológicos han mostrado que el 0.1 - 0.01% de las mujeres que se han infectado con el VPH desarrollan cáncer, encontrado el ADN viral en el 99% de las lesiones precursoras y en el cáncer de cérvix, donde la infección viral es necesaria pero no suficiente para la inducción del tumor por lo cual la progresión del CaCU es considerada un proceso multifactorial [4]. La infección por el VPH ha sido asociada

además a otro tipo de neoplasias como de canal anal, de vulva, de vagina, de pene y de cabeza y cuello [5].

1.1.1. El Virus del Papiloma Humano (VPH)

Los papilomavirus son miembros de la familia *Papillomaviridae*, la cual ha sido recientemente reconocida [6]. El virus contiene un ADN circular de doble cadena que infecta preferentemente células epiteliales [7], y está dividido funcionalmente en tres regiones: i. La región larga de control (LCR) que posee las secuencias estimuladoras y represoras de la transcripción viral, así como el origen de replicación, ii. La región temprana que incluye los genes de las proteínas E1, E2, E4, E5, E6, y E7 involucradas en la replicación viral y la oncogenesis, y iii. La región tardía, que codifica para las proteínas estructurales de la cápside viral L1 y L2 (Figura 1).

Los VPHs comprenden un grupo heterogéneo de más de 100 tipos diferentes, de los cuales 40 tipos infectan la mucosa genital. Estos se clasifican en VPHs de alto y bajo riesgo, según su prevalencia en el cáncer invasor. Los de “bajo riesgo” como el VPH 6 y VPH 11, inducen verrugas genitales benignas y está raramente asociado con la neoplasia [8]. Por otro lado, cerca de 18 tipos de VPH son altamente carcinogénicos (“alto riesgo”). Estudios epidemiológicos del VPH en CaCU han mostrado que en la mayoría de los casos de cáncer invasor (65%), existe la presencia de los tipos 16 y 18. Y en el restante 18% de los casos se han asociado con los tipos de VPH 31, 33, 35, 45, 52 y 58 [9].

Estudios clínicos, patológicos y virales han definido los eventos que se dan durante la progresión del CaCU. La patogénesis del CaCU es iniciada por la infección del epitelio del

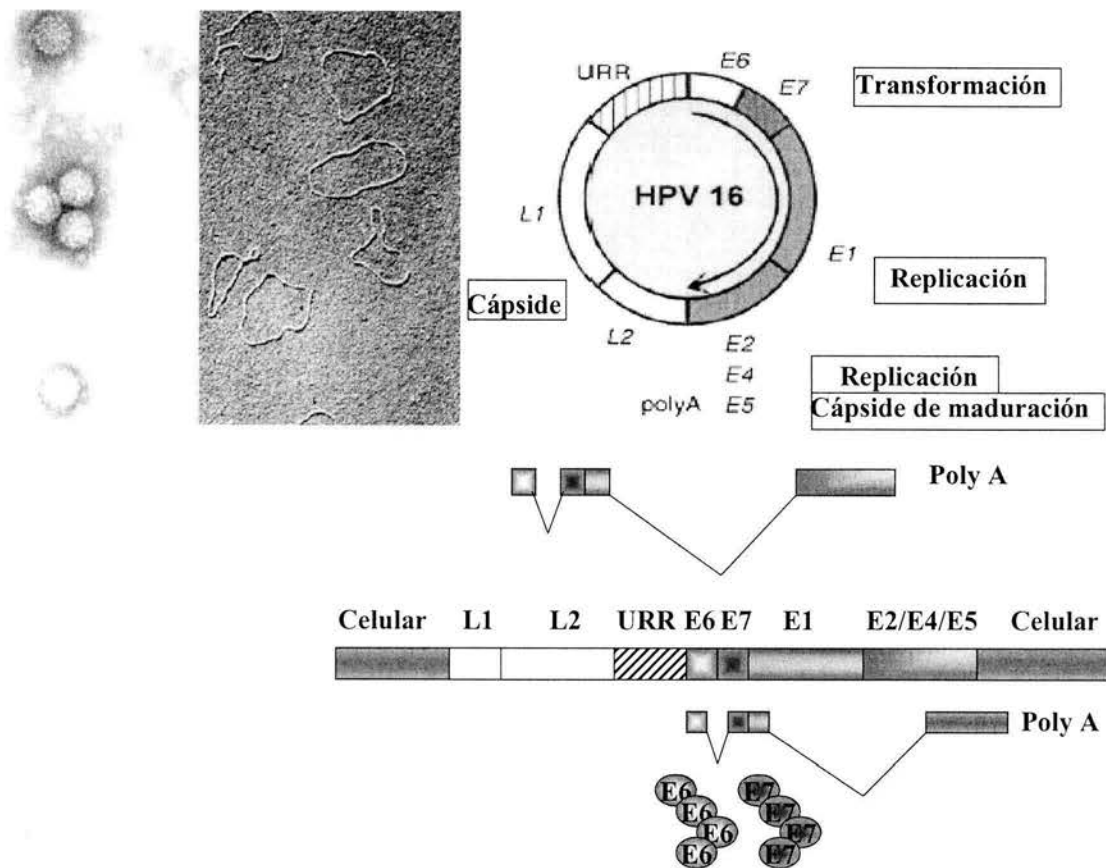


Figura 1. Estructura y organización de los Papillomavirus humanos. Los VPHs son partículas virales pequeñas con un genoma de ADN circular que codifica para varios genes denominados tempranos (E) y tardíos (L). En CaCU, el genoma viral está frecuentemente integrado dentro del genoma de la célula huésped. Los genes E6 y E7 del VPH codifican para proteínas multifuncionales que se unen a p53 y pRb, respectivamente. Esta unión altera el ciclo celular permitiendo la transformación celular. Tomado de Eur J Cancer 2002;38:2229-2242.

cérvix por el VPH durante la relación sexual. La mayoría de las infecciones por el VPH son transitorias [10]. Sin embargo, una fracción de las infecciones persiste e inducen eventos que desembocan en el proceso de transformación del epitelio del cérvix. Los cambios en el epitelio se han definido como eventos iniciales, y se han clasificado patológicamente como lesiones de bajo grado (Neoplasia Intraepitelial Cervical 1, NIC 1), asociadas con la replicación viral; y lesiones de alto grado (NIC 2 y 3). La progresión de una lesión de alto grado a cáncer invasor tiene una alta frecuencia. En la mayoría de casos, la progresión está asociada con la conversión del genoma viral de una forma episomal a una forma integrada (deleción o inactivación de E2, un regulador negativo de la expresión de E6 y E7).

El desarrollo del cáncer invasor requiere eventos genéticos adicionales facilitados por las oncoproteínas virales E6 y E7 que interactúan e inactivan proteínas involucradas en el control del ciclo celular (p53 y pRb), en la apoptosis y en la integridad del genoma [7].

Además del VPH otros factores están involucrados en la etiología del CaCU, tales como factores ambientales, multiparidad [11], tabaquismo [12], y anticonceptivos hormonales [13], entre otros.

Los factores del medio que regulan el comportamiento celular tienen en general, receptores en la membrana, así como un conjunto de moléculas efectoras que median su acción dentro de las células. Así las interacciones célula-célula participan también de manera importante en la regulación de la proliferación y diferenciación celular. La adhesión celular es crucial para el ensamblaje de células individuales dentro de los tejidos animales. Existe una variedad de mecanismos de adhesión celular que son responsables del ensamblaje de las

células y de las conexiones al citoesqueleto y que determinan así la arquitectura del tejido. Por consiguiente, los sistemas de adhesión celular son efectores de la información genética básica en el complejo de patrones de células en los tejidos.

Una de las principales metas de la investigación en cáncer es identificar las vías cruciales involucradas en la regulación del crecimiento de células normales y entender como las células malignas escapan a estos mecanismos de control. En los últimos años, una vía de transducción que involucra a la β -catenina ha emergido como un componente importante en un número de neoplasias humanas.

1.2. Las Uniones Adherentes

En los mamíferos, la adhesión entre las células epiteliales está generalmente mediada por tres tipos de uniones: los desmosomas, las uniones estrechas (en inglés tight junctions) y las uniones adherentes (UAs) (adherens junctions). Estos tipos de uniones constituyen complejos de unión intercelular (Figura 2). Estos complejos contienen receptores transmembranales, generalmente glicoproteínas que median la unión a la superficie extracelular y determinan la especificidad de la respuesta intracelular. Las proteínas citoplasmáticas asociadas a estos receptores se unen estructuralmente al citoesqueleto, estableciendo líneas de comunicación molecular con otras uniones célula-célula.

Los desmosomas son uniones adhesivas intercelulares que actúan como puntos de anclaje para la red de filamentos intermedios. La adhesión desmosomal es un proceso dependiente de calcio mediado por dos familias de caderinas, la desmogleina y la desmocolina, las

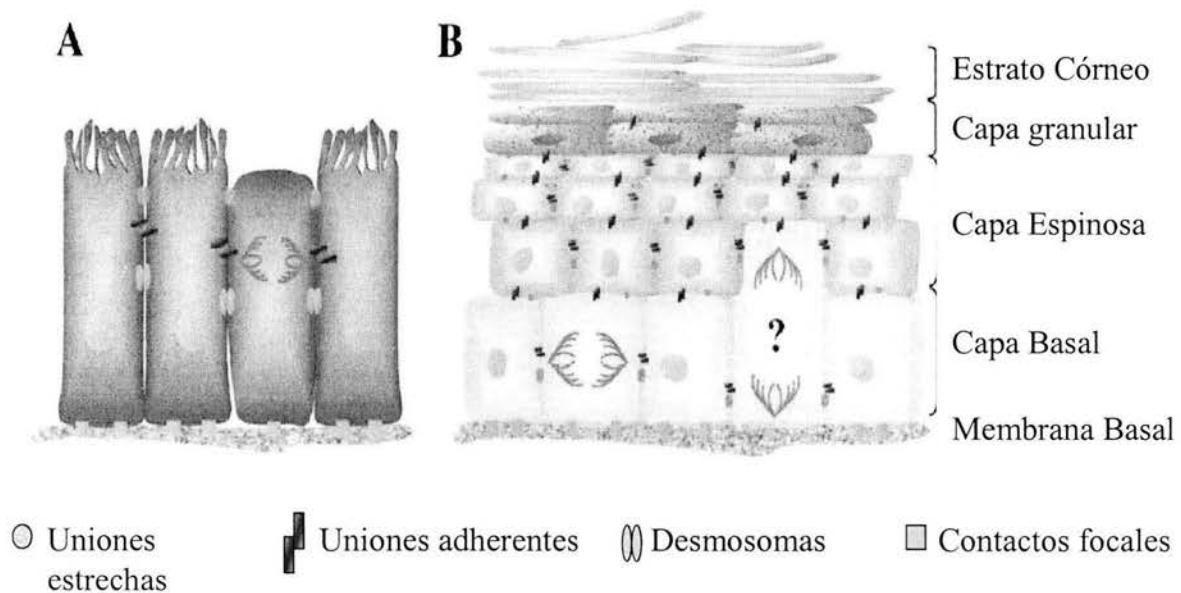


Figura 2. Localización general de los distintos tipos de uniones celulares. (A). El epitelio simple estratificado comprende una capa de células unidas a la membrana basal por contactos focales (cuadrados) y a las células adyacentes vía uniones adherentes (rectángulos) y desmosomas (óvalos). Las uniones estrechas (círculos) contribuyen al mantenimiento de la polaridad apical-basolateral. (B). En el epitelio estratificado, observamos como se distribuyen las uniones adherentes (rectángulos) y desmosomas (óvalos) los cuales unen a las células entre sí, y las integrinas en los contactos focales (cuadrados) unen a las células a la capa basal de la membrana basal. Las uniones estrechas (círculos) aparecen entre las capas espinosa y glandular. Tomado de Cell 2003;112:535-548.

cuales se unen directamente a la placoglobina (γ -catenina) y desmoplaquina, y a su vez a los filamentos intermedios del citoesqueleto [14]. Así mismo, **las uniones estrechas** actúan como una compuerta, que se encarga de regular el paso de iones, agua y moléculas a través de la vía paracelular; y como una valla, que mantiene la polaridad celular, ya que bloquea la difusión libre de proteínas y lípidos entre los dominios apical y basolateral de la membrana plasmática de las células epiteliales. A las uniones estrechas pertenecen las claudinas, las cuales son independientes de calcio, y las ocludinas. Estas dos proteínas se unen al citoesqueleto de actina a través de proteínas de membrana periféricas ZO-1, 2 y 3 (*zonula occludens*), y pertenecen a la familia de proteínas MAGUK (Membrane Associated Guanylate Kinase homologues) [15]. Finalmente, **las uniones adherentes** son estructuras de adhesión dependientes de caderinas que se unen intrínsecamente a la red de microfilamentos de actina. Las UAs fueron originalmente identificadas por análisis ultraestructural, que reveló placas electrodensas yuxtapuestas en la membrana de las células epiteliales. Recientemente, se ha evidenciado que las uniones adherentes no solamente coordinan la organización celular y los movimientos dentro del epitelio sino que además transmiten información del medio ambiente al interior de las células. Así, las UAs forman una red de proteínas que juegan un papel importante en las neoplasias humanas.

1.2.1. Organización del complejo caderina/catenina y su unión al citoesqueleto de actina

El eje central de las UAs está compuesto por las caderinas, las cuales se agrupan en los sitios de contacto célula-célula en la mayoría de los tejidos sólidos. **La E-caderina**, es el prototipo y la proteína mejor caracterizada de esta familia. Está expresada principalmente

en el epitelio. La E-caderina, pertenece a una familia de glicoproteínas dependientes de calcio [16], que participan en el desarrollo embrionario, en la polaridad celular, y en la morfología del tejido, y además en condiciones patológicas como el cáncer [17]. La familia de las caderinas está dividida en subfamilias basadas en sus características moleculares; este grupo está compuesto por las caderinas tipo I, las caderinas tipo II, las caderinas desmosomales, las portocaderinas y las caderinas flamingo o transmembranales de 7 dominios [18].

Las caderinas están compuestas por un dominio extracelular que contiene los sitios de unión a Ca^{+2} representados por cinco segmentos dominios extracelulares (EC1-5). Se sabe que el segmento repetido EC1 es esencial para que se den las interacciones homotípicas en las caderinas de tipo I y II. Seguido de estos segmentos extracelulares encontramos la región transmembranal donde las caderinas se unen a la membrana celular. Finalmente, se encuentra la región citoplasmática, que está altamente conservada en estas proteínas y además posee los sitios de unión a las proteínas β -catenina o γ -catenina (Figura 3) [19]. La β -catenina se une al dominio citoplasmático de la E-caderina a través de 12 segmentos dominios "arm" (compuestos por 42 aminoácidos). Esta unión es requerida además para el transporte de la nueva E-caderina sintetizada hacia la membrana plasmática [20]. La afinidad de la interacción entre la β -catenina y la E-caderina está incrementada por la fosforilación de varios residuos de serina en el extremo carboxilo terminal de la caderina, y se ve reducida por la fosforilación de residuos de tirosina (Y654) en la β -catenina [19].

Caderinas

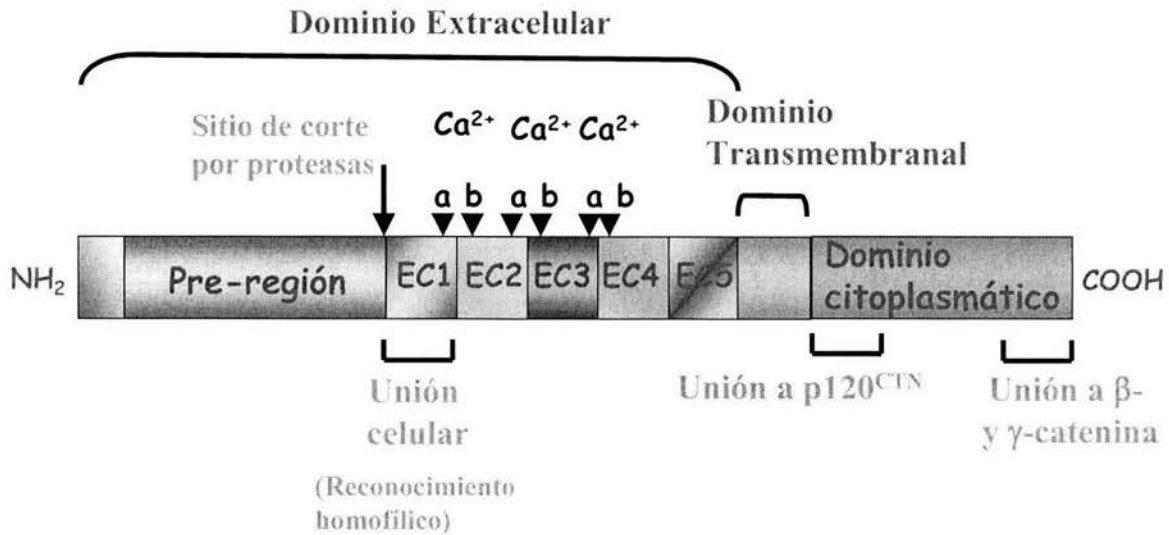


Figura 3. Estructura general de las caderinas. El dominio extracelular está compuesto por cinco unidades repetidas (EC) con cerca de 110 aminoácidos, los cuales son los sitios de unión a Ca²⁺; la unión celular está localizada hacia el EC más amino terminal. Después encontramos la región transmembranal y finalmente, el dominio citoplasmático. Este último está altamente conservado y es el que interactúa con las cateninas (β-ó γ-catenina), uniendo a las caderinas con el citoesqueleto de actina por el extremo carboxilo terminal. Por el extremo yuxtamembranal se une la catenina p120^{CTN}.

Durante el desarrollo embrionario, la E-caderina se expresa en el estadio de mórula; es por eso que también se le conoce como uvomorulina [21]. La expresión de la E-caderina se ha observado predominantemente en el epitelio, pero también se ha observado en la médula ósea (en los precursores de eritrocitos, en las células madre CD34+ y en las células del estroma) [22]. La proteína tiene un peso molecular de 120 KDa y el gen que la codifica CDH1, se localiza en el cromosoma 16q22.1 y consta de 16 exones espaciados en 100 Kb [23]. Se ha establecido que la E-caderina funciona como un gen supresor de tumores [24].

La proteína β -catenina tiene un peso de 92 KDa y es miembro de la superfamilia “armadillo”, un grupo de proteínas con un dominio central común, denominado motivo “arm” [25]. Estructuralmente los dominios “arm” están conformados por tres α -hélices, las cuales le dan una conformación helicoidal (Figura 4) [26]. El gen que codifica para β -catenina es CTNNB1, y se encuentra localizado en el cromosoma 3p21, región del genoma humano que está frecuentemente alterada en una diversidad de patologías. Este gen está compuesto por 16 exones espaciados en 23.2 Kb [27]. La región promotora de β -catenina es rica en GC-y contiene una caja TATA [28].

La proteína γ -catenina o placoglobina, tiene una gran similitud en la secuencia de aminoácidos con la β -catenina y el motivo regulatorio en el amino terminal está conservado entre las dos proteínas. Además, ambas proteínas se unen a APC (*adenomatous polyposis coli*), α -catenina, E-caderina y Tcf/Lef (Factor de transcripción) [29, 30]. El gen que codifica a γ -catenina es CTNNG1, y se encuentra localizado en el cromosoma 11p11, y codifica para una proteína de 82 KDa.

β -catenina

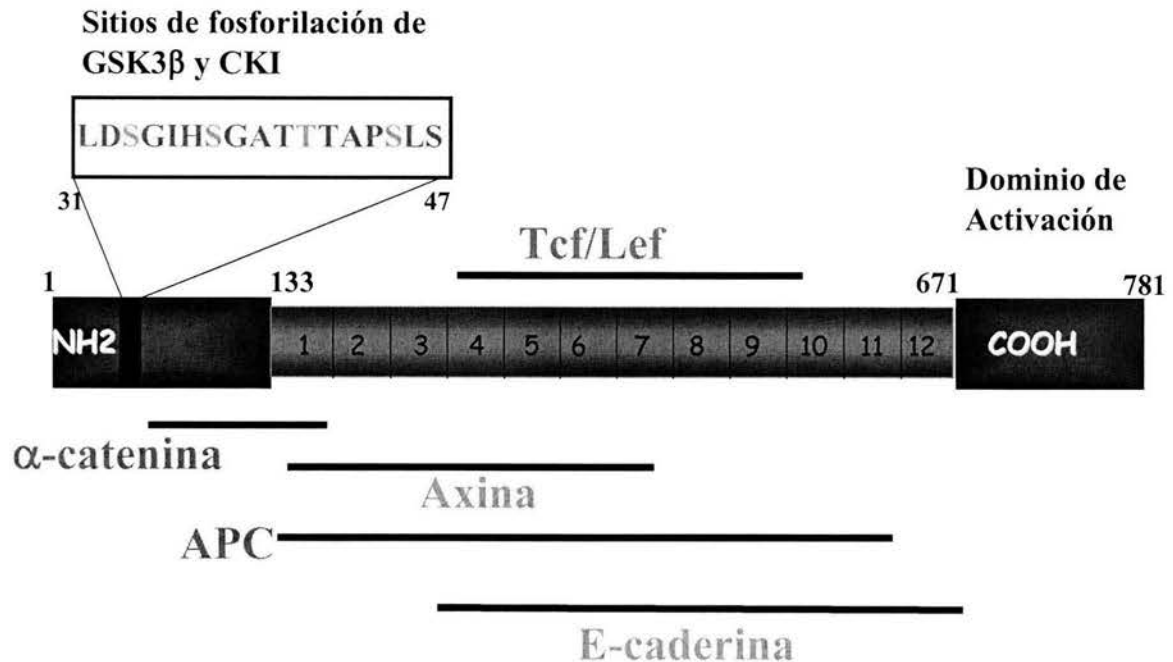


Figura 4. Estructura de la proteína β -catenina. En la región amino terminal, se encuentran los sitios de fosforilación por las cinasas GSK3 β y CKI, importantes para la estabilización de la proteína, seguido del sitio de unión a la proteína α -catenina. En la región central se encuentran 12 dominios “arm” (1-12), a los cuales se unen las proteínas E-caderina, APC, Axina, y Tcf/Lef. En el COOH terminal está el sitio de transactivación.

La catenina p120 (p120^{CTN}), es un miembro de la familia de dominios “arm”, codificada por el gen CTNND1 que se encuentra localizado en el cromosoma 11q11 [31]. Originalmente esta proteína se identificó como sustrato de la proteína Src y posteriormente se demostró que interactuaba con el dominio yuxtamembranal de las caderinas, uniéndose al dominio citoplasmático de las caderinas tipo I y II, pero su unión a la E-caderina es independiente de la β -catenina [32].

La α -catenina es la proteína encargada del ensamblaje de un número de proteínas que unen el complejo E-caderina/ β -catenina a la F-actina. La α -catenina interactúa con el citoesqueleto de actina directamente a través de las interacciones con los filamentos de actina o indirectamente a través de la unión con proteínas de unión a actina, como α -actinina, vinculina y ZO-1 [33]. El gen que codifica para la α -catenina es CTNNA1, y se encuentra localizado en el cromosoma 5q21-22, y codifica para una proteína de 102 KDa.

1.2.2. Alteración de la función de E-caderina

¿Por qué la interacción entre la E-caderina y las cateninas se desarticula? Algunos estudios han descrito cuales podrían ser los mecanismos por los cuales el complejo E-caderina/ β -catenina no se asocia; y estos incluyen las alteraciones genéticas sobre el gen CDH1 o modificaciones en la región promotora del mismo, además de regulaciones post-traduccionales.

Varios estudios realizados en el gen CDH1, mostraron que éste puede sufrir mutaciones de diferentes tipos, como mutaciones en las secuencias de reconocimiento para la maduración

y procesamiento del ARNm, además de mutaciones que alteran el marco de lectura, generando proteínas truncadas. Estas mutaciones se dan frecuentemente en combinación con la pérdida de heterocigocidad con el alelo silvestre [34]. A pesar del número de mutaciones que han sido reportadas para el gen de E-caderina, la mayoría de los carcinomas aparentemente carecen de estas mutaciones. No obstante, estudios por inmunohistoquímica mostraron que la pérdida de la E-caderina es común en muchos tumores y se ha pensado que las células tumorales pueden regular negativamente la actividad de la E-caderina y así invadir el tejido adyacente [35].

En los mamíferos, la metilación es un evento de la modulación de la transcripción. El mecanismo de regulación negativa se da en varios genes supresores de tumor tales como tumor APC, VHL (gen del síndrome von Hippel-Lindau), Rb (gen de Retinoblastoma) y CDH1 [36]. La hipermetilación de islas CpG, es un mecanismo de silenciamiento de genes en células normales, que puede ocurrir durante el proceso de tumorigénesis, y se ha demostrado que el promotor de E-caderina se encuentra hipermetilado en muchos carcinomas humanos, incluyendo mama, próstata, vejiga, colon, cáncer oral y cérvico uterino [37, 38]. Por ejemplo en el cáncer gástrico de tipo difuso hereditario, teniendo una mutación en un alelo de CDH1, la hipermetilación es el segundo paso en la eliminación de la expresión de E-caderina [39].

Durante la transición del epitelio a mesénquima en la progresión tumoral, la expresión de E-caderina se encuentra disminuida y se ha hipotetizado que los represores transcripcionales que controlan la expresión de E-caderina en el desarrollo pueden regular la expresión de E-caderina durante la tumorigénesis [24]. Tales represores incluyen a

“snail”, “slug”, SIP1 y E2A. Batlle *et al* en el 2000, demostró que “snail” se une a tres cajas-E en el promotor de la E-caderina humana reprimiendo su transcripción [40].

La estructura y función del complejo E-caderina/catenina es sensible a las modificaciones postraduccionales. La E-caderina tiene residuos de serinas y treoninas en el dominio de unión a β -catenina, que son sustrato para la fosforilación por la CKI y II (Cinasa de Caseína tipo I y II), y por la GSK3 β . Lickert *et al* en el 2000, mostró que la fosforilación de estos sitios sirve para aumentar la afinidad de la E-caderina por la β -catenina y esto determina la solidez de las interacciones célula-célula [41]. Por otro lado, estudios *in vitro* sugieren que la fosforilación en los residuos de serina/treonina de β -catenina, puede además aumentar su afinidad por la α -catenina, y esto puede modificar la adhesión celular por la modulación de la asociación del complejo caderina/catenina con el citoesqueleto [42]. Hace algún tiempo se reconoció que las células epiteliales transformadas con Src (oncoproteína con actividad de cinasa) mostraban una disminución en la adhesión celular. Roura *et al* en 1999, utilizó la proteína Src recombinante para fosforilar el residuo de tirosina Y654 en la β -catenina, reduciendo así la afinidad de unión de β -catenina por el dominio citoplasmático de E-caderina [43].

Las cateninas β -, γ - y p120^{CTN}, tienen dominios armadillo (arm), los cuales han sido catalogados como buenos sustratos para cinasas de tirosinas [44]. La fosforilación de la β -catenina en residuos de tirosinas por Src [45], EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) [46], c-Met [47] y posiblemente otras cinasas, interfieren con la formación del complejo E-caderina/catenina. Los mecanismos sugeridos incluyen alteraciones en la unión del

complejo caderina/ β -catenina a la actina; interferencia en la función de señalización del complejo a través de cambios conformacionales de las proteínas por un incremento en la carga negativa que interfiere con la unión de otras proteínas; y reclutamiento de nuevas proteínas que poseen dominios de unión a fosfotirosinas específicas. Se ha sugerido que algunas moléculas, como c-Erb-2 (también conocida como HER-2), modulan la estabilidad del complejo E-caderina/catenina por diferentes mecanismos como la fosforilación de β -catenina en residuos de tirosinas [48] y la represión del gen CDH1 de E-caderina [49]. El sitio de unión de β -catenina a la E-caderina contiene una secuencia denominada PEST (Pro-Glu-Ser-Thr), la cual se ha sugerido como indicadora de la degradación por la vía de ubiquitinación; por consiguiente si se forma el complejo se previene que la β -catenina se degrade [50]. Además, la expresión de grandes proteoglicanos, tales como la episialina (MUC-1), pueden impedir estéricamente las interacciones caderina-caderina *in vitro*, contribuyendo así a la invasión por las células cancerígenas [51].

Por otro lado, formas solubles de E-caderina, producto de la proteólisis del dominio extracelular, generan fragmentos peptídicos de 80-84 KDa, quedando un fragmento de 40 KDa unido a la membrana plasmática, haciendo que la β -catenina que se encuentra unida a membrana se libere al citoplasma. Algunas proteasas capaces de realizar tal rompimiento incluyen la estromelisina-1, matrisilina y plasmina [52]. La endocitosis del complejo E-caderina/catenina en líneas celulares de cáncer de mama, es otro mecanismo por medio del cual se ha observado la pérdida de interacción de este complejo [53].

Un mecanismo alternativo para inactivar la función de adhesión de la E-caderina en células tumorales es la ruptura de la conexión entre la caderina y el citoesqueleto. Por ejemplo, mutaciones en el gen de α -catenina inactivan la función de E-caderina ya que impiden que el complejo caderina/catenina se una al citoesqueleto. Mutaciones en CTNNA1 han sido encontradas en algunas líneas celulares derivadas de tumores que carecen de la función de adhesión normal dependiente de caderinas [54]. La delección homocigota del gen CTNNA1, hace que se pierda la adhesión celular y se evita la unión a la β -catenina. Esto se observó en líneas celulares de cáncer de pulmón [55] y de ovario [56].

Se ha observado que las cateninas que forman el complejo caderina/catenina, pueden ser intercambiadas por nuevas moléculas reclutadas del citoplasma [57] y pueden ser disociadas de las caderinas en respuesta a ciertos estímulos. Se ha evidenciado la asociación de otras moléculas diferentes a la E-caderina a las cateninas, como es el caso de EGFR [58], HER-2 (Proteína con actividad cinasa conocida también como c-Erb-2) [59] y APC [60], entre otras.

1.3. La Vía de señalización Wnt

Los Wnts son glicoproteínas secretadas, que regulan el crecimiento celular, la motilidad, y la diferenciación celular durante el desarrollo embrionario. Actualmente se han identificado 19 proteínas Wnts entre las que se encuentran Wnt-1, Wnt-3a y Wnt-8, las cuales activan la vía canónica de Wnt/ β -catenina [61]. Los Wnts se unen a receptores transmembranales de 7 dominios llamados “Frizzled” (Fz) y a coreceptores de Lipoproteínas de baja densidad (LRP), los cuales son esenciales para la transmisión de la señal [62]. La interacción de los

Wnt con los receptores Fz, puede ser modulada por factores secretados; algunos lo hacen directamente como WIF-1, “Cerberus” y FrzB, y otros indirectamente reduciendo la disponibilidad de los co-receptores LRP como los miembros de la familia “Dickkopf” (Dkk-1 y Dkk-2) (Figura 5) [63].

Después de la activación de los receptores de la vía Wnt, “Dishevelled” (Dsh), una fosfoproteína citoplasmática, comienza a interactuar con los fosfolípidos de la membrana plasmática [64]. Es en este paso donde la activación de Dsh puede interferir con la degradación de β -catenina. Un gran número de proteínas que interactúan con Dsh han sido identificadas, como Dapper, Frodo, Daam1, PAR-1, and NKDa, las cuales pueden activar o inhibir la vía Wnt [65, 66].

La unión de axina, miembro de la vía Wnt, a los receptores LRP, sería el paso más directo donde se podría bloquear la función de destrucción del complejo β -catenina [67]. En células epiteliales diferenciadas, en ausencia del factor Wnt, la GSK3 β fosforila a la β -catenina y la marca para que sea degradada por la vía de ubiquitinación. Es decir, los niveles de β -catenina citoplasmática son normalmente controlados por un complejo multiprotéico de destrucción formado por la axina, APC, GSK3- β y CKI α/ϵ [68-70]. Los sitios de fosforilación se localizan en el dominio N-terminal de β -catenina y son los sitios donde ocurre la mayoría de las mutaciones en ciertas neoplasias. Se ha sugerido que la fosforilación de β -catenina se da en dos pasos: primero el residuo de Ser 45 es fosforilado por la CKI y luego se fosforilan los residuos de Ser 33, Ser 37 y Thr 41 por la GSK3 β [71].

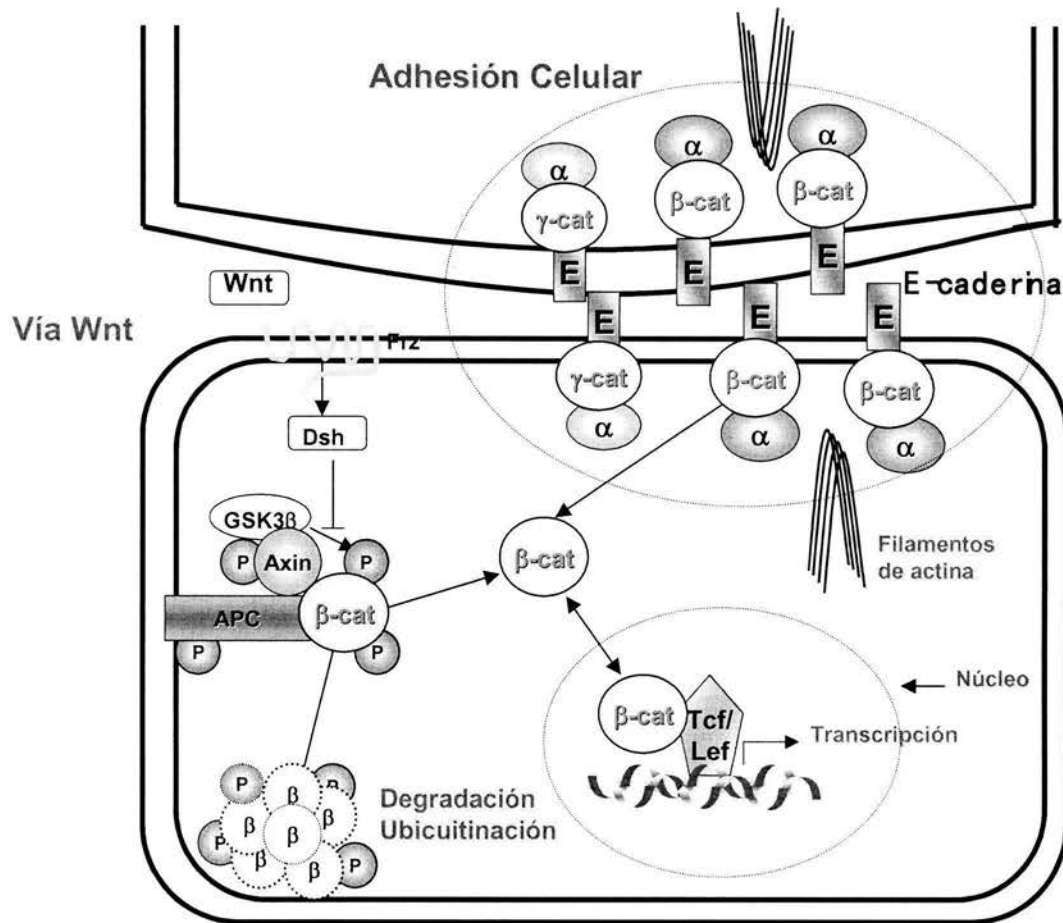


Figura 5. El papel de β -catenina en su interacción con la E-caderina en la adhesión celular y con la vía de señalización Wnt. Tanto β -catenina como γ -catenina se unen al dominio citoplasmático de E-caderina, estas 2 proteínas se unen a la vez a α -catenina para unirse finalmente al citoesqueleto de actina. Cuando la Vía Wnt está inactiva, β -catenina es fosforilada GSK3 β y marcada para ser degradada en el proteosoma. Por otro lado, cuando la vía Wnt se activa, la fosforilación de β -catenina por GSK3 β es inhibida por la acción de Dsh y esto conlleva a la acumulación de β -catenina en el citoplasma y su migración al núcleo donde forma un complejo con miembros de la familia de factores de transcripción Tcf/Lef. Este complejo activa la transcripción de genes blanco, como ciclina D1, c-myc, c-jun y fra-1, entre otros.

Sin embargo, se ha demostrado en líneas celulares derivadas de cáncer colorectal que la fosforilación de β -catenina no depende de que el residuo S45 sea fosforilado primero [72]. Entonces, los cuatro sitios de fosforilación son esenciales para la degradación de β -catenina y mutaciones en estos sitios permiten la estabilización de la proteína β -catenina. La β -catenina fosforilada es reconocida por la E3 ligasa de ubiquitina β -TrCP induciendo su degradación [73]. La Axina facilita la fosforilación de APC por la unión directa a CKI. La GSK-3 β es además responsable de la fosforilación de APC y de Axina [74] y es inhibida por la GBP (Proteína de unión a GSK3) [75].

Las vías de los Wnts, aparte de estar implicados en el cáncer, también se les asocia con otras patologías humanas, como la enfermedad poliquística del riñón, la vitreoretinopatía exudativa familiar, la osteoartritis, la enfermedad de Alzheimer, y enfermedades cardiovasculares, entre otras [76, 77].

1.3.1. β -catenina como factor de transcripción

La β -catenina en la vía de Wnt tiene la función de factor de transcripción. Esta función fue originalmente descubierta durante el desarrollo embrionario [68, 78, 79]. La β -catenina estabilizada entra al núcleo y se asocia con los factores de transcripción de la familia Tcf/Lef (T cell factor/Linfoide enhancer factor). El Tcf/Lef se une al ADN vía un dominio HMG (High Movility Group) y a la β -catenina por un corto grupo de aminoácidos en su extremo N-terminal. La β -catenina en su región C-terminal tiene la función de transactivación, misma que el Tcf/Lef no tiene, es decir es la β -catenina la que se une a la ARN polimerasa y activa la transcripción [78]. En ausencia de β -catenina en el núcleo, los

factores de transcripción Tcf/Lef reclutan corepresores como Groucho y CtBP para reprimir la transcripción, pero en presencia de β -catenina, el Tcf/Lef recluta activadores como p300/CBP (acetil transferasa de histonas) y el complejo SWI/SNF para activar la transcripción [80-83]. El complejo β -catenina/Tcf/Lef actúa como coactivador transcripcional de genes blanco, los cuales contienen en su región promotora el sitio de unión a Tcf/Lef. Algunos ejemplos de estos genes incluyen genes reguladores de la proliferación celular (c-myc y ciclina D1) y del desarrollo así como de la progresión tumoral [84-87]. c-myc es un protooncogen que codifica para una proteína reguladora nuclear y se ha observado incrementada en tumores epiteliales de colon [88]. Estudios realizados en cáncer de mama y colon mostraron que la expresión del gen c-myc se ve reprimida por la introducción de un APC “silvestre” y se activa por la acumulación de β -catenina, la cual se une a Tcf en el promotor del gen c-myc [84]. Ciclina D1 es uno de los principales reguladores del ciclo celular y su expresión está controlada desde su síntesis durante la fase G y degradada inmediatamente se da la transición de las fases G1/S. En condiciones neoplásicas, la sobreexpresión de la ciclina D1 se ha observado principalmente en cáncer de colon [89]. Otros genes blanco, son genes de varias proteasas capaces de degradar la matriz extracelular como la matrylisin/MMP7 y la MMP-26 en cáncer de colon [90, 91]. En un estudio se encontró que la expresión de los factores de transcripción fra-1 y c-jun, miembros del complejo AP-1, y el receptor del activador de plasminógeno tipo urocinasa (uPAR), conocido por ser activado a través de AP-1, se incrementaron después de la transfección con β -catenina [92].

En diferentes tipos de tumores se ha observado una desregulación de la vía Wnt. Esta desregulación está asociada a mutaciones en los genes de las proteínas involucradas en esta vía [68]. Por ejemplo, en el gen CTNNB1 de β -catenina, se ha determinado que los sitios mutados en el exón 3 corresponden a los residuos en serinas y treoninas necesarios para la fosforilación por la GSK3 β y su posterior degradación, lo que conlleva a que los niveles citoplasmáticos y nucleares de β -catenina, se observen aumentados en neoplasias como de colon, melanoma, hepatocelular, endometrial, cabeza y cuello, tumores desmoides, pilomatricomas, páncreas, ovario y tiroides [68, 79].

Otro miembro de la vía Wnt y miembro clave del complejo de regulación de β -catenina es APC. En pacientes con poliposis adenomatosa familiar (FAP), se ha observado que el gen de APC se encuentra mutado en el 100% de los casos. En este caso, estas mutaciones sobre el gen de APC inhiben la formación del complejo GSK3 β /APC/Axina/ β -catenina, además de interferir con la exportación de β -catenina al núcleo por APC [93]. También, se han encontrado mutaciones en el gen APC en el 80% de los pólipos colorectales esporádicos y en los carcinomas de colon, así como en otros tipos de cáncer como gástrico, páncreas, hepatocelular, mama, y ovario, en meduloblastomas, tumores desmoides y hepatoblastomas [94]. Por otro lado, en el 20% restante donde no hay mutaciones en el gen APC, se ha reportado que el 50% de estas tienen mutaciones que activan el gen de β -catenina [95]. Sin embargo, mutaciones en otros miembros de la vía Wnt (Axina, GSK3 β , entre otros) han sido observadas en bajo porcentaje en cáncer hepatocelular [96], meduloblastomas [97], colorectal, y ovario [98], pero poco frecuentes en CaCU [99].

1.4. Alteraciones del complejo E-caderina/ β -catenina en el Cáncer (CaCU)

La E-caderina ha sido reconocida como un biomarcador importante de diferenciación tumoral [100, 101]. La pérdida de expresión de E-caderina ha sido correlacionada positivamente con el fenotipo invasivo *in vitro* de líneas celulares provenientes de tumores [102, 103]. *In vivo* se ha mostrado una expresión reducida o aberrante de E-caderina en diferentes cánceres humanos [104-108].

En cáncer de mama tipo lobular, se ha observado la pérdida de expresión de E-caderina en la membrana, y se ha asociado a mutaciones en el gen de E-caderina en la mayoría de los casos [109]. La expresión anormal de E-caderina (ya sea ausencia, disminución o deslocalización), se ha observado además en diferentes cánceres como colon [110], páncreas [62], esófago [46], pulmón [111], cabeza y cuello [112], próstata [113], ovario [114] y vejiga [115], entre otros. Esta pérdida de expresión de E-caderina en la membrana celular, a menudo con localización en el citoplasma ha sido observada en muchas neoplasias y es indicador de la función anormal de E-caderina [116-119].

En estudios *in vivo* se ha observado un fenotipo invasivo con una gran movilidad en líneas celulares de CaCU que expresan gran cantidad de E-caderina [120, 121]. Al evaluar la expresión y la función de la E-caderina y de las cateninas en queratinocitos humanos transfectados con las proteínas E6 y E7 del VPH 16, se observó que la inmortalización de estos queratinocitos con estas proteínas traería como consecuencia una localización alterada de la E-caderina y de las cateninas que pasan de la membrana celular al citoplasma [122]. Recientemente, un estudio reportó el análisis mutacional de los genes de E-caderina, β - y γ -

catenina en líneas celulares de diferentes tipos de tumor incluyendo CaCU, encontrando que las mutaciones en estos genes son poco frecuentes [123].

En las lesiones intraepiteliales se ha observado disminución en la expresión de las moléculas de adhesión celular (E-caderina y cateninas) en la membrana, con un incremento a nivel citoplasmático que se distribuye ocupando toda la capa intermedia e inclusive llegando a la capa superficial [124, 125]. Estos datos sugieren que estas alteraciones del complejo E-caderina/catenina tienen un papel importante en la iniciación así como en la progresión tumoral y que la disminución de expresión de E-caderina en la membrana se puede catalogar como un evento temprano en la carcinogénesis del cuello uterino [124].

La disminución de algunas de las moléculas de adhesión ha sido descrita en el carcinoma epidermoide, permitiendo a los investigadores sugerir que la deslocalización de estas moléculas puede estar involucrada en la progresión del cáncer de tipo epidermoide de cérvix [126]. Específicamente, algunos investigadores han concluido que las interacciones con E-caderina, o la ausencia de esta pueden influir en el potencial invasivo de las células neoplásicas intraepiteliales en el epitelio del cérvix [121, 124, 125]. Además, otros estudios han demostrado que en el cáncer invasor de cuello uterino la síntesis de moléculas de adhesión como la E-caderina disminuye. Esto sugiere que la pérdida eventual de las moléculas de adhesión en la neoplasia de cérvix puede estar correlacionada con la progresión tumoral [121, 124-126].

En los adenocarcinomas se ha observado una expresión alterada de β -catenina (localización en citoplasma y/o núcleo) en más del 65% de los tumores analizados (51 casos) y se ha asociado con el estadio tumoral [127, 128]. Asimismo, la distribución de E-caderina en tumores de tipo glandular (adenoescamoso y adenocarcinoma) ha sido uniforme y no se ha observado disminución o ausencia de esta proteína en este tipo de tumores (24 casos) [129].

Previamente en nuestro laboratorio se evaluó la localización de β -catenina en CaCU (32 tumores, tipo epidermoide); los resultados reportaron que en un 40% de estos tumores la proteína β -catenina se encuentra localizada principalmente en el citoplasma/núcleo. Además se evaluó el estatus mutacional del gen de β -catenina, analizando los exones 3, 4 y 6 y no se observaron mutaciones en las muestras analizadas [130].

Basados en estas observaciones y en el hecho de que la función del complejo caderina/catenina es anormal en muchos carcinomas (incluyendo cáncer de colon, próstata, mama, esófago, vejiga y cérvico uterino), podemos inferir que la adquisición de una disfunción de este complejo es un paso importante en el desarrollo y progresión de neoplasias. Adicionalmente se puede especular que la disfunción de la E-caderina y cateninas relacionadas a su expresión aberrante y/o disfunción con otras proteínas asociadas con las uniones adherentes, puedan estar presentes en las lesiones pre-neoplásicas y en el cáncer invasor del cuello uterino.

2. JUSTIFICACION

El cáncer de cuello uterino constituye un importante problema de salud pública en México, razón por la cual existe un particular interés en el estudio de las causas y factores que conlleva esta neoplasia, sobre todo a nivel molecular. En el caso particular del cáncer cérvico uterino, existe la infección persistente del VPH en aproximadamente 99% de los casos. La acción de las oncoproteínas E6 y E7 sobre la inactivación de los supresores de tumores p53 y pRb ha sido ampliamente documentada. Sin embargo, se sabe que la degradación de p53 y pRb es suficiente para inmortalizar células pero insuficiente para transformarlas. De ahí que se requiera otro tipo de alteraciones que pueden estar producidas por las oncoproteínas virales para transformar una célula.

Por otro lado, las alteraciones en la vía de señalización Wnt (β -catenina) son identificadas cada vez con más frecuencia en diferentes tipos de tumores. Por ejemplo en cáncer de colon y de mama, la β -catenina está implicada en la activación de la transcripción de genes de proliferación celular que pueden estar involucrados con el desarrollo tumoral. En el caso particular del CaCU, poco se sabe sobre alteraciones de la vía Wnt y su participación en el desarrollo del mismo. Sin embargo, publicaciones recientes han observado la acumulación de β -catenina en citoplasma/núcleo en estos tumores [120, 123, 125, 127, 130]. Esto ha permitido hacer planteamientos sobre la deslocalización de β -catenina y su papel en el desarrollo y progresión del CaCU. De manera particular, existe un gran interés en identificar los genes activados por el complejo β -catenina-Tcf/Lef y determinar su posible papel oncogénico en CaCU.

3. HIPOTESIS

Las alteraciones en la localización celular de β -catenina son frecuentes, y están generalmente asociadas a cambios con la unión a E-caderina y se correlacionan con la progresión del Cáncer Cérvico Uterino.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Determinar el tipo y frecuencia de las alteraciones en las proteínas β -catenina y E-caderina (vía Wnt/Adhesión celular) en lesiones y tumores de Cuello Uterino.

4.2 Objetivos Específicos:

- a. Determinar los niveles y la localización de β -catenina en líneas celulares y en biopsias de Cáncer Cérvico-Uterino.
- b. Analizar la presencia de mutaciones en el exón 3 del gen de β -catenina en biopsias de tumores de Cuello Uterino.
- c. Determinar la presencia de posibles alteraciones en la expresión y localización de la proteína E-caderina en líneas celulares y tumores de cuello uterino.
- d. Evaluar si las proteínas E-caderina y β -catenina en líneas celulares y biopsias de CaCU se encuentran unidas formando un complejo.
- e. Analizar la actividad transcripcional del complejo β -catenina/Tcf/Lef en líneas celulares de CaCU y relacionar la deslocalización de β -catenina con la localización de las proteínas ciclina D1, fra-1, c-jun y c-myc en líneas celulares y biopsias de CaCU.

5. METODOLOGIA

5.1. Población de estudio

Las muestras analizadas consistieron en biopsias frescas y tejidos embebidos en parafina, provenientes de cáncer cérvico uterino diagnosticado en pacientes que acudieron al servicio de Ginecología del Instituto Nacional de Cancerología, durante el periodo de enero de 1989 a diciembre de 2002. Las muestras de tejido normal fueron de biopsias provenientes de histerectomías radicales y de cervicitis, las cuales fueron obtenidas en el departamento de Ginecología del Hospital General Manuel Gea González (rango de edad, 20-74 años, mediana 33 años). Los tejidos frescos fueron fijados en formaldehído al 10% y posteriormente embebidos en parafina. Los cortes de estos y las láminas del archivo fueron posteriormente utilizados para el análisis por Inmunohistoquímica (IHQ). Un total de 178 muestras fueron evaluadas, las cuales consistieron en 20 casos de epitelio epidermoide normal, en 37 casos de lesiones intraepiteliales de bajo y alto grado y en 123 casos de cáncer invasor. El estudio histopatológico definió a las muestras de cáncer invasor en 65 casos de carcinoma epidermoide, 31 casos de carcinoma adenoescamoso y 27 casos de adenocarcinoma. El promedio de edad de estas pacientes fue de 46 años (en un rango de 18 a 85 años).

5.2. Líneas celulares

Las líneas celulares humanas de carcinoma de cuello uterino Caski (VPH 16), C33A (no VPH), SiHa (VPH 16), CaLo (VPH 18), HeLa (VPH 18), y HaCat (queratinocitos normales, no VPH), así como las líneas SW480 (cáncer de colon humana, alta cantidad de β -catenina y Tcf-4 endógena), MCF-7 (adenocarcinoma de mama), fueron obtenidas de

ATCC (American Type Culture Collection) (Rockville, MD). Las líneas celulares fueron mantenidas en medio de cultivo Dulbecco Modificado (DMEM) (Invitrogen) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) (Invitrogen), 2mM de Glutamina, y 100U Penicilina/Streptomycin (Invitrogen).

5.3. Extracción y Análisis de Proteínas

Las proteínas celulares fueron extraídas de las líneas cultivadas en cajas petri y de biopsias de CaCU, por homogenización en buffer RIPA (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% Deoxicolato de Sodio y 0.1% SDS), además de un cóctel de inhibidores de proteasas (pepstatina, leupeptina, aprotinina, quimostatina, antipaina y PMSF (phenylmethylsulfonylfluoride) e inhibidores de fosfatasa (Na_3VO_4 y NaF) y clarificado por centrifugación a 4°C por 20 min. Las concentraciones de proteína fueron determinadas con un kit de ácido bisinconílico (Pierce).

5.3.1. Análisis por Western Blot (WB)

Con el fin de determinar niveles basales de diversas proteínas celulares, se utilizó el método de Western Blot. Se utilizaron 50 µg de proteína total en buffer de carga y corridos en geles de SDS-PAGE al 7.5% o 10% y transferidos a una membrana de Nitrocelulosa (Amersham-Pharmacia). Después de bloquear con 5% de leche descremada y 1% de albúmina sérica bovina (BSA), las membranas fueron incubadas con el anticuerpo monoclonal primario y posteriormente con el anticuerpo secundario acoplado a HRP (peroxidasa). Las membranas fueron reveladas con el sistema de quimioluminiscencia (ECL, Amersham-Pharmacia). Para confirmar que cantidades iguales de proteína que fueron cargadas en cada línea, se determinaran los niveles de actina como control interno (anti-actina IgG).

Los anticuerpos dirigidos contra β -catenina y E-caderina fueron obtenidos de Transduction Laboratories (Lexington, KY). Los anticuerpos dirigidos contra las ciclinas (D1, E, y A), fra-1, c-jun y actina fueron obtenidos de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA); otros anticuerpos como c-myc, EMA (Antígeno Membranal Epitelial), fueron obtenidos de DAKO (Glostrup, Denmark).

5.3.2. Inmunoprecipitación (IP)

Para detectar la unión de E-caderina con la β -catenina se realizaron ensayos de IP de las proteínas extraídas para los ensayos de WB. Los extractos celulares fueron incubados con el anticuerpo dirigido contra la proteína β -catenina por 1 hora a 4°C y precipitados con las perlas de proteína A agarosa toda la noche a 4°C en agitación. Las perlas fueron lavadas con 1 ml de buffer RIPA y posteriormente mezcladas con el buffer de carga de proteínas Laemmli 4X. Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE en geles de 7.5% y se continuó con el método de Western Blot, utilizando en este caso un anticuerpo dirigido contra la proteína E-caderina.

5.3.3. Inmunohistoquímica (IHQ)

Con el fin de determinar tanto niveles de proteínas expresadas como localización de las mismas, se utilizó el método de IHQ. Los tejidos embebidos en parafina fueron cortados a 3 μ m y montados en láminas previamente cubiertas con Poli- L-lisina (Sigma) y mantenidas a temperatura ambiente hasta su uso. Se tiñó una lámina con hematoxilina y eosina para la clasificación histológica, y las restantes fueron usadas para IHQ. Las láminas con los cortes fueron desparafinadas colocándolas en un horno a 60°C por 30 minutos y posteriormente en xileno, seguido de una hidratación con alcoholes en diferentes grados hasta llegar al agua.

Para la recuperación antigénica, las láminas calentadas por 10 min en un Buffer Citrato (pH 6.0) hasta ebullición. Las láminas fueron bloqueadas con H₂O₂ al 0.3% durante 5 minutos. Los tejidos fueron incubados con el anticuerpo primario por 30 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda, posteriormente se realizaron 2 lavados con PBS y se adicionó el segundo anticuerpo que tiene acoplado la peroxidasa (anti-ratón Envision System, Dako, Glostrup, Denmark), se incubó durante 30 minutos y posteriormente se realizaron 2 lavados con PBS. Finalmente, se reveló con DAB (Diaminobenzidina) usado como cromógeno y contrateñidas con hematoxilina.

El porcentaje de células tumorales teñidas fue dado como: 0= células tumorales no positivas, 1=1-25%, 2=26-50%, 3=51-75%, 4=76-100%. La intensidad comparada con el control normal fue 0= ausencia de tinción, 1= tinción débil, 2= tinción moderada, 3= tinción fuerte.

5.4. Extracción de ADN y tipificación de VPH

El ADN fue extraído de secciones de 50 µm de los tejidos embebidos en parafina. Para ello, se utilizó el kit DNAeasy (Qiagen). Las muestras fueron colocadas en un buffer de extracción (Tris 10 mM pH 8.0, EDTA 20 mM pH 8.0, SDS 0.5% y proteinasa K 100µg/ml) y dejadas toda la noche a 42°C. Posteriormente se purificó el ADN con Fenol/Cloroformo y se cuantificó en un espectrofotómetro.

Las secuencias de VPH contenidas en las muestras CaCU, fueron determinadas por PCR. El ADN fue amplificado con oligonucleótidos específicos para los VPHs más frecuentes, VPH 16 y VPH 18. Las muestras negativas a estos tipos virales se sometieron a

amplificación con oligonucleótidos universales L1C1/L1C2. Los oligonucleótidos universales utilizados generan un fragmento de 240-250 pb de la región L1 y detectan al menos 9 tipos virales genitales (6, 11, 16, 18, 31, 33, 42, 52 y 58) [131]. A su vez, las muestras negativas a algún tipo de VPH se amplificaron para el gen de β -globina, para corroborar la buena calidad de la muestra. Para el tipo VPH 16 se utilizaron unos oligonucleótidos que amplifican un fragmento de 792 pb de la región E6 y E7 del VPH 16 [132]; y para VPH 18 se utilizaron unos oligonucleótidos que amplifican un fragmento de 350-360 pb de la región LCR de VPH 18 [133].

5.5. Análisis mutacional del gen CTNNB1

Para determinar el estado mutacional del gen de β -catenina, se utilizó la técnica de SSCP (“Single-strand conformational polymorphism”). El ADN previamente extraído fue además utilizado para amplificar por PCR al gen de β -catenina. Un fragmento genómico del exón 3 del gen de β -catenina donde se encuentran los sitios de fosforilación por la GSK-3 β fueron amplificados con los oligonucleótidos que generan un fragmento de 236 pb [134].

Para la amplificación se utilizó 1 μ l del templado de ADN y se amplificó por PCR en un volumen de reacción de 10 μ l conteniendo 25mM de MgCl₂; 100 μ M de dNTP (0.4 μ M de la mezcla de oligonucleótidos dCTP, dGTP, dTTP y 0.1 μ M de dATP marcado con ³²P) y 1 unidad de ampli-taq polimerasa (Perkin Elmer Cetus). La PCR fue realizada en un GeneAmp PCR System 9600 de Perkin-Elmer con un paso inicial de desnaturalización de 95°C por 11 min y luego 40 ciclos de 94°C por 30 seg, 55°C por 45 seg, 72°C por 30 seg, y

un ciclo final de extensión de 72°C por 10 min. Los productos de la reacción fueron visualizados en un gel de agarosa al 2%.

Los fragmentos amplificados de β -catenina fueron analizados para mutaciones por SSCP de acuerdo a la metodología descrita por Ilyas *et al* en 1997 [135]. Se tomaron 4 μ l de producto de PCR y se mezclaron con 20 μ l de buffer de carga (95% formamida, 10 mM NaOH, 20 mM EDTA, 0.02% azul de bromofenol, 0.02% de xileno cianol), desnaturalizado por 15 min a 94°C e inmediatamente colocado en hielo. 4 μ l de la muestra fueron corridos en un gel de poliacrilamida al 6% en condiciones no denaturalizantes con 2% de Glicerol a 4°C durante 6 horas. Los geles fueron secados y expuestos a una película de rayos X durante 12 horas. Como control para patrones de corrimiento electroforético se utilizaron plásmidos con el exón 3 del gen de β -catenina conteniendo diferentes mutaciones: PHA- β -cat-Y33, p45, pS33Y y pwt- β -catenina los cuales fueron donados por el Dr. B Vogelstein (John Hopkins Oncology Center, Baltimore, Md., USA). Los productos cuyo corrimiento electroforético sugiriera una posible mutación, se purificaron y secuenciaron para corroborar la presencia de mutaciones en el exón 3 de β -catenina.

5.6. Actividad transcripcional del gen de β -catenina

Las líneas celulares empleadas fueron HeLa, CaLo y C33A derivadas de CaCU y SW480 derivada de cáncer de colon. Las líneas celulares fueron transfectadas con los plásmidos que contienen el sitio de unión del complejo β -catenina/Tcf/Lef al ADN (pTOP), y con mutaciones en el sitio de unión del complejo al ADN (pFOP) acoplados al gen de la luciferasa. Para medir la eficiencia en la transfección se utilizó como control el plásmido

pEGFP (Green Fluorescent Protein). Se utilizó 1 µg de ADN total y 7.5 µl de lipofectamina (Invitrogen) por caja de 35 mm. La mezcla de ADN plasmídico se adicionó a los cultivos celulares que presentaban un 50% de confluencia más 2 ml de medio DMEM y se dejó incubando por 12 horas. Posteriormente, se adicionó 2 ml de medio DMEM suplementado con SFB al 20% y se dejó incubando por 36 horas más. Finalmente, se cuantificó la actividad luciferasa empleando 100 µl de la solución de luciferasa LAR-(luceferin) del kit “Luciferase Assay System” (Promega) y 20 µl del extracto proteico de las líneas celulares transfectadas y la lectura se hizo en un luminómetro por 10 s.

5.7. Análisis Estadístico

El análisis estadístico fue realizado usando el paquete SPSS-PC (versión 12.0). Las diferencias entre grupos fueron analizadas por χ^2 (chi-cuadrado) y la prueba exacta de Fisher.

6. RESULTADOS

6.1. Análisis de la localización y expresión de las proteínas β -catenina y E-caderina en líneas celulares derivadas de cáncer de cuello uterino.

6.1.1. Localización de las proteínas β -catenina y E-caderina en líneas celulares

Se evaluó en líneas celulares derivadas de tumores de cérvix la localización de β -catenina y E-caderina por Inmunocitoquímica (ICQ). Se encontró que β -catenina se localiza en la membrana celular y en el citoplasma en las líneas HeLa, HaCat, CaLo, Caski y SiHa. En la línea celular C33A, no se observó tinción para β -catenina. La línea SW480 (cáncer de colon), se utilizó como control positivo, puesto que en esta línea la β -catenina se encontró localizada en el citoplasma y en el núcleo (Figura 6A, C, E, G, I, K, M). La E-caderina se localizó en la membrana y en el citoplasma en las líneas HaCat, Caski y SiHa. En las líneas celulares HeLa, CaLo y C33A, la tinción fue negativa y en SW480 la localización de E-caderina se observó tanto en la membrana celular como en el citoplasma (Figura 6B, D, F, H, J, L, N).

6.1.2. Detección de las proteínas β -catenina y E-caderina en líneas celulares.

Se evaluó en líneas celulares derivadas de tumores de cérvix, la presencia de β -catenina y E-caderina por Western Blot. Se observaron niveles altos de β -catenina en las líneas HaCat, CaLo, Caski, C33A y SiHa. En la línea celular HeLa, los niveles de proteína se observaron bajos. Para E-caderina, se observaron niveles altos de proteína en las líneas HaCat, Caski y SiHa. No se observó presencia de E-caderina en las líneas HeLa, CaLo y C33A. La línea celular SW480 (cáncer de colon), se utilizó como control positivo (Figura 7A).

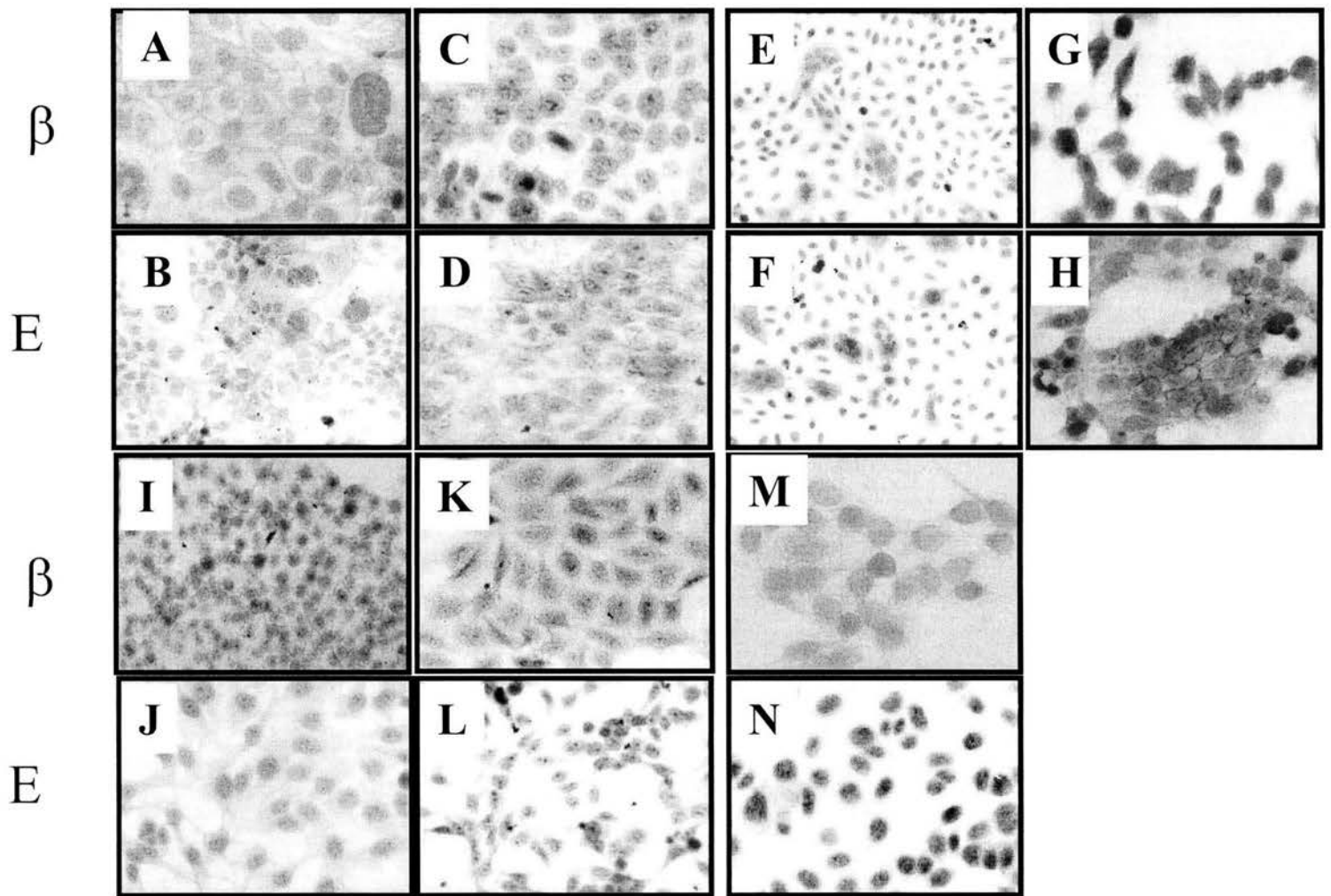


Figura 6. En la mayoría de las líneas celulares provenientes de tumores de cuello uterino la localización de β -catenina por inmunocitoquímica se observó alterada en el citoplasma de (A) Caski, (C) HaCat, (E) SiHa, (G) SW480 (I) HeLa y (K) CaLo. En la línea C33A (M) no se observó localización de β -catenina. Sin embargo, la localización de la proteína E-caderina en líneas celulares de CaCU se observó principalmente en la membrana así como en el citoplasma de (B) Caski (D) HaCat, (F) SiHa y (H) SW480. En tres líneas celulares se observó ausencia de tinción para E-caderina, (J) HeLa, (L) CaLo y (N) C33A. (Aumento 40X).

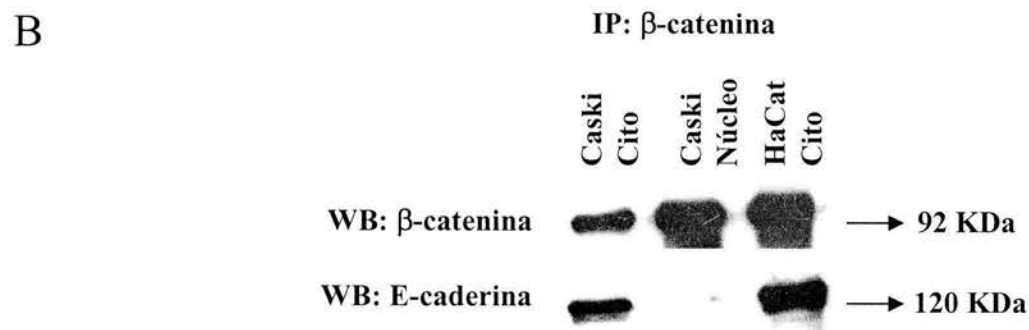
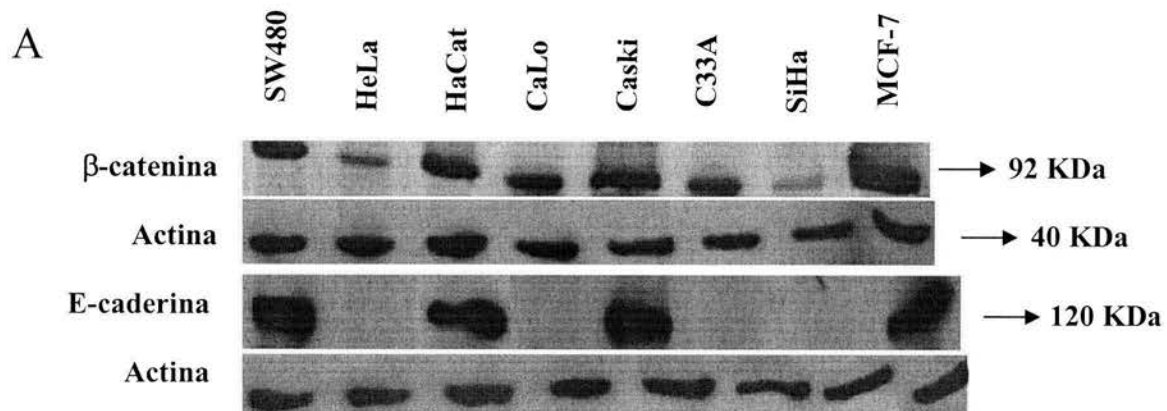


Figura 7. A. Detección de las proteínas β -catenina y E-caderina en líneas celulares derivadas de tumores de cuello uterino por Western Blot. En todas las líneas celulares se detectó β -catenina, sin embargo E-caderina se observó solamente en las líneas SW480, Caski y HaCat. Como control de la concentración de proteína se utilizó un anticuerpo dirigido contra actina. B. Presencia del complejo E-caderina/ β -catenina en las líneas celulares Caski y HaCat mediante inmunoprecipitación (IP). Se observó presencia del complejo en extractos celulares citoplasmáticos de las líneas evaluadas.

6.2. Análisis de la localización y presencia de las proteínas β -catenina y E-caderina en biopsias de lesiones premalignas y tumores de cuello uterino y tejido normal.

6.2.1. Características ginecológicas de las pacientes cuyas muestras se analizaron en este trabajo.

Las muestras de tejido normal fueron biopsias provenientes de histerectomías radicales y de cervicitis, las cuales se obtuvieron en el departamento de Ginecología del Hospital General Manuel Gea González (rango de edad, 20-74 años, mediana 33 años); menarca, rango de edad 9-16; IVSA (Inicio de vida sexual activa), 14-25; NPS (número de parejas sexuales), rango de 1-4 parejas.

Se evaluaron 42 casos de lesiones precursoras conformadas por: 6 casos de lesiones intraepiteliales de bajo grado (NIC I, Neoplasia Intracervical I) y 36 casos de alto grado (NIC II y NIC III (*in situ*)). El rango de edad fue de 21-64 años, con una mediana de 42 años. Menarca, rango de edad 9-15 años; IVSA, rango de edad 14-29 años; NPS, rango de 1-5 parejas.

En el cáncer invasor se estudiaron 123 casos, los cuales estaban divididos así:

- a. Se obtuvieron 65 casos de carcinoma epidermoide (rango de edad, 24-85 años, mediana de 50 años), la mayoría de las pacientes se encontraron en los estadios clínicos II y III, siendo casi todos los casos carcinomas de tipo epidermoide de células grandes no queratinizantes. Menarca, rango de edad 8-18 años; IVSA, rango de edad 9-28 años; NPS, rango de 1-6 parejas. El 48% de las pacientes expresaron el tipo 16 del VPH tipo 16 y el 19% el tipo VPH 18.

- b. 31 casos de carcinoma adenoescamoso (rango de edad, 24-80 años, mediana de 45 años). La mayoría de las pacientes se encontraron en los estadios clínicos I, II, y III. Menarca, rango de edad 11-15 años; IVSA, rango de edad 13-42 años; NPS, rango de 1-3 parejas. En los carcinomas de tipo adenoescamoso, el 15% de las muestras expresaron el VPH de tipo 18 y el 15% de tipo 16.
- c. 27 casos de adenocarcinoma (rango de edad, 23-77 años, mediana de 50 años). Las pacientes se encontraban en los estadios clínicos I y II preferentemente. Menarca, rango de edad 11-16 años; IVSA, rango de edad 15-26 años; NPS, rango de 1-3 parejas. En los adenocarcinomas el 50% de las muestras expresaron el VPH 16, y el 6% el VPH 18.

6.2.2. Localización de las proteínas β -catenina y E-caderina

El objetivo de este estudio fue analizar la distribución celular y posibles alteraciones de las proteínas β -catenina y E-caderina en diferentes tipos histológicos de cáncer cérvico uterino y lesiones premalignas comparadas con controles normales. Por inmunohistoquímica se analizó la distribución celular de las proteínas β -catenina y E-caderina en 20 muestras de biopsias de epitelio normal de cérvix, 43 lesiones premalignas y una serie de 126 tumores invasivos de diferente tipo histológico que incluyó 68 carcinomas de tipo epidermoide, 31 carcinomas de tipo adenoescamoso y 27 adenocarcinomas. La significancia estadística se evaluó mediante la prueba X^2 -cuadrada o la prueba exacta de Fisher. Nosotros observamos que la proteína β -catenina se distribuye anormalmente en el citoplasma en el 62% de las lesiones premalignas y en más del 70% en el cáncer invasor, cuando se compara con el tejido normal ($p \leq 0.05$), donde la proteína permanece en la membrana celular. Así mismo,

encontramos que la proteína E-caderina muestra una distribución anormal significativa en el citoplasma en el 58% de las lesiones premalignas ($p \leq 0.05$) y en más del 71% de los carcinomas de tipo epidermoide y adenoescamoso comparado con el tejido normal ($p \leq 0.05$). No se encontró diferencias en la distribución de la proteína E-caderina en los adenocarcinomas cuando comparamos con las muestras control. Interesantemente, se encontró que tanto la β -catenina como la E-caderina están ausentes en la membrana alrededor del 40% de las lesiones premalignas. La tinción nuclear de β -catenina fue un evento poco común, contrario a lo que se ha reportado en otras neoplasias. Nuestros hallazgos indican que la deslocalización en el citoplasma de las proteínas β -catenina y E-caderina es frecuente en los tumores de cuello uterino de diferente tipo histológico y sugieren que estas proteínas están involucradas en el desarrollo del cáncer cérvico uterino. (Ver artículo Gynecol Oncol 2005;97:330-336.).

6.2.3. Detección de las proteínas β -catenina y E-caderina

Además por Western Blot se evaluó la presencia de β -catenina y E-caderina en algunas muestras de tumores de cuello uterino (T) y muestras normales (N). Estos tumores analizados por WB previamente se observó localización membranal y citoplasmática de β -catenina y E-caderina por IHQ. Los niveles de las proteínas β -catenina y E-caderina fueron significativamente más altos en los tumores comparados con las muestras normales de cérvix (Figura 8). Como control de la concentración de proteína se utilizó un anticuerpo dirigido contra actina.

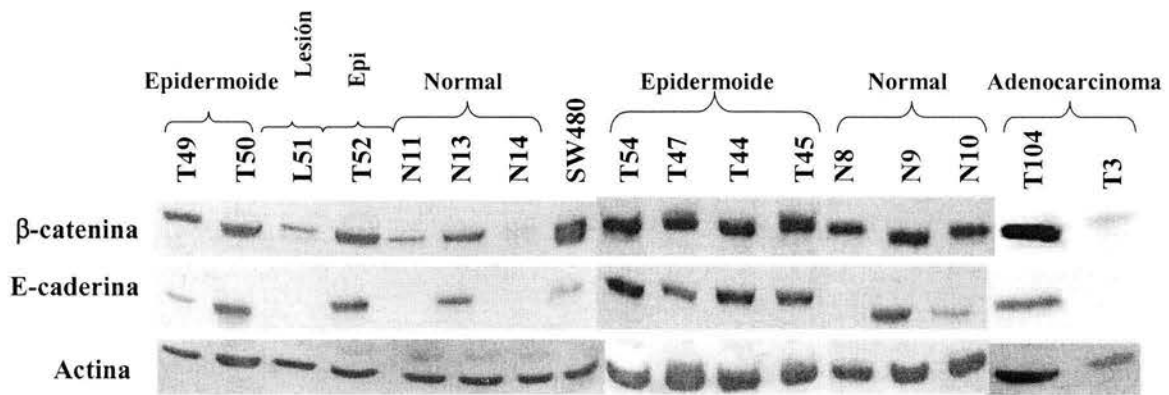


Figura 8. Detección de las proteínas β -catenina y E-caderina por Western Blot en una serie de muestras normales de cérvix y de CaCU. En la mayoría de tumores de cuello uterino se detecta tanto β -catenina como E-caderina, sin embargo en algunos tumores la expresión de E-caderina está ausente. La expresión de β -catenina y E-caderina se correlacionó con la localización de estas dos proteínas por IHQ en biopsias de CaCU. Se utilizó actina como control de la concentración de proteína. (T) Tumor, (L) Lesión premaligna y (N) Normal.

6.3. Análisis del complejo E-caderina/ β -catenina en las líneas celulares Caski y HaCat y en biopsias de CaCU

La cantidad de complejo E-caderina/ β -catenina se analizó en las líneas celulares Caski y HaCat en extractos citoplasmáticos y nucleares, encontrándose que estas proteínas estaban en complejo (Figura 7B). En los tumores de cérvix de tipo epidermoide, en los cuales previamente se observó localización membranal y citoplasmática de estas dos proteínas por IHQ, se observó complejo E-caderina/ β -catenina. Además, en los casos donde E-caderina está ausente en la membrana se observó complejo (T10, T20, T21, T45). Sin embargo, en los casos donde hay localización membranal y citoplasmática de β -catenina y E-caderina el complejo no se observó (T55, T58, T59, T64). Solamente se analizó una muestra de tipo adenocarcinoma (T3) y no se observó complejo caderina/catenina (Figura 9).

6.4. Análisis mutacional del exón 3 del gen CTNNB1 por SSCP y secuencia

Para evaluar la posible relación entre la localización anormal de β -catenina y las mutaciones descritas en muestras alteradas en otros tumores, se realizó un PCR-SSCP para el exón 3 del gen de β -catenina. Un total de 40 muestras de tumores se analizaron. Ninguna de las muestras mostró cambios en la movilidad, indicando que las mutaciones en este exón son raras en el CaCU. Como control se utilizó plásmidos que contienen una mutación en el exón 3 (codón S33Y y Δ 45) y muestras de cérvix normal (Figura 10A).

Para confirmar lo anterior algunas muestras se secuenciaron y en ninguna de estas se observó una diferencia en la secuencia cuando se comparó con el gen de β -catenina silvestre (Figura 10B).

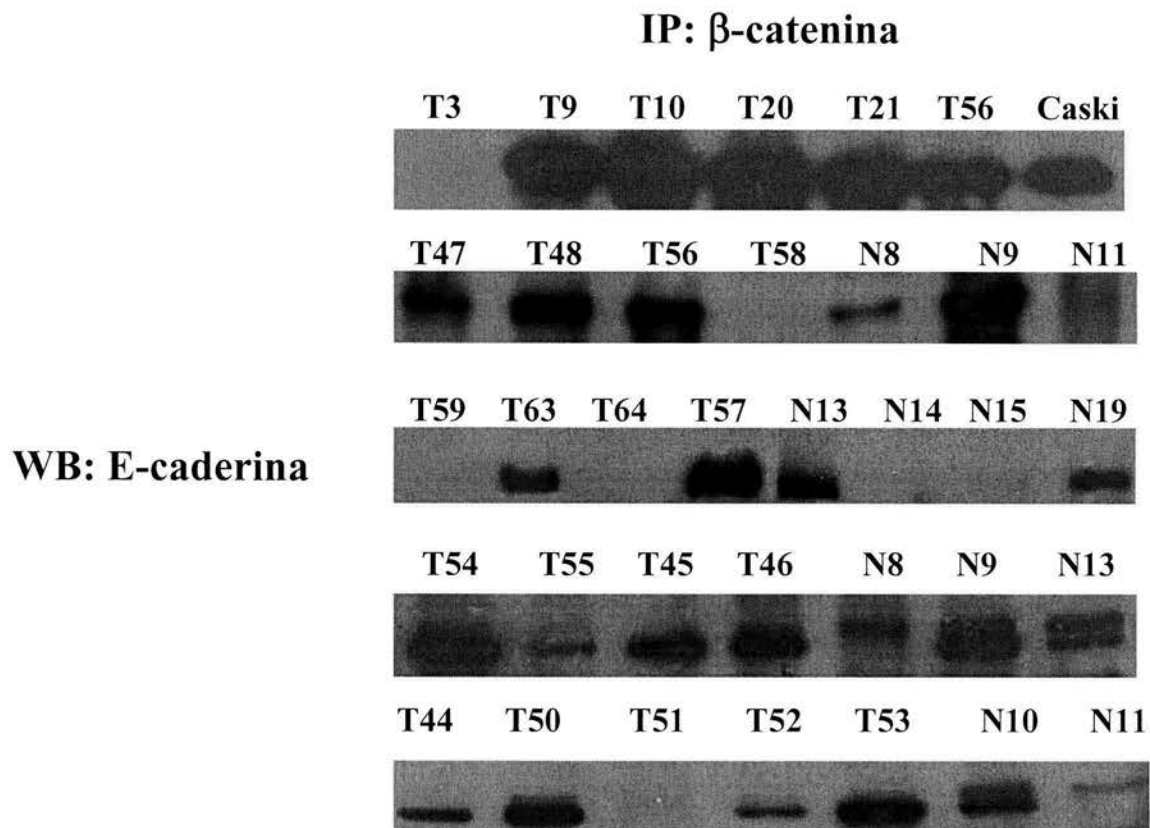


Figura 9. Detección del complejo E-caderina/ β -catenina por inmunoprecipitación en muestras normales de cérvix y tumores de cuello uterino. Se observó formación del complejo en la mayoría de muestras analizadas. Normal (N), Tumor (T).

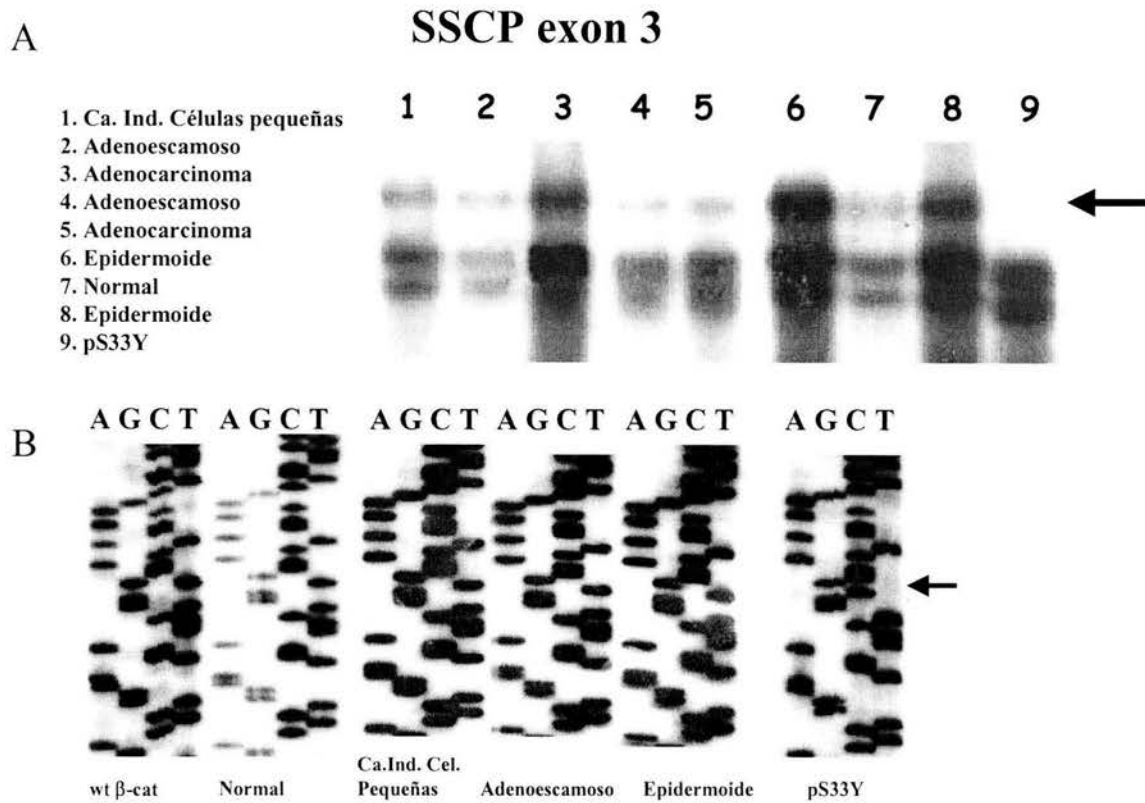


Figura 10. A. Análisis mutacional por SSCP del exón 3 del gen CTNNB1 de β -catenina en muestras de tumores de cuello uterino de diferente tipo histológico. En el carril 9 se probó un plásmido que tiene un cambio en la S33 (clave para la estabilización de β -catenina) por una Y, observando la ausencia de expresión de una banda como lo indica la flecha, en los otros carriles no hubo cambio en las bandas. B. Análisis de secuencia de algunas muestras analizadas previamente por SSCP.

6.5 Actividad transcripcional del gen de β -catenina en líneas celulares derivadas de tumores de cuello uterino.

Para evaluar la actividad transcripcional del complejo β -catenina/Tcf/Lef, se empleo el sistema TOP/FOP, que contiene un sitio promotor con secuencias consenso para la unión del complejo β -catenina/Tcf/Lef acoplado al gen de la luciferasa. En la Figura 11, se muestran los niveles de actividad de la luciferasa obtenidos en las líneas celulares HeLa, SW480 (control positivo de la activación por β -catenina/Tcf/Lef), CaLo y C33A, para pTOP y pFOP como para pEGFP (control negativo). La actividad de la luciferasa observada en las células transfectadas con el pTOP es significativamente alta en HeLa y su control SW480, sin embargo, en CaLo y C33A su actividad se observó baja. Para pFOP la actividad luciferasa fue menor comparada con pTOP en todas las líneas evaluadas. Al realizar la relación entre TOP y FOP se encontró que en todas las líneas evaluadas excepto C33A, se observa actividad transcripcional del complejo β -catenina/Tcf/Lef.

6.6. Localización de genes blanco del complejo β -catenina/Tcf/Lef en líneas celulares derivadas de tumores y en lesiones premalignas y tumores de cuello uterino.

6.6.1. Localización celular de las proteínas ciclina D1, fra-1, c-jun y c-myc en líneas celulares.

Se evaluó en líneas celulares derivadas de tumores de cérvix, la localización de la ciclina D1, fra-1, c-jun y c-myc. Por ICQ, se observó que la ciclina D1 se encuentra localizada principalmente en el citoplasma en todas las líneas analizadas y en la línea celular SiHa se localizó además en el núcleo (Figura 12). Por ICQ, fra-1 se localizó en el citoplasma y en el

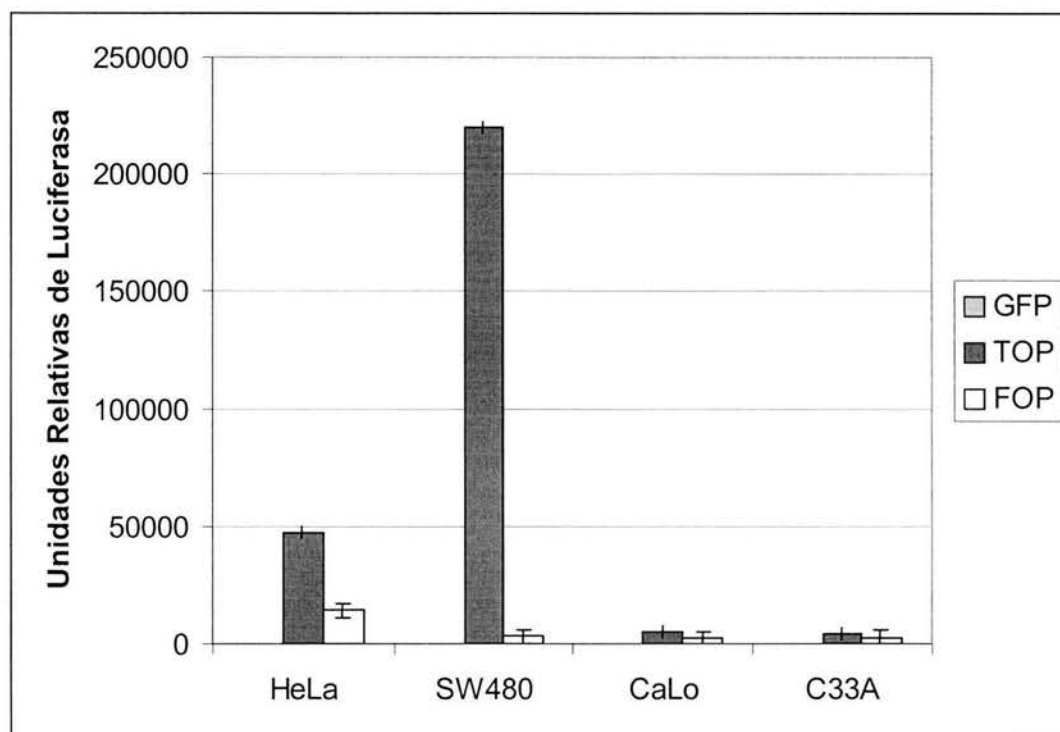


Figura 11. Actividad transcripcional de β -catenina en líneas celulares derivadas de tumores de cuello uterino. La actividad está dada como unidades relativas de luciferasa para las diferentes muestras; pGFP (plásmido de la proteína verde fluorescente), pTOP (plásmido con el sitio β -catenina/Tcf/Lef normal) y pFOP (plásmido con el sitio β -catenina/Tcf/Lef mutado).

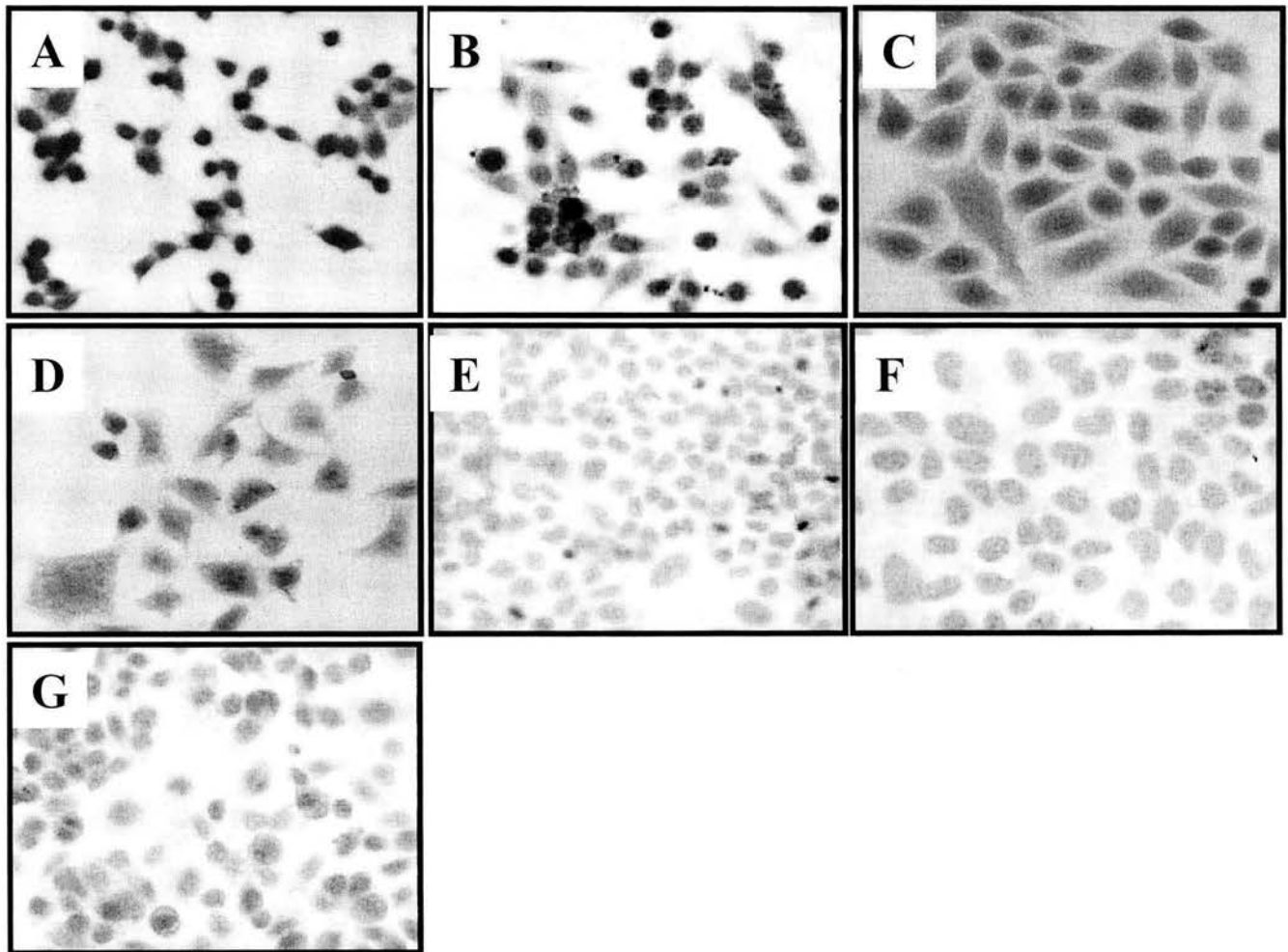


Figura 12. Localización celular de ciclina D1 por ICQ en líneas celulares provenientes de tumores de cuello uterino. No se observó localización nuclear de la proteína ciclina D1; sin embargo, en las líneas celulares (A) SiHa, (B) SW480, (C) HeLa, y (D) CaLo la localización de la proteína fue citoplasmática. Se observó ausencia de tinción en las líneas celulares (E) HaCat, (F) Caski y (G) C33A. (Aumento 40X).

núcleo en las líneas celulares SW480, CaLo, Caski, y HeLa. En las líneas C33A y SiHa no se observó tinción para fra-1 (Figura 13). La proteína c-jun se localizó en el citoplasma en las líneas celulares HeLa, SW480, SiHa, CaLo, HaCat, y C33A, y en el núcleo en HeLa. No se observó c-jun en la línea Caski (Figura 14). La proteína c-myc se localizó en el citoplasma en las líneas SW480, CaLo, y C33A, y estuvo ausente en las líneas HeLa, HaCat, Caski, y SiHa (Figura 15). Por WB evaluamos los niveles de las proteínas ciclina D1, fra-1, c-jun y c-myc, observando una disminución de la proteína en las líneas celulares de CaCU comparados con la línea normal HaCat.

6.6.2. Localización celular de la proteína ciclina D1 en tejido normal, lesiones premalignas y cáncer invasor.

Se evaluó la localización celular de la ciclina D1 en una serie de 135 muestras por IHQ. La serie incluyó 13 muestras normales, 27 muestras de lesiones premalignas tanto de alto como de bajo grado, y 95 casos de cáncer invasor (53 epidermoide, 21 adenoescamoso y 21 adenocarcinomas) (Tabla 1).

En el epitelio normal, una reactividad positiva para ciclina D1 se observó en el 61.5% de los casos en el citoplasma (8 de 13) y un 54% en el núcleo (7 de 13), principalmente en las células basales. En el 31% de estos casos la localización de ciclina D1 se observó tanto en el citoplasma como en el núcleo (Figura 16A). Por otra parte, en la mayoría de las lesiones premalignas la ciclina D1 se localizó en el citoplasma en el 48% ($p=0.4270$) (Figura 16B). También se observó una tenue inmunoreactividad de ciclina D1 en el núcleo (2 de 27 casos) y fue estadísticamente significativa cuando se comparó con las muestras normales.

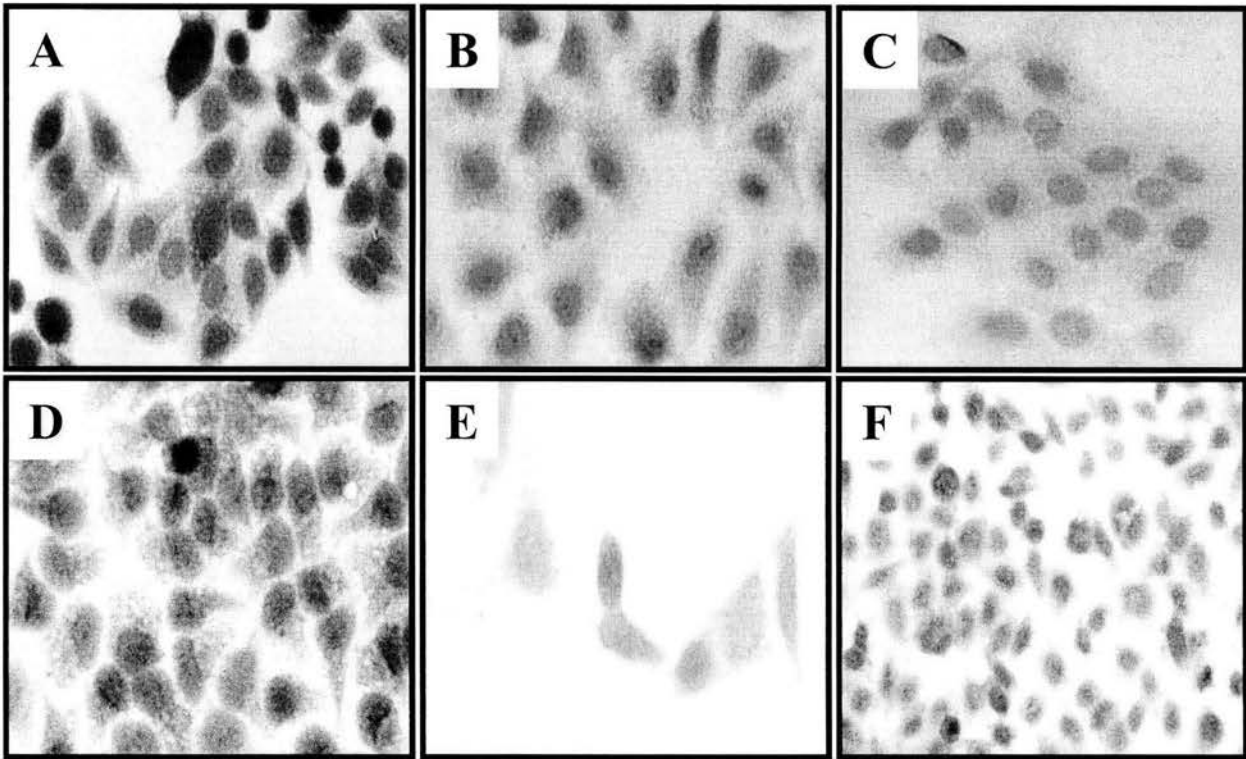


Figura 13. Localización celular de la proteína fra-1 por ICQ en líneas celulares provenientes de tumores de cuello uterino. Se observó localización de la proteína en el citoplasma y en el núcleo en todas las líneas celulares analizadas (A) SW480, (B) CaLo, (C) Caski, (D) HeLa, (E) C33A y (F) SiHa. (Aumento 40X).

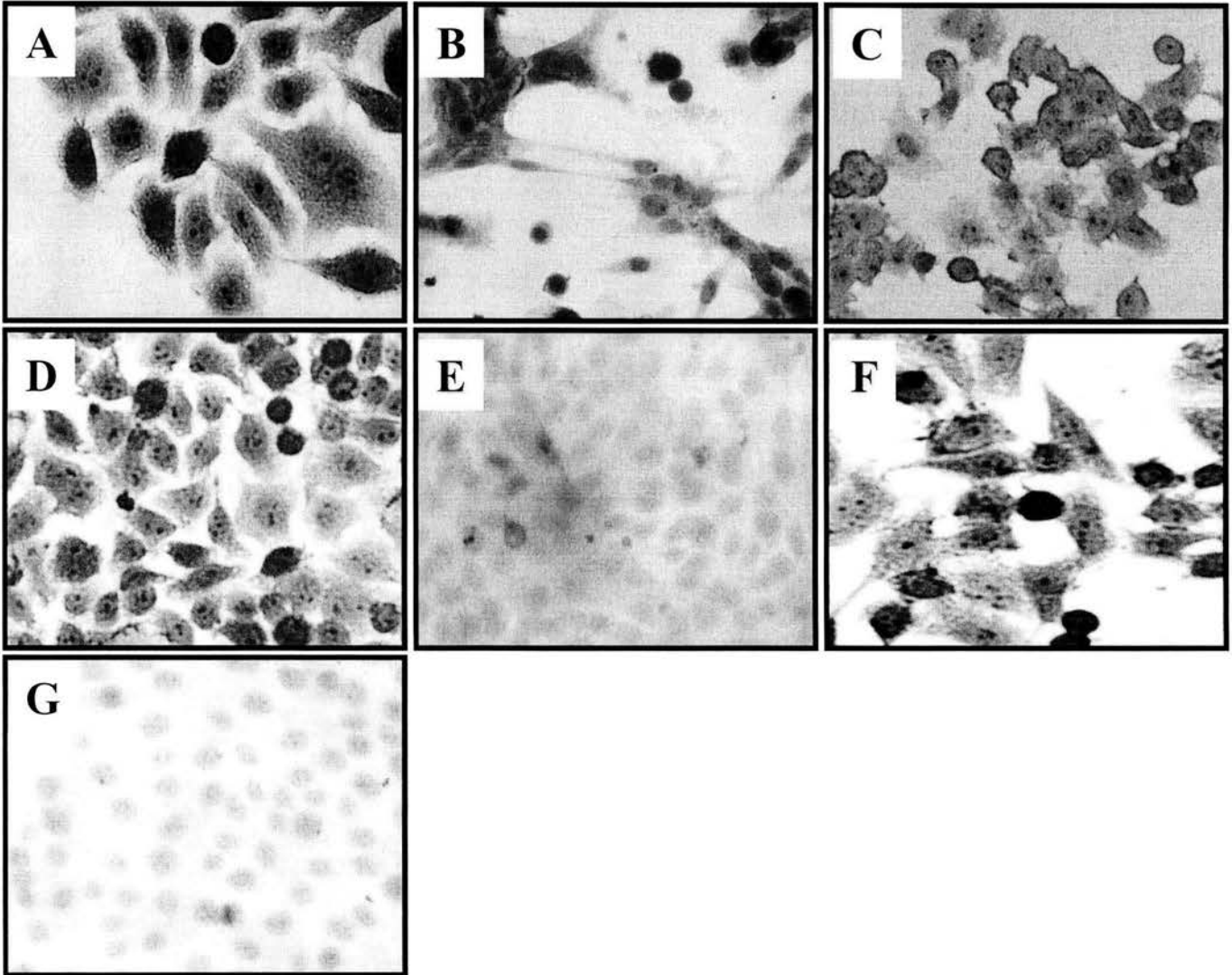


Figura 14. Localización celular de la proteína c-jun por ICQ en líneas celulares provenientes de tumores de cuello uterino. Se observó localización de la proteína principalmente en el citoplasma en las todas las líneas celulares analizadas (A) HeLa, (B) SW480, (C) SiHa, (D) CaLo, (E) HaCat y (F) C33A. Solamente en la línea (G) Caski no se detectó la presencia de la proteína c-jun. (Aumento 40X).

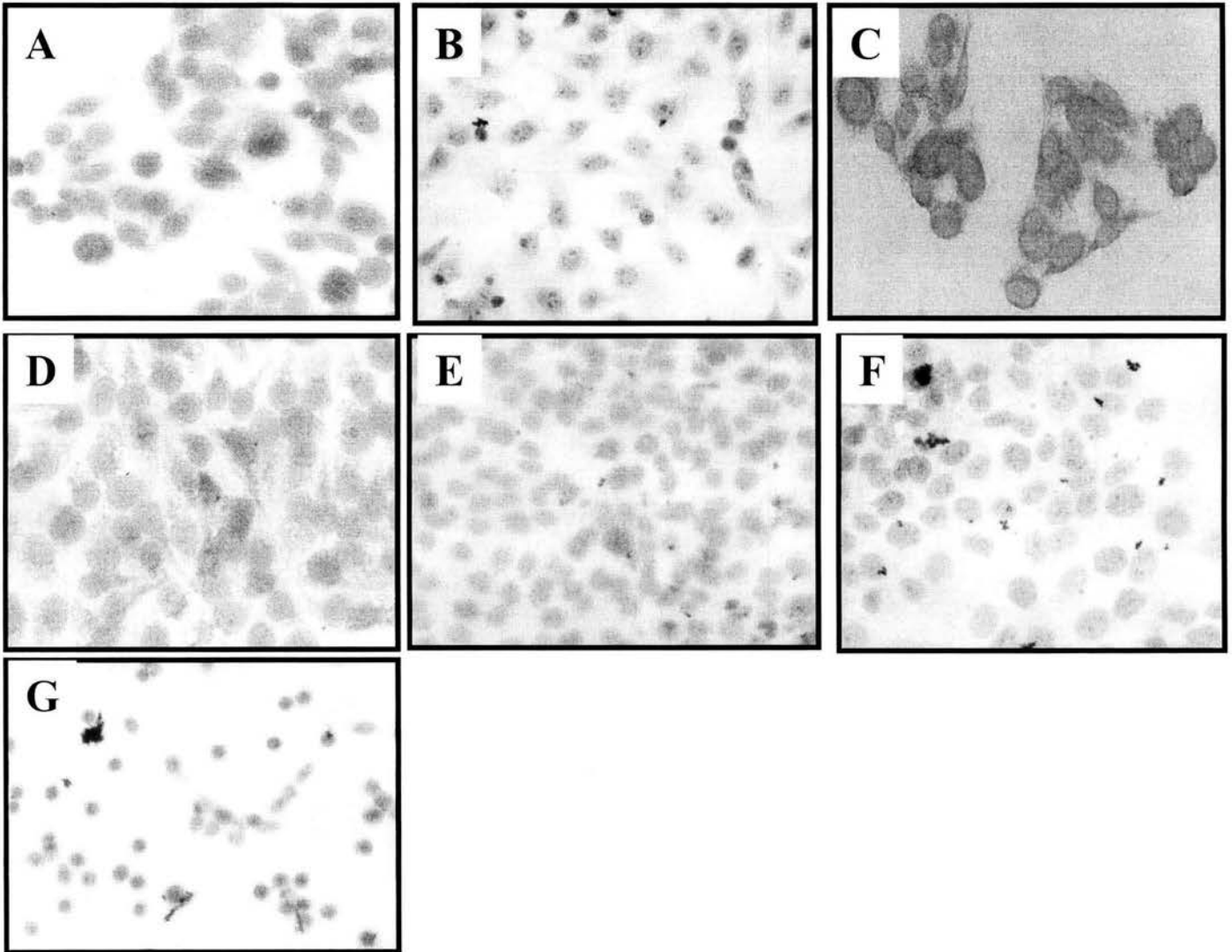
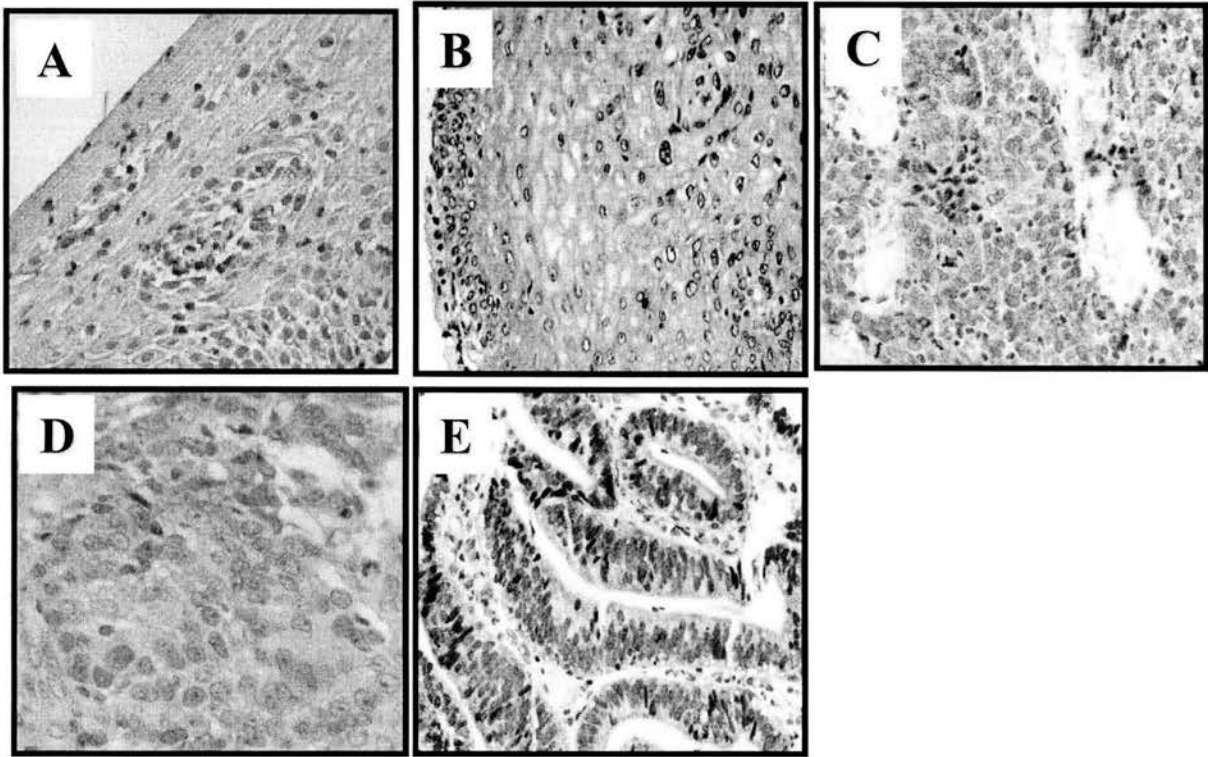


Figura 15. Localización celular de la proteína c-myc por ICQ en líneas celulares provenientes de tumores de cuello uterino. Solamente se observó localización de c-myc (citoplasmática) en las líneas celulares (A) SW480, (B) CaLo y (C) C33A. Se observó ausencia de tinción en las líneas celulares (D) HeLa, (E) HaCat, (F) Caski y (G) SiHa. (Aumento 40X).



	Citoplasma	Núcleo	Citoplasma/Núcleo
Normal (A)	61.5%	54%	31%
Lesión (B)	48%	7%	4%
Epidermoide (C)	60%	2%	2%
Adenoescamoso (D)	24%	5%	5%
Adenocarcinoma (E)	43%	5%	5%

Figura 16. Localización celular de la proteína ciclina D1 por IHQ en tejido de cérvix normal y muestras de CaCU. Se observa una localización de la proteína principalmente en el citoplasma en las muestras de cáncer invasor así como en las lesiones premalignas. En las muestras normales de cérvix además se observa una localización nuclear. (A) Epitelio normal de cérvix, (B) Lesión premaligna, (C) Carcinoma de tipo epidermoide, (D) Carcinoma adenoescamoso y (E) Adenocarcinoma. (Aumento 40X)

En los tumores de tipo epidermoide, la ciclina D1 se observó en el citoplasma en un 60% de las muestras, siendo no estadísticamente significativas las diferencias con el control. En el núcleo la inmunotinción fue de baja a ausente (Figuras 16C). En los tumores de tipo adenoescamoso, se observó a la ciclina D1 en el citoplasma en un 24% (5 de 21) ($p=0.0333$). Solamente en un caso de 21 se observó tinción nuclear de la ciclina D1 ($p=0.0021$) (Figura 16D). En los adenocarcinomas, la ciclina D1 se localizó en el citoplasma en el 43% de los casos (9 de 21) ($p=0.2897$) (Figura 16E).

6.6.3. Localización celular de la proteína fra-1 en tejido de cérvix normal, lesiones premalignas y cáncer invasor.

La presencia de fra-1 se evaluó por inmunohistoquímica en 103 muestras; la serie incluyó 13 muestras normales, 26 muestras de lesiones premalignas tanto de alto como de bajo grado, y 64 casos de cáncer invasor (34 epidermoides, 10 adenoescamosos y 20 adenocarcinomas).

Se observó una tinción homogénea en el citoplasma para fra-1 en el epitelio normal de cérvix en el 61.5% de los casos (8 de 13). Además, en el núcleo se observó una fuerte tinción en el 69% de las muestras (9 de 13) (Tabla 1) (Figura 17A y B).

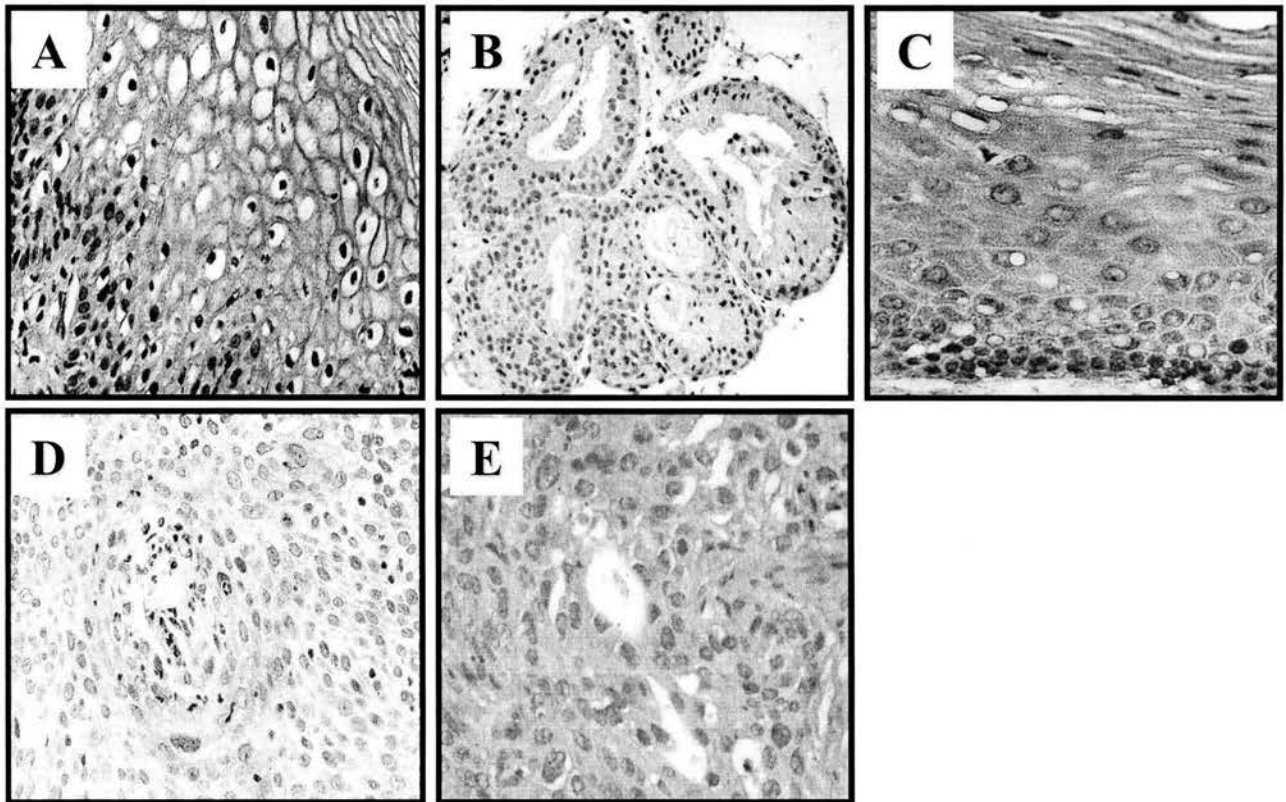
En las lesiones premalignas, la proteína fra-1 se localizó en el citoplasma en el 46% de los casos (12 de 26) ($p=0.3649$) y en el núcleo se observó solamente en dos casos de 26 ($p=0.000$) (Figura 17C).

Tabla 1. Distribución celular de las proteínas ciclina D1, fra-1, c-jun y c-myc en tejido normal, lesiones premalignas y cáncer invasor.

		CANCER INVASOR									
		Control	LIE*	<i>p</i> **	Epidermoide	<i>p</i> **	Adenoescamoso	<i>p</i> **	Adenocarcinoma	<i>p</i> **	
Ciclina D1	Localización Celular	n = 13	n = 27	<i>p</i> **	n = 53	<i>p</i> **	n = 31	<i>p</i> **	n = 27	<i>p</i> **	
	CITOPLASMA	Moderada/Fuerte	8 (61.5%)	13 (48%)	0.427	32 (60%)	0.937	5 (24%)	0.0333	9 (43%)	0.2897
	NUCLEO	Moderada/Fuerte	7 (54%)	2 (7%)	0.002	1 (2%)	0.000	1(5%)	0.002	1 (5%)	0.002
Fra-1	Localización Celular	n = 13	n = 26	<i>p</i> **	n = 34	<i>p</i> **	n = 10	<i>p</i> **	n = 20	<i>p</i> **	
	CITOPLASMA	Moderada/Fuerte	8 (61.5%)	12 (46%)	0.365	18 (53%)	0.596	5 (50%)	0.580	8 (40%)	0.2264
	NUCLEO	Moderada/Fuerte	9 (69%)	2 (8%)	0.000	13 (38%)	0.057	3 (30%)	0.619	5 (25%)	0.012
c-jun	Localización Celular	n = 12	n = 20	<i>p</i> **	n = 34	<i>p</i> **	n = 7	<i>p</i> **	n = 17	<i>p</i> **	
	CITOPLASMA	Moderada/Fuerte	9 (75%)	19 (95%)	0.098	24 (71%)	0.770	7 (100%)	0.1494	12 (71%)	0.7935
	NUCLEO	Moderada/Fuerte	5 (42%)	4 (20%)	0.187	12 (35%)	0.694	4 (57%)	0.515	6 (35%)	0.728
c-myc	Localización Celular	n = 12	n = 15	<i>p</i> **	n = 30	<i>p</i> **	n = 7	<i>p</i> **	n = 14	<i>p</i> **	
	CITOPLASMA	Moderada/Fuerte	3 (25%)	6 (40%)	0.411	14 (47%)	0.196	1 (14%)	0.5805	4 (29%)	0.8378
	NUCLEO	Moderada/Fuerte	7 (58%)	8 (53%)	0.795	5 (17%)	0.007	3 (43%)	0.515	7 (50%)	0.671

* LIE: Lesión intra-epitelial

** Prueba exacta de Fisher. El valor de *p* de cada grupo es el resultado de su comparación con el grupo control.



	Citoplasma	Núcleo	Citoplasma/Núcleo
Normal (A, B)	61.5%	69%	46%
Lesión (C)	46%	8%	5%
Epidermoide (D)	53%	38%	24%
Adenoescamoso (E)	50%	30%	30%
Adenocarcinoma	40%	25%	25%

Figura 17. Localización celular de la proteína fra-1 por IHQ en muestras normales de cérvix y de CaCU. Se observó principalmente una localización citoplasmática de la proteína, aunque con una disminución en el núcleo comparado con las muestras normales. (A) y (B) Epitelio normal de cérvix, (C) Lesión premaligna, (D) Carcinoma de tipo epidermoide y (E) Carcinoma adenoescamoso. (Aumento 40X)

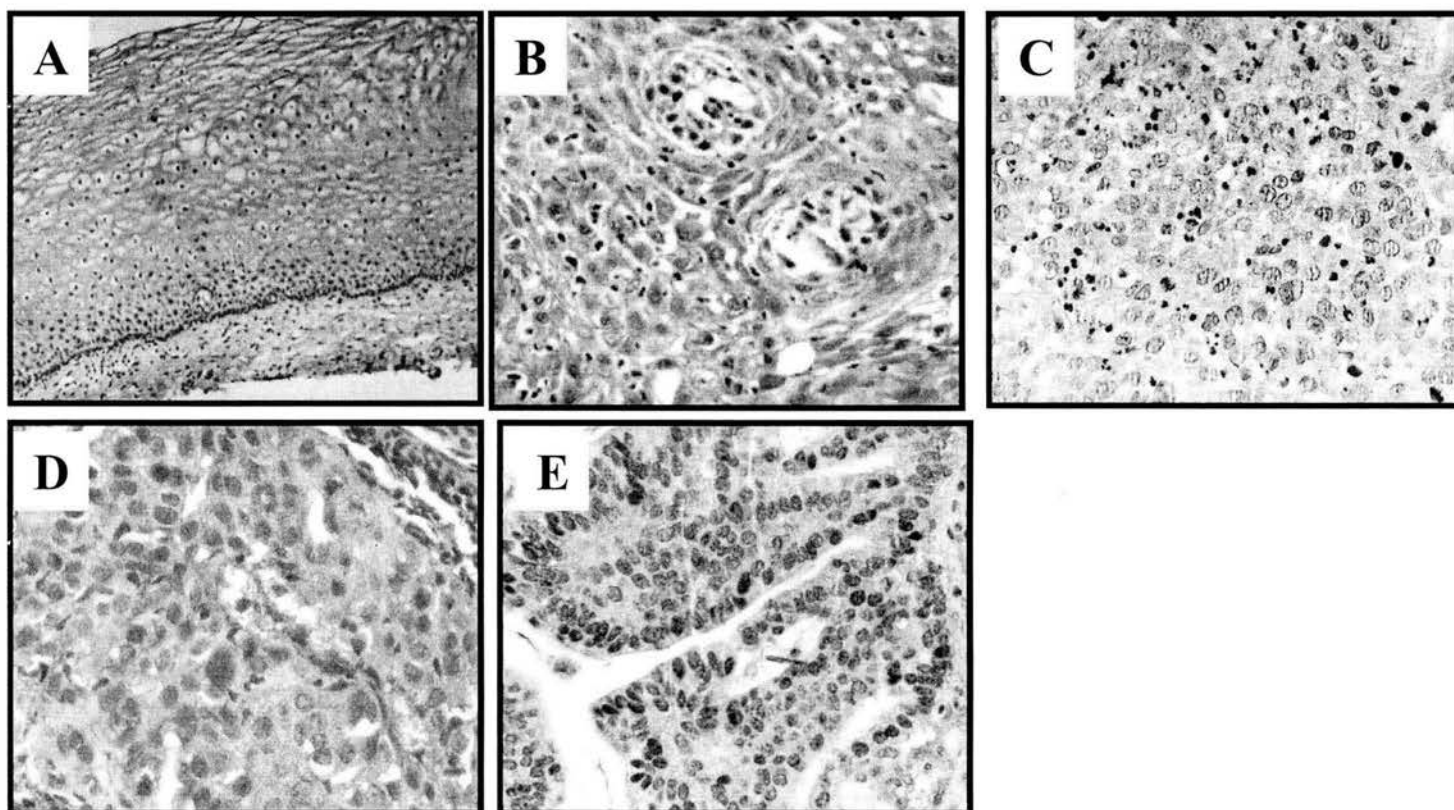
En los tumores de tipo epidermoide, la presencia de fra-1 se observó en el 53% de los casos (18 de 34 casos) en el citoplasma ($p=0.5959$), y en el 38% de los casos (13 de 34) en el núcleo ($p=0.0568$) (Figura 17D). En el carcinoma adenoescamoso, la localización de fra-1 se localizó en el citoplasma en el 50% de los casos (5 de 10) ($p=0.5800$), y en el núcleo en el 30% de los casos (3 de 10) ($p=0.0619$) (Figura 17E). En los tumores de tipo adenocarcinoma, la presencia de fra-1 se observó en el 40% de los casos en el citoplasma (8 de 20) ($p=0.2264$), y en el núcleo en un 25% de los casos (5 de 20) ($p=0.0120$). La proteína fra-1 se observó en algunos casos en el citoplasma en la capa superficial mientras que en el núcleo en las células basales.

6.6.4. Localización celular de la proteína c-jun en tejido de cérvix normal, lesiones premalignas y cáncer invasor.

La presencia de la proteína c-jun se evaluó por inmunohistoquímica en 90 muestras; la serie incluyó 12 muestras normales, 20 muestras de lesiones premalignas tanto de alto como de bajo grado, y 58 casos de cáncer invasor (34 epidermoides, 7 adenoescamosos y 17 adenocarcinomas).

Una distribución homogénea se observó en el citoplasma en el tejido normal en un 75% de los casos (9 de 12) y en el núcleo en un 42% de los casos (5 de 12) (Tabla 1) (Figura 18A).

En las lesiones premalignas, c-jun se observó principalmente en el citoplasma en un 95% de los casos (19 de 20) ($p=0.0977$); sin embargo, se observó tinción nuclear en pocas muestras: 4 de 20 ($p=0.1869$) (Figura 18B).



	Citoplasma	Núcleo	Citoplasma/Núcleo
Normal (A)	75%	42%	25%
Lesión (B)	95%	20%	20%
Epidermoide (C)	71%	35%	27%
Adenoescamoso (D)	100%	57%	71%
Adenocarcinoma (E)	71%	35%	35%

Figura 18. Localización celular de la proteína c-jun por IHQ en muestras de cérvix normal y de CaCU. Se observó una localización de la proteína principalmente en el citoplasma en todas las muestras evaluadas, con una reducción en la localización nuclear en todas excepto en el carcinoma adenoescamoso. (A) Tejido normal, (B) Lesión premaligna, (C) Carcinoma de tipo epidermoide, (D) Carcinoma adenoescamoso y (E) adenocarcinoma. (Aumento 40X).

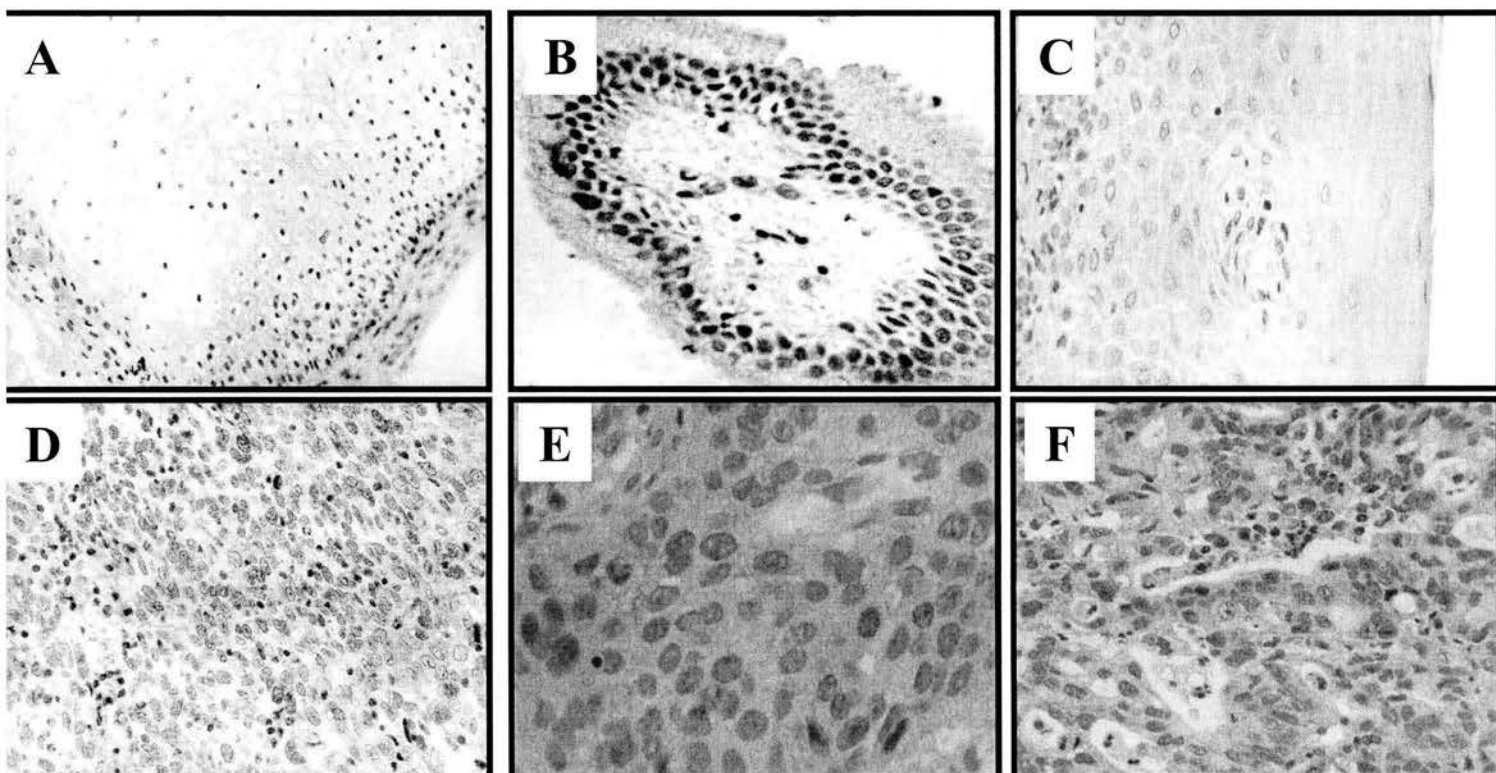
En los tumores de tipo epidermoide, la presencia de c-jun se observó en el 71% de los casos (24 de 34) en el citoplasma ($p=0.7704$) y en un 35% de las muestras (12 de 34) en el núcleo ($p=0.6942$) (figura 18C). En los tumores de tipo adenoescamoso, la localización de c-jun se observó principalmente en el citoplasma en 100% de los casos ($p=0.1494$) y en el núcleo en el 57% de los casos (4 de 7) ($p=0.5146$) (Figura 18D). En los adenocarcinomas, la localización de c-jun se observó en el citoplasma en el 71% de los casos (12 de 17) ($p=0.7935$), así como en el núcleo en el 35% de los casos (6 de 17) ($p=0.7276$) (Figura 18E).

6.6.5. Localización celular de la proteína c-myc en tejido de cérvix normal, lesiones premalignas y cáncer invasor.

La presencia de la proteína c-myc fue evaluada por inmunohistoquímica en 78 muestras; la serie incluyó 12 muestras normales, 15 muestras de lesiones premalignas tanto de alto como de bajo grado, y 51 casos de cáncer invasor (30 epidermoides, 7 adenoescamosos y 14 adenocarcinomas).

Una distribución homogénea se observó en el citoplasma en el tejido normal en el 25% de los casos (3 de 12) y en el núcleo en el 58% de las muestras (7 de 12) (Figura 19A y B) (Tabla 1).

En las lesiones premalignas, la proteína c-myc se observó tanto en el citoplasma en un 40% de los casos (6 de 15) ($p=0.4113$), como en el núcleo en un 53% de las muestras (8 de 15) ($p=0.7950$) (Figura 19C).



	Citoplasma	Núcleo	Citoplasma/Núcleo
Normal (A y B)	25%	58%	8%
Lesión (C)	40%	53%	27%
Epidermoide (D)	47%	17%	7%
Adenoescamoso (E)	14%	43%	0%
Adenocarcinoma (F)	29%	50%	7%

Figura 19. Localización celular de la proteína c-myc por IHQ, en tejido de cérvix normal y muestras de CaCU, donde predominó una localización citoplasmática y nuclear. (A) y (B) Epitelio normal de cérvix, (C) Lesión premaligna, (D) Carcinoma de tipo epidermoide, (E) Carcinoma adenoescamoso y (F) adenocarcinoma. (Magnificación 40X).

En los tumores de tipo epidermoide, la presencia de c-myc se observó en el 47% de los casos (14 de 30) en el citoplasma ($p=0.1963$) y en el 17% de las muestras (5 de 30) en el núcleo ($p= 0.0069$) (figura 19D). En los tumores de tipo adenoescamoso, la localización de c-myc se observó solamente en un 14% en el citoplasma ($p=0.5805$), y en el núcleo en el 43% de los casos (3 de 7) ($p=0.5146$) (Figura 19E). En los adenocarcinomas, la localización de c-myc se observó en el citoplasma en el 29% de los casos (4 de 14) ($p=0.8378$), así como en el núcleo en un 50% de los casos (7 de 14) ($p=0.6709$) (Figura 19F).

El análisis por WB de algunas de las muestras evaluadas por IHQ reportó que para las proteínas ciclina D1 y fra-1, los niveles de proteína fueron significativamente más altos en los tumores comparados con las muestras normales de cérvix. En contraste, los niveles de la proteína c-myc se observaron disminuidos en los tumores. No se observaron cambios en los niveles de la proteína c-jun.

6.7. Análisis de la localización de las ciclinas E, A y B1 en líneas celulares y lesiones premalignas y tumores de cuello uterino

6.7.1. Localización celular de las proteínas ciclina E, A y B1 en líneas celulares

Se evaluó en líneas celulares derivadas de tumores de cérvix, la localización de las ciclinas E, A y B1 por ICQ. Se observó una fuerte localización citoplasmática de ciclina E en las líneas celulares CaLo, MCF-7, HaCat, SW480, y Caski, y una tinción citoplasmática débil en las líneas HeLa, C33A y SiHa (Figura 20). La ciclina A, se localizó en el citoplasma y en el núcleo en las líneas MCF-7, C33A, HaCat, CaLo, Caski, y SiHa. En las líneas celulares SW480 y HeLa no se observó tinción para esta proteína (Figura 21). La ciclina B1

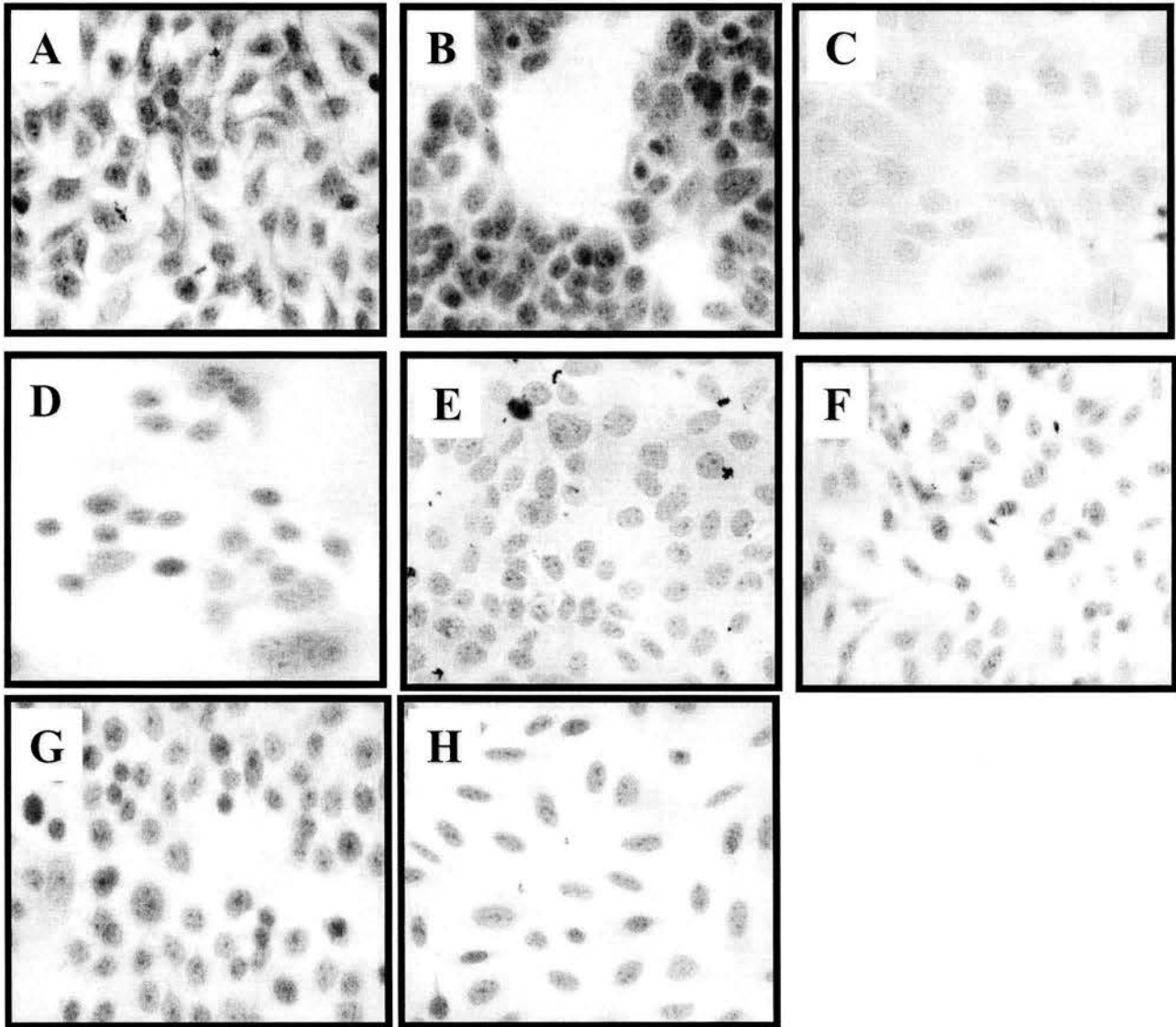


Figura 20. Localización celular de la proteína ciclina E por ICQ en líneas celulares provenientes de tumores de cuello uterino. En las líneas celulares (A) CaLo, (B) MCF-7, (C) HaCat, (D) SW480 y (E) Caski se observó localización en el citoplasma; sin embargo, en las líneas (F) HeLa, (G) C33A y (H) SiHa la tinción fue tenue. (Aumento 40X).

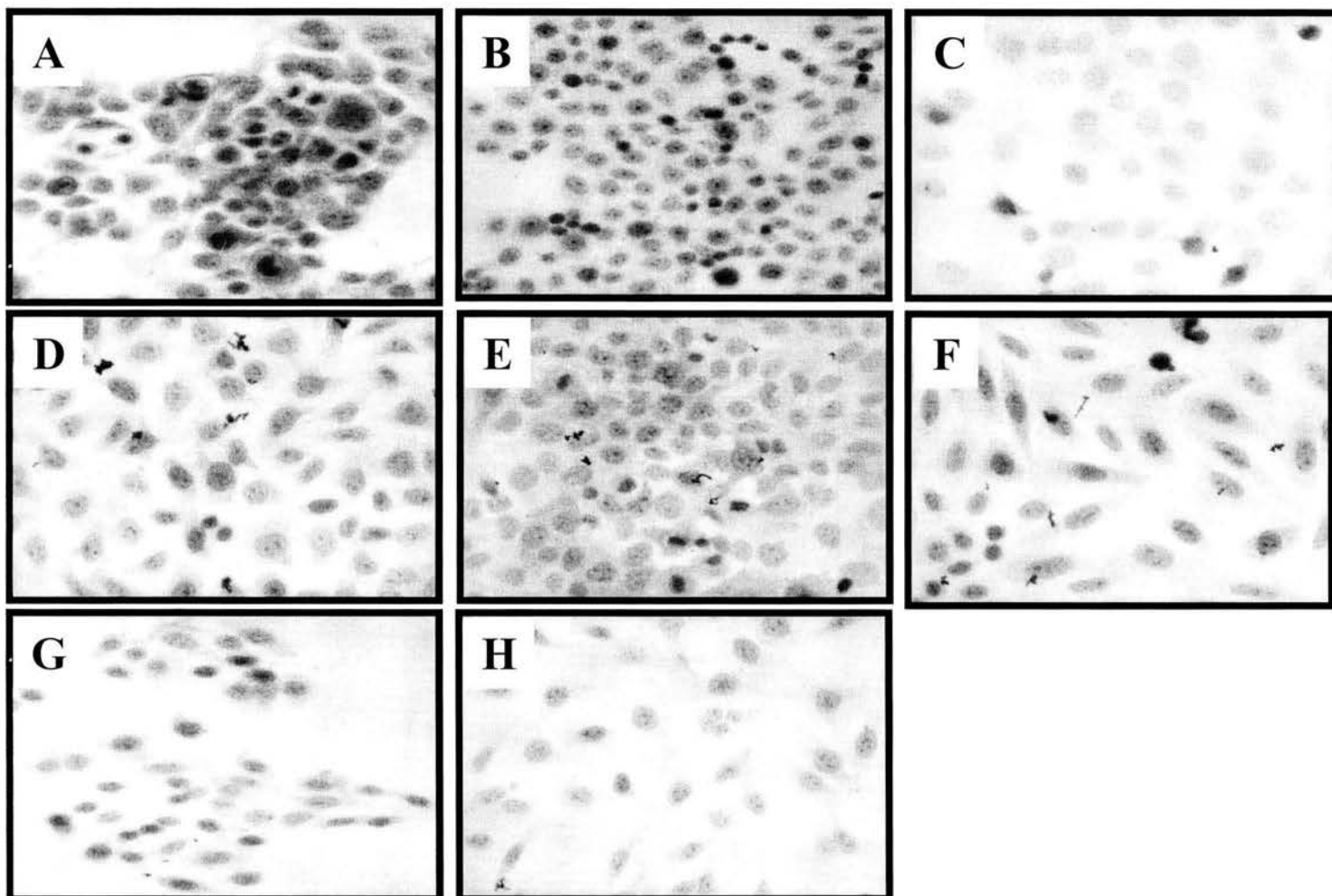


Figura 21. Localización celular de la proteína ciclina A por ICQ en líneas celulares provenientes de tumores de cuello uterino. Se observó localización de la proteína tanto en el citoplasma como en el núcleo en las líneas celulares (A) MCF-7, (B) C33A, (C) HaCat, (D) CaLo, (E) Caski y (F) SiHa. En las líneas (G) SW480 y (H) HeLa, no se observó tinción para ciclina A. (Aumento 40X).

se localizó tanto en el citoplasma como en el núcleo en todas las líneas celulares analizadas (Figura 22). El análisis por WB mostró que los niveles de la proteína ciclina E se observaron disminuidos en las líneas celulares de CaCU comparado con la línea normal HaCat. Los niveles de la proteína ciclina A no se observaron cambios en los niveles.

6.7.2. Localización celular de las proteínas ciclina E y A en tejido de cérvix normal, lesiones premalignas y tumores de cuello uterino

Se evaluó la distribución celular de las ciclinas en 62 muestras por inmunohistoquímica. La serie incluyó 12 muestras normales, 15 muestras de lesiones premalignas tanto de alto como de bajo grado, y 35 casos de cáncer invasor (16 epidermoide, 8 adenoescamosos y 11 adenocarcinomas) (Tabla 2).

En el epitelio normal, se observó una reactividad positiva para ciclina E en el núcleo en las células superficiales en el 63% de las muestras y en el citoplasma en las células basales en un 37% (Figura 23A). La ciclina A se observó en el núcleo en un 33% de las muestras, no se observó tinción citoplasmática para esta ciclina (Figura 24A).

Por otra parte, en la mayoría de las lesiones premalignas la ciclina E se localizó en el citoplasma en el 73% ($p=0.1102$) y en el núcleo en un 27% de las muestras (4 de 15). Una tenue inmunoreactividad de la proteína ciclina A fue observada en el citoplasma; sin embargo en el núcleo se observó en un 29% de las muestras de lesiones precursoras ($p=2689$) (Figura 24B).

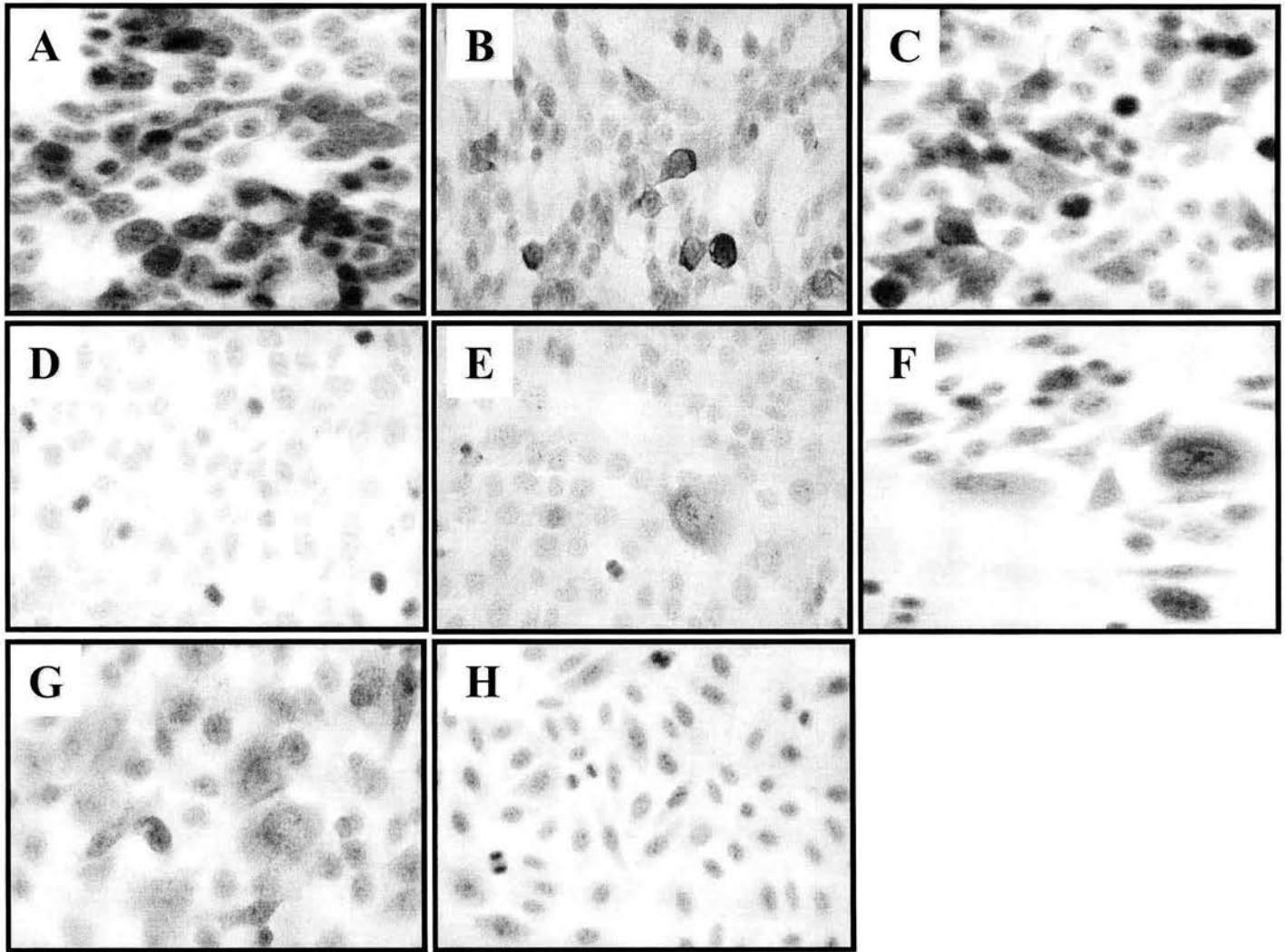


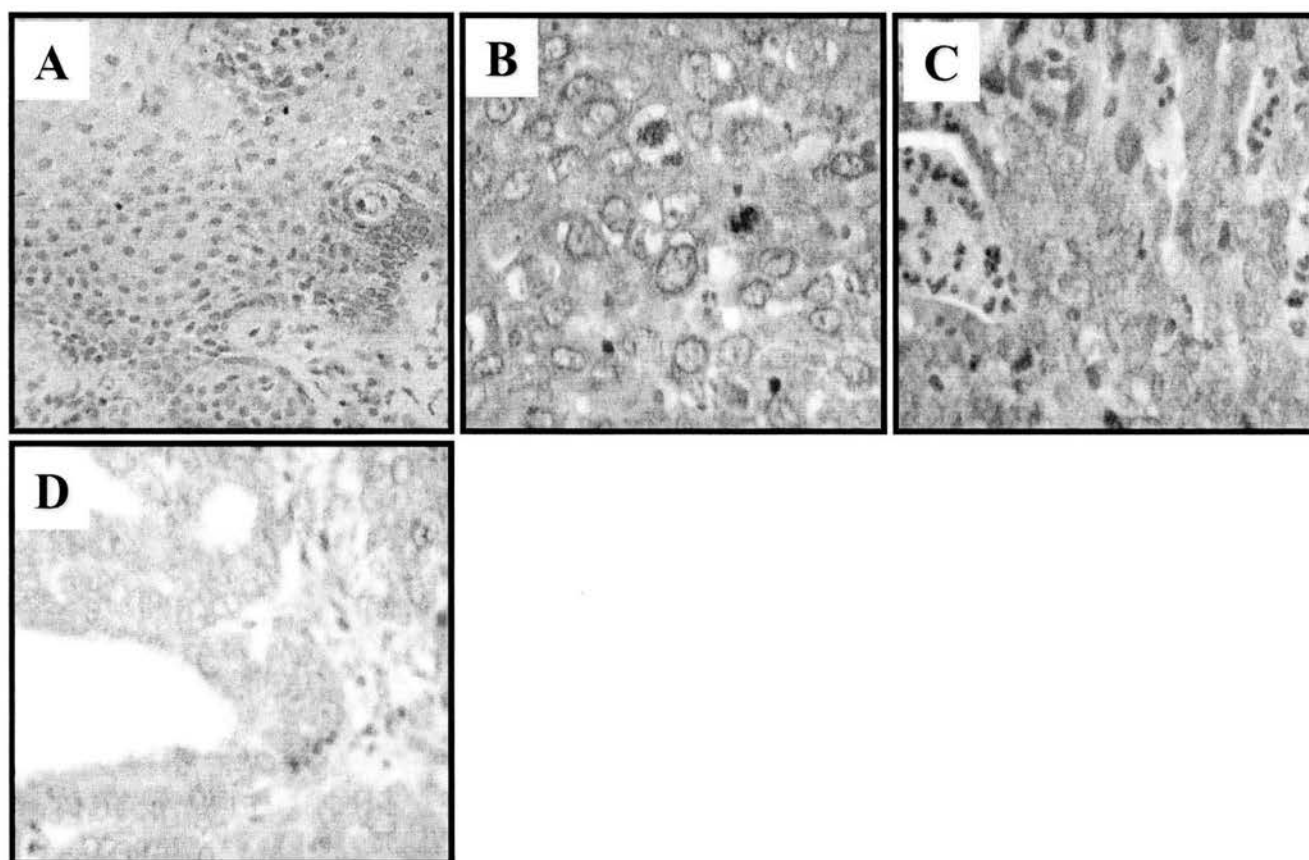
Figura 22. Localización celular de la proteína ciclina B1 por ICQ en líneas celulares provenientes de tumores de cuello uterino. Se observó localización de la proteína tanto en el citoplasma como en el núcleo en todas las líneas celulares analizadas (A) MCF-7, (B) HeLa, (C) CaLo, (D) Caski, (E) HaCat, (F) SW480, (G) C33A y (H) SiHa. (Aumento 40X).

Tabla 2. Distribución celular de las ciclinas E y A en tejido normal, lesiones premalignas y cáncer invasor.

		CANCER INVASOR									
		Control	LIE*		Epidermoide		Adenoescamoso		Adenocarcinoma		
Localización Celular	Inmunotinción	n = 8	n = 15	<i>p</i> **	n = 13	<i>p</i> **	n = 8	<i>p</i> **	n = 10	<i>p</i> **	
Ciclina E	CITOPLASMA	Moderada/Fuerte	3 (37%)	11 (73%)	0.110	3 (50%)	0.090	7 (88%)	0.0594	9 (90%)	0.0317
	NUCLEO	Moderada/Fuerte	5 (63%)	4 (27%)	0.110	0	0.000	0	0.000	1 (10%)	0.0317
<hr/>											
		Control	LIE*		Epidermoide		Adenoescamoso		Adenocarcinoma		
Localización Celular	Inmunotinción	n = 12	n = 14	<i>p</i> **	n = 16	<i>p</i> **	n = 8	<i>p</i> **	n = 11	<i>p</i> **	
Ciclina A	CITOPLASMA	Moderada/Fuerte	0	1 (7%)	0.539	0	0.000	1 (12%)	0.4000	0	0
	NUCLEO	Moderada/Fuerte	4 (33%)	4 (29%)	0.269	7 (44%)	0.577	4 (50%)	0.435	9 (82%)	0.026

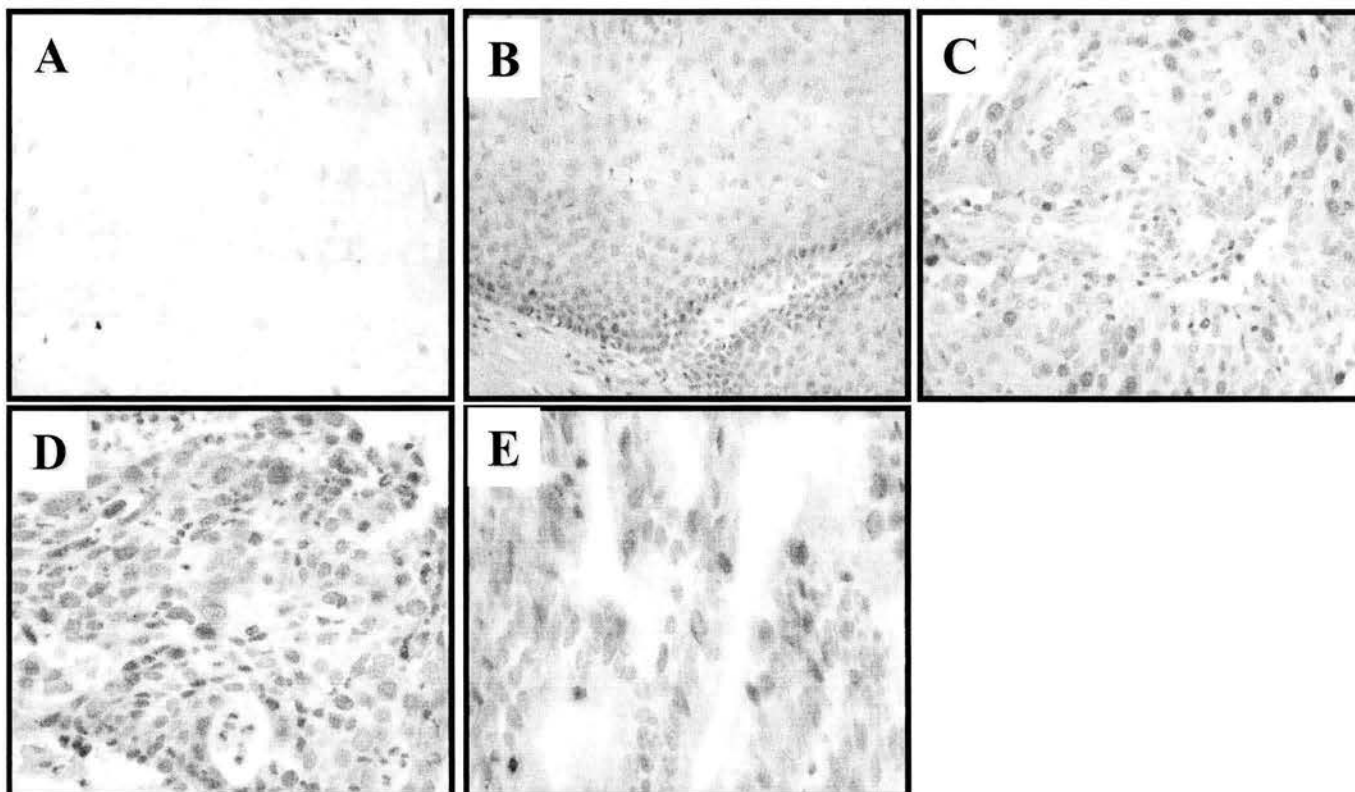
* LIE: Lesión intra-epitelial

** Prueba exacta de Fisher. El valor de p de cada grupo es el resultado de su comparación con el grupo control.



	Citoplasma	Núcleo	Citoplasma/Núcleo
Normal (A)	37%	63%	37%
Lesión	73%	27%	27%
Epidermoide (B)	77%	0%	0%
Adenoescamoso (C)	88%	0%	0%
Adenocarcinoma (D)	90%	10%	10%

Figura 23. Localización celular de la proteína ciclina E por IHQ en muestras de cérvix normal y de CaCU. Se observa un aumento en la localización citoplasmática, con pérdida de expresión de la proteína en núcleo, en las lesiones premalignas y cáncer invasor. (A) Epitelio normal de cérvix, (B) Carcinoma de tipo epidermoide, (C) Carcinoma adenoescamoso y (D) Adenocarcinoma. (Aumento 40X).



	Citoplasma	Núcleo	Citoplasma/Núcleo
Normal (A)	0%	33%	0%
Lesion (B)	7%	29%	0%
Epidermoide (C)	0%	44%	0%
Adenoescamoso (D)	12%	50%	0%
Adenocarcinoma (E)	0%	82%	0%

Figura 24. Localización celular de la proteína ciclina A por IHQ en muestras de cérvix normal y de CaCU. La localización de esta proteína se mantuvo en el núcleo sin observarse cambios significativos en el citoplasma en todas las muestras analizadas. (A) Epitelio normal de cérvix, (B) Lesión premaligna, (C) Carcinoma de tipo epidermoide, (D) Carcinoma adenoescamoso y (E) Adenocarcinoma. (Aumento 40X)

En los tumores de tipo epidermoide, la ciclina E fue observada en el citoplasma en un 77% de las muestras, aunque no hubo diferencias estadísticas significativas (Figura 23B). En el núcleo la inmunotinción estuvo ausente. La proteína ciclina A se observó en el núcleo en un 44% (7 de 16) ($p=0.5765$) (Figura 24C). En los tumores de tipo adenoescamoso, las proteínas ciclina E y A se observaron localizadas en el citoplasma en un 88% ($p=0.0594$) y 12% (1 de 8) ($p=0.4000$), respectivamente. No se observó tinción nuclear para la ciclina E, pero sí para la proteína ciclina A en el 50% de las muestras (Figuras 23C y 24D). En los adenocarcinomas, la ciclina E se localizó principalmente en el citoplasma en todas las muestras analizadas (90%) (Figura 23D). Se observó tinción nuclear en pocos casos para la ciclina E (1 caso de 10). La ciclina A se localizó únicamente en el núcleo en el 82% de las muestras de estos tumores (9 de 11) ($p=0.0260$) (Figura 24E).

7. DISCUSION

Entre las características que distinguen a un tumor se incluyen alteraciones en las uniones célula-célula está mediada por las moléculas de adhesión [136]. La β -catenina es una de las cateninas asociadas directamente al dominio citoplasmático de E-caderina y su interacción es esencial para el adecuado anclaje al citoesqueleto y necesaria para la función de unión por parte de la E-caderina.

El propósito de este trabajo se basó en determinar las alteraciones de los componentes del complejo E-caderina/ β -catenina en las diferentes etapas de la transformación neoplásica en el CaCU, y a la vez si estas alteraciones se deben a la activación de la vía Wnt y/o a alteraciones en la E-caderina como miembro del complejo de adhesión celular. Para ello analizamos la presencia y localización de estas dos proteínas en muestras de tejido epitelial normal así como en lesiones premalignas y en una serie de tumores de CaCU (epidermoide, adenoescamoso y adenocarcinoma). A la vez evaluamos la localización de genes blanco de la vía Wnt/ β -catenina en algunas de las muestras anteriormente mencionadas y su relación con el VPH.

En tejido de cérvix normal, la β -catenina y la E-caderina se observaron localizadas en la membrana de las células que conforman las capas basales y parabasales del epitelio, reafirmando su función como moléculas de adhesión celular. Sin embargo, en las lesiones premalignas de cérvix, las proteínas β -catenina y E-caderina mostraron un patrón de localización heterogénea que se reflejó tanto en la membrana como en el citoplasma, aunque en la E-caderina se observó principalmente una disminución de la proteína en la

membrana celular (40% de las muestras evaluadas). Existe controversia con los trabajos publicados previamente hechos en lesiones premalignas de cérvix con respecto a la proporción de la E-caderina en la membrana, ya que puede estar ausente a disminuida la proteína [124, 125], o bien permanecer en la membrana celular sin cambios (NIC I/II, 36 casos [126], NIC III, 20 casos [137]). Además, se ha reportado una distribución heterogénea de la E-caderina en el citoplasma que abarca casi todas las capas del epitelio [126, 137].

En las muestras de cáncer invasor de cuello uterino, además de la localización membranal esperada, observamos una localización anormal en el citoplasma tanto de la E-caderina como de la β -catenina en la mayoría de las muestras, pero no hubo localización nuclear. En el CaCU, sin embargo, estudios previos han reportado una pérdida de la expresión membranal de la E-caderina [126, 138], o un incremento en la localización citoplasmática de esta proteína [124], aunque también se ha observado localización membranal con poca localización citoplasmática [137]. En el caso de la β -catenina, se ha reportado localización alterada en el citoplasma/núcleo en los tumores de tipo epidermoide [130] y en los adenocarcinomas [125], y una reducción de la expresión de la proteína en la membrana en tumores de cuello uterino [127]. Sin embargo, en los tumores de tipo adenoescamoso no se ha reportado nada con respecto a la localización de las proteínas β -catenina y E-caderina, quizás debido al bajo porcentaje en el que este tipo de tumor se presenta. La presencia de estas proteínas en el citoplasma podría estar relacionada con un fenotipo maligno en las células epiteliales de CaCU. Se ha propuesto que la expresión citoplasmática de la β -

catenina y la E-caderina representan el paso intermedio desde el sitio de síntesis hacia la membrana celular.

La pérdida de las interacciones célula-célula en el carcinoma de cérvix puede ser importante para promover la invasión y progresión tumoral. Previamente se ha reportado que la expresión reducida del complejo E-caderina/catenina está asociada con un pobre pronóstico en algunos tumores como gástrico [139], mama [140] esófago [141], vejiga [142] y colorectal [143]. Sin embargo, en CaCU no se ha encontrado valor pronóstico a la disminución en la expresión o alteración en la localización de las proteínas β -catenina y E-caderina, debido a la expresión heterogénea de estas proteínas en estos tumores.

En el epitelio normal de cérvix, la expresión de la β -catenina en la membrana es alta, comparada con el cáncer, donde su expresión es a menudo reducida o aberrante con una localización citoplasmática y/o nuclear. Una correlación entre la localización nuclear y las mutaciones en el exón 3 del gen CTNNB1 de β -catenina ha descrito principalmente en el cáncer colorectal así como en otros tumores de tipo epitelial [144-146]. En este estudio, la translocación nuclear en CaCU no se observó como un evento frecuente a diferencia de lo que se ha visto en otros tumores. Nosotros no encontramos mutaciones en el exón 3 del gen CTNNB1 en ninguna de las 40 muestras analizadas, las cuales tenían una localización alterada de la β -catenina en citoplasma. En trabajos recientes se ha estudiado la relación entre el CaCU y las mutaciones en el gen de β -catenina, y aunque algunos reportan que es un evento común [128], otros lo han reportado como un evento poco frecuente [123, 145].

Además, mutaciones en el gen de β -catenina se han reportado para el exón 3, en el extremo amino terminal, y no en los sitios de unión a E-caderina.

Por algunos experimentos se sabe que los niveles de E-caderina pueden afectar la señalización nuclear de β -catenina. Dado que la similitud en los mecanismos de unión entre los complejos caderina/ β -catenina y β -catenina/Tcf, se propuso que la E-caderina es un inhibidor de la señalización nuclear de β -catenina, no solamente porque secuestra la β -catenina que va al núcleo, sino porque compite directamente con el Tcf por el sitio de unión en β -catenina [147].

La estabilización de la β -catenina en el citoplasma se puede deber a varios eventos, como mutaciones en el gen de APC, mutaciones en el gen de β -catenina (exón 3), presencia concomitante de ligandos Wnt y sus receptores y defectos en la cinasa GSK3 β , entre otros [148, 149]. Alternativamente, APC puede competir por el sitio de unión con las caderinas por la β -catenina y además APC ha sido encontrada colocalizada en las uniones adherentes. Utilizando sus múltiples sitios de unión a las cateninas, APC puede facilitar la transferencia de la caderina de una a otra catenina. Además, APC modula la actividad de la β -catenina, ya que su unión permite que la β -catenina sea fosforilada por la GSK3 β y la marca para su degradación en el proteosoma. La proteína APC también actúa como exportador nuclear de la β -catenina, sin embargo hasta el momento no está muy claro este mecanismo. En contraposición, es claro que APC inhibe la interacción del complejo β -catenina/Tcf/Lef, pero se pierde esta acción cuando el gen de APC está mutado [150, 151].

En el caso de la E-caderina, la pérdida o la disminución de su expresión en el cáncer puede deberse a las mutaciones en el gen CDH1, aunque se ha reportado que este es un evento poco frecuente en ciertas neoplasias [34, 152].

Varios mecanismos modulan la adhesión dependiente de las caderinas. Las caderinas se asocian a la β -catenina inmediatamente después de la biosíntesis (en el retículo endoplásmico), y las dos proteínas van juntas hacia la superficie celular, donde se asocian con la α -catenina [57]. La falla de las caderinas para asociarse con la β -catenina permite su retención en el retículo endoplásmico y degradación [20]. La formación de las uniones adherentes es además afectada por la fosforilación [153, 41]. Por ejemplo, la fosforilación de los residuos de serinas en la región citoplasmática de la caderina por las cinasas CK II y GSK3 β incrementa la afinidad de la caderina por la β -catenina [41]. En contraste, cuando la β -catenina es fosforilada en residuos de tirosinas, la asociación con la E-caderina se pierde [45]. Además se ha observado un rompimiento por metaloproteinasas (MMP-3 y 7) de la proteína E-caderina en el dominio transmembranal o en el dominio citoplasmático, lo que podría llevar a una localización en citoplasma de la proteína [52].

Estos resultados revelan aspectos importantes de la regulación y función de la β -catenina en el desarrollo del CaCU. La estabilización de la β -catenina en el citoplasma se debe en parte a que no es fosforilada en el amino terminal por la GSK3 β , lo que lleva a la vez a una translocación nuclear donde se asocia con una familia de factores de transcripción. El complejo β -catenina/Tcf/lef activa la transcripción de genes blanco como ciclina D1 en cáncer de colon y mama; c-myc en cáncer de colon; y miembros de la familia AP-1 (fra-1 y

c-jun) en cáncer de colon. Estudios previos, han observado a la proteína β -catenina alterada con una localización citoplasmática/nuclear. Estos estudios no han demostrado que la β -catenina en esta neoplasia activa la transcripción de genes blanco previamente reportados para otros carcinomas como colon y hepatocarcinoma [99, 128, 130]. Sin embargo, aunque en nuestras muestras de CaCU no observamos acumulación de la β -catenina en el núcleo, si se observó actividad transcripcional de β -catenina en líneas celulares de CaCU (HeLa, Caski, SiHa). Investigamos además si la acumulación alterada de β -catenina está asociada con un incremento en los niveles de expresión de las proteínas ciclina D1, fra-1, c-jun y c-myc en muestras de CaCU como ha sido reportado en las líneas celulares. Además, se evaluó la desregulación *in vivo* de estos genes blanco que codifican para las proteínas ciclina D1, fra-1, c-jun y c-myc, en muestras de tumores de cuello uterino donde β -catenina está localizada anormalmente en el citoplasma. Finalmente, evaluamos a las ciclinas E y A y correlacionamos su presencia con el tipo de VPH.

En general, se encontró una disminución de la localización nuclear (normal) de las proteínas ciclina D1 y fra-1, que se reportó significativa tanto en las lesiones premalignas como en el cáncer invasor. Además no encontramos una correlación significativa entre la localización alterada en el citoplasma de β -catenina con la expresión de estos genes celulares. No hubo diferencias significativas en la expresión de las proteínas c-jun y c-myc en las muestras analizadas. Nosotros creemos que este tipo de estudio es importante para elucidar los eventos moleculares involucrados en la tumorigénesis del cérvix, puesto que las observaciones *in vitro* pueden no necesariamente reflejar los cambios *in vivo* que ocurren en los tumores humanos. En efecto, los resultados encontrados en este estudio

demuestran que la aberrante expresión de la β -catenina en el CaCU está asociada con una elevada expresión de las proteínas ciclina D1 y fra-1 pero no así de c-myc y c-jun. Estudios previos han encontrado incremento en la expresión de las proteínas ciclina D1 y fra-1 pero no de c-myc en tumores de colon [154]. Chan TA *et al* en el 2002, reportaron que la expresión de los genes c-myc y ciclina D1 no cambia en varios ratones knockout en líneas celulares de cáncer de colon, sugiriendo que la regulación de estos genes en estas líneas celulares no es dependiente de la β -catenina bajo las condiciones probadas o no son los blancos fisiológicos. Sin embargo, es posible que estos genes sean mediadores críticos de la función de la β -catenina bajo condiciones *in vivo* únicamente [155].

En este estudio, la expresión de la ciclina D1 se observó disminuida a ausente en el núcleo de la mayoría de las muestras analizadas. Esto es consistente con lo reportado en lesiones intraepiteliales epidermoide y glandular, y carcinomas de tipo epidermoide y adenocarcinoma [156-158]. La proteína ciclina D1 ha sido hallada sobreexpresada en los tumores [159] y se presume que juega un papel en la transformación neoplásica. Sin embargo, los niveles de ciclina D1 han sido encontrados disminuidos en tumores de cérvix comparado con el epitelio normal de cérvix [160]. En este estudio solamente se encontró aumentada en 3 muestras de todos los grupos analizados. Previamente se ha sugerido que la ciclina D no está requerida para la progresión de G1 en células transformadas por VPH [161], ya que la unión de E7 de VPH a pRb permite la liberación del factor de transcripción E2F y por lo tanto ya no sería requerida la función del complejo ciclina D/CDK4/6.

Por otra parte, se observó la presencia de la proteína ciclina E únicamente en las lesiones premalignas (33%) y en los adenocarcinomas (17%), lo que nos podría sugerir una desregulación en el ciclo celular, coincidiendo con lo encontrado en neoplasias intraepiteliales glandulares y adenocarcinomas de cérvix [156] y en lesiones intraepiteliales epidermoides donde la ciclina E se localiza en las células superficiales y parabasales y en las lesiones de bajo grado en las células intermedias [157]. Sin embargo, la sobreexpresión de ciclina E se ha observado en el tipo epidermoide y en las neoplasias intraepiteliales en varios estudios [160, 162-164]. Se ha encontrado que la ciclina E no tiene un significado pronóstico, de acuerdo con lo publicado para el carcinoma de tipo epidermoide [157, 165]. En el carcinoma epidermoide, la sobreexpresión y sobreactividad de la ciclina E puede ser el resultado directo de las proteínas E6 y E7 del VPH. La oncoproteína E7 del VPH permite la inactivación de pRb [167] y por lo tanto un incremento en la activación de la ciclina E. La oncoproteína E7 inactiva a p27 permitiendo la activación de la ciclina E [168].

Finalmente, se observó un incremento en la expresión de la proteína ciclina A desde las muestras normales (27%) hasta el cáncer invasor (adenocarcinoma (33%) y adenocarcinoma (57%)), aunque no se observó diferencia significativa en términos de presencia de la proteína, ni con relación al estadio clínico. La localización de la proteína ciclina A se localizó principalmente en el núcleo, pero en el caso de las lesiones premalignas y de los carcinomas de tipo adenoescamoso se observó también en el citoplasma. Esto nos puede sugerir que la expresión de la ciclina A puede estar involucrada con la progresión del CaCU. Recientemente, hallazgos similares se observaron en el endometrio proliferativo, la hiperplasia endometrial, el adenocarcinoma endometrial y las lesiones neoplásicas glandulares de cérvix [156, 169], corroborando nuestros hallazgos. En el carcinoma de tipo

epidermoide observamos una ligera disminución (20%) de ciclina A con respecto al epitelio normal. Otros trabajos han reportado un aumento en la expresión de ciclina A en este tipo histológico [163, 164]. Un aumento en la expresión de la proteína ciclina A ha sido relacionado con un pobre pronóstico en una variedad de cánceres como el de esófago [170], el de pulmón de células no pequeñas [171], próstata [172] y de células transicionales [173].

En conclusión, la localización del complejo E-caderina/ β -catenina en las lesiones precursoras y en el cáncer invasor se encontró alterada es decir con una localización citoplasmática reportándose como un evento frecuente e independiente de la activación de la vía Wnt. Por otro lado, la disminución de la expresión de las proteínas ciclina D1 y fra-1 en estas muestras es significativa, independiente de la localización citoplasmática de la β -catenina y de la presencia de los tipos de VPH de alto grado.

8. CONCLUSIONES

- En la mayoría de las muestras de lesiones premalignas y de cáncer invasor de cuello uterino, se observó una alteración (localización citoplasmática) de las proteínas E-caderina y β -catenina.
- En general, no se observó localización nuclear de β -catenina en las muestras analizadas de cérvix (4/180).
- No se observaron mutaciones en el exón 3 del gen de β -catenina en las 40 muestras analizadas.
- En la línea celular HeLa se observó actividad transcripcional del complejo β -catenina/Tcf/Lef.
- Se observó pérdida de la localización nuclear de las proteínas ciclina D1 y fra-1, con un aumento concomitante en el citoplasma; sin embargo, no hubo correlación significativa con la alteración de la β -catenina. No se observaron diferencias significativas en la localización celular de las proteínas c-jun y c-myc.
- Se observó localización citoplasmática de la ciclina E en las lesiones premalignas y cáncer invasor, aunque la ciclina A se observó principalmente en el núcleo. No hubo correlación entre la expresión de las proteínas ciclina E y A con el tipo de VPH.

9. REFERENCIAS

1. World Health Report 2004: Changing History. Statistical annex. World Health Organization, <http://www.who.int/whr/2004/en/index.htm>.
2. Anuario estadístico de la Dirección General de Estadística e Informática. Mortalidad 1996. Secretaría de Salud, México, 1997.
3. Secretaría de Salud (Méx). Registro Histopatológico de Neoplasias en México. México: Secretaría de Salud, México D.F. 1999.
4. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999;189:12-9.
5. Syrjanen S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *J Clin Virol*. 2005;32S:S59-S66.
6. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004;324:17-27.
7. zur Hausen H. Papillomavirus and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002;2:342-350.
8. zur Hausen H, Schneider A. 1987. The Papillomaviruses. Salzman NP, Howley PM (eds). Plenum publishing Corp.:new York, pp.245-263.
9. Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Muñoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer* 2003;88:63-73.
10. Moscicki AB, Shiboski S, Broering J, Powell K, Clayton L, Jay N, Darragh TM, Brescia R, Kanowitz S, Miller SB, Stone J, Hanson E, Palefsky J. The natural

- history of human papillomavirus infection as measured by repeated DNA testing in adolescent and young women. *J Pediatr* 1998;132:277-84.
11. Muñoz N, Franceschi S, Bosetti C, Moreno V, Herrero R, Smith JS, Shah KV, Meijer CJLM, Bosch FX. For the International Agency for Research on Cancer (IARC) Multicentric Cervical Cancer Study Group. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet* 2002;359:1093-1101.
 12. Winkelstein W, Jr. Smoking and cancer of the uterine cervix: hypothesis. *Am J Epidemiol* 1977;106:257-259.
 13. Moreno V, Bosch FX, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV, Walboomers JM, Herrero R, Franceschi S. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in woman with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. *Lancet* 2002;359:1085-1092.
 14. Green KJ, Graudy CA. Are desmosomes more than tethers for intermediate filaments? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000;1:208-16.
 15. Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;8:285-293.
 16. Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* 1991;251:1451-1455.
 17. Chistofori G, Semb H. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem* 1999;24:73-76.
 18. Angst BD, Marozzi C, Magee AI. The cadherin superfamily: diversity in form and function. *J Cell Sci* 2001;114:629-41.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

19. Huber AH, Weis WI. The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin. *Cell* 2001;105:391-402.
20. Chen G, Fernandez J, Mishe S, Courey AJ. A functional interaction between the histone deacetylase Rpd3 and the corepressor groucho in *Drosophila* development. *Genes Dev* 1999;13:2218-2230.
21. Peyrieras N, Hyafil F, Louvard D, Ploegh HL, Jacob F. Uvomorulin: a nonintegral membrane protein of early mouse embryo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:6274-6277.
22. Corn PG, Smith BD, RucKDaeschel ES, Douglas D, Baylin SB, Herman JG. E-cadherin expression is silenced by 5' CpG island methylation in acute leukemia. *Clin Cancer Res* 2000;6:4243-8.
23. Berx G, Cleton-Jansen AM, Nollet F, de Leeuw WJF, van de Vijver MJ, Cornelisse C, van Roy F. E-cadherin is a tumour/invasion suppressor gene mutated in human lobular breast cancers. *EMBO J* 1995;14:6107-6115.
24. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2002;2:442-54.
25. Peifer M, Berg S, Reynolds AB. A repeating amino acid motif shared by proteins with diverse cellular roles. *Cell* 1994;76:789-791.
26. Huber AH, Weis WI. The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin. *Cell* 2001;105:391-402.
27. Trent JM, Wiltshire R, Su LK, Nicolaidis NC, Vogelstein B, Kinzler KW. The gene for the APC-binding protein beta-catenin (CTNNB1) maps to chromosome 3p22, a

- region frequently altered in human malignancies. *Cytogenet Cell Genet* 1995;71:343-4.
28. Nollet F, Berx G, Molemans F, van Roy F. Genomic organization of the human beta-catenin gene (CTNNB1). *Genomics* 1996;32:413-424.
29. Rubinfeld B, Souza B, Albert I, Munemitsu S, Polakis P. The APC protein and E-cadherin form similar but independent complexes with α -catenin, β -catenin and plakoglobin. *J Biol Chem* 1995;270:5549-5555.
30. Sacco PA, McGranahan TM, Wheelock MJ, Jonson KR. Identification of plakoglobin domains required for association with N-cadherin and α -catenin. *J Biol Chem* 1995;270:20201-20206.
31. Anastasiadis PZ, Moon SY, Thoreson MA, Mariner DJ, Crawford HC, Zheng Y, Reynolds AB. Inhibition of RhoA by p120 catenin. *Nat Cell Biol* 2000;2:637-644.
32. Reynolds AB, Daniel J, McCrea PD, Wheelock MJ, Wu J, Zhang Z. Identification of a new catenin: the tyrosine kinase substrate p120cas associates with E-cadherin complexes. *Mol Cell Biol* 1994;14:8333-42.
33. Weiss EE, Kroemker M, Rudiger AH, Jockusch BM, Rudiger M. Vinculin is part of the cadherin-catenin junctional complex: complex formation between alpha-catenin and vinculin. *J Cell Biol* 1998;141:755-64.
34. Berx G, Becker KF, Hofler H, van Roy F. Mutations of the human E-cadherin (CDH1) gene. *Hum Mutat* 1998;12:226-37.
35. Hajra KM, Fearon ER. Cadherin and catenin alterations in human cancer. *Genes Chrom Cancer* 2002;34:255-68.

36. Esteller M. Epigenetic lesions causing genetic lesions in human cancer: promoter hypermethylation of DNA repair genes. *Eur J Cancer* 2000;36:2294–2300.
37. Graff JR, Gabrielson E, Fujii H, Baylin SB, Herman JG. Methylation patterns of the E-cadherin 5' CpG island are unstable and reflect the dynamic, heterogeneous loss of E-cadherin expression during metastatic progression. *J Biol Chem* 2000;275:2727-32.
38. Narayan G, Arias-Pulido H, Koul S, Vargas H, Zhang FF, VILLELLA J, Scheider A, Terry MB, Mansukhani M, Murty VV. Frequent promoter methylation of CDH1, DAPK, RARB, and H1C1 genes in carcinoma of cervix uteri: its relationship to clinical outcome. *Mol Cancer* 2003;2:24.
39. Grady WM, Willis J, Guilford PJ, Dunbier AK, Toro TT, Lynch H, Wiesner G, Ferguson K, Eng C, Park JG, Kim SJ, Markowitz S. Methylation of the CDH1 promoter as the second genetic hit in hereditary diffuse gastric cancer. *Nat Genet* 2000;26:16–17.
40. Batlle E, Sancho E, Franci C, Dominguez D, Monfar M, Baulida J, Garcia De Herreros A. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* 2000;2:84-89.
41. Lickert H, Bauer A, Kemler R, Stappert J. Casein kinase II phosphorylation of E-cadherin increases E-cadherin/beta-catenin interaction and strengthens cell-cell adhesion. *J Biol Chem* 2000;275:5090-95.
42. Bek S, Kemler R. Protein kinase CKII regulates the interaction of beta-catenin with alpha-catenin and its protein stability. *J Cell Science* 2002;115:4743-53.

43. Roura S, Miravet S, Piedra J, Garcia de Herreros A, Dunach M. Regulation of E-cadherin/catenin association by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 1999;274:36734-40.
44. Daniel JM, Reynolds AB. Tyrosine phosphorylation and cadherin/catenin function. *Bioessays* 1997;19:883–891.
45. Behrens J, Vakaet L, Friis R, Winterhager E, Van Roy F, Mareel MM, Birchmeier W. Loss of epithelial morphotype and gain of invasiveness correlates with tyrosine phosphorylation of the E-cadherin/ β -catenin complex in cells transformed with a temperature-sensitive v-src gene. *J Cell Biol* 1993;120:757–766.
46. Shiozaki H, Kadowaki T, Doki Y, Inoue M, Tamura S, Oka H, Iwazawa T, Matsui S, Shimaya K, Takeichi M. Effect of epidermal growth factor on cadherin-mediated adhesion in a human oesophageal cancer cell line. *Br J Cancer* 1995;71:250–258.
47. Shibamoto S, Hayakawa M, Takeuchi K, Hori T, Oku N, Miyazawa K, Kitamura N, Takeichi M, Ito F. Tyrosine phosphorylation of β -catenin and plakoglobin enhanced by hepatocyte growth factor and epidermal growth factor in human carcinoma cells. *Cell Adhes Commun* 1994;1:295–305.
48. Shibata T, Ochiai A, Kanai Y, Akimoto S, Gotoh M, Yasui N, Machinami R, Hirohashi S. Dominant negative inhibition of the association between β -catenin and c-erbB-2 by N-terminally deleted β -catenin suppresses the invasion and metastasis of cancer cells. *Oncogene* 1996;13:883–889.
49. D'Souza B, Taylor-Papadimitriou J. Overexpression of ERBB2 in human mammary epithelial cells signals inhibition of transcription of the E-cadherin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:7202–7206.

50. Huber AH, Stewart DB, Laurents DV, Nelson WJ, Weiss WI. The cadherin cytoplasmic domain is unstructured in the absence of β -catenin. A possible mechanism for regulating cadherin turnover. *J Biol Chem* 2001;276:12301–12309.
51. Steelant WFA, Goeman JL, Philippé J, Oomen LCJM, Hilkens J, Krzewinski-Recchi MA, Huet G, Van der Eycken J, Delannoy P, Bruyneel EA, Mareel MM. The alkyl-lysophospholipid 1-O-octadecyl-2-O-methyl-glycerophosphocholine induces invasion through episialin-mediated neutralization of E-cadherin in human mammary MCF-7 cells in vitro. *Int J Cancer* 2001;92:527–536.
52. Noë V, Fingleton B, Jacobs K, Crawford HC, Vermeulen S, Steelant W, Bruyneel E, Matrisian LM, Mareel M. Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1. *J Cell Sci* 2001;114:111–118.
53. Boterberg T, Vennekens KM, Thienpont M, Mareel MM, Bracke ME. Internalization of the E-cadherin/catenin complex and scattering of human mammary carcinoma cells MCF-7/AZ after treatment with conditioned medium from human skin squamous carcinoma cells COLO 16. *Cell Adhes Commun* 2000;7:299–310.
54. Shimoyama Y, Nagafuchi A, Fujita S, Gotoh M, Takeichi M, Tsukita S, Hirohashi S. Cadherin dysfunction in a human cancer cell line: possible involvement of loss of α -catenin expression in reduced cell-cell adhesiveness. *Cancer Res* 1992;52:5770-5774.
55. Hirano S, Kimoto N, Shimoyama Y, Hirohashi S, Takeichi M. Identification of a neural alpha-catenin as a key regulator of cadherin function and multicellular organization. *Cell* 1992;70:293-301.

56. Bullions LC, Notterman DA, Chung LS, Levine AJ. Expression of wild-type α -catenin protein in cells with a mutant α -catenin gene restores both growth regulation and tumor suppressor activities. *Mol Cell Biol* 1997;17:4501-4508.
57. Hinck L, Nathke IS, Papkoff J, Nelson WJ. Dynamics of cadherin/catenina complex formation: novel protein interactions and pathways of complex assembly. *J Cell Biol* 1994;125:1327-1340.
58. Hoschuetzky H, Aberle H, Kemler RJ. Beta-catenin mediates the interaction of the cadherin-catenin complex with epidermal growth factor receptor. *Cell Biol* 1994;127:1375-80.
59. Ochiai A, Akimoto S, Kanai Y, Shibata T, Oyama T, Hirohashi S. c-erbB-2 gene product associates with catenins in human cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;205:73-8.
60. Rubinfeld B, Souza B, Albert I, Muller O, Chamberlain SH, Masiarz FR, Munemitsu S, Polakis P. Association of the APC gene product with beta-catenin. *Science* 1993;262:1731-4.
61. Cadigan KM, Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev* 1997;11:3286-3305.
62. Perl A, Wilgenbus P, Dahl U, Semb H, Christofori G. A casual role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature* 1998;392:190-193.
63. Miller JR. The Wnts. *Genoma Biol* 2002;3:reviews3001.1-3001.15.
64. Capelluto DG, Kutateladze TG, Habas R, Finkielstein CV, He X, Overduin M. The DIX domain targets dishevelled to actin stress fibres and vesicular membranes. *Nature* 2002;419:726-729.

65. Habas R, Kato Y, He X. Wnt/Frizzled activation of Rho regulates vertebrate gastrulation and requires a novel Formin homology protein Daam1. *Cell* 2001;107:843-854.
66. Gloy J, Hikasa H, Sokol SY. Frigo interacts with Dishevelled to transduce Wnt signals. *Nat Cell Biol* 2002;4:351-357.
67. Mao J, Wang J, Liu B, Pan W, Farr GH, Flynn C, Yuan H, Takada S, Kimelman D, Li L, Wu D. Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway. *Mol Cell* 2001;7:801-809.
68. Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Genes & Dev* 2000;14:1837-1851.
69. Behrens J, Jerchow BA, Wurtele M, Grimm J, Asbrand C, Wirtz R, Kuhl M, Wedlich D, Birchmeier W. Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta. *Science* 1998;280:596-599.
70. Hart MJ, de los Santos R, Albert IN, Rubinfeld B, Polakis P. Downregulation of beta-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, beta-catenin and GSK3beta. *Curr Biol* 1998;8:573-581.
71. Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg GH, Tan Y, Zhang Z, Lin X, He X. Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 2002;108:837-847.
72. Wang Z, Vogelstein B, Kinzler KW. Phosphorylation of β -catenin at S33, S37, or T41 can occur in the absence of phosphorylation at T45 in colon Cancer Cells. *Cancer Res* 2003;63:5234-5235.

73. Kitagawa M, Hatakeyama S, Shirane M, Matsumoto M, Ishida N, Hattori K, Nakamichi I, Kikuchi A, Nakayama K. An F-box protein, FWD1, mediates ubiquitin-dependent proteolysis of beta-catenin. *EMBO J* 1999;18:2401-2410.
74. Rubinfeld B, Albert I., Porfiri E, Fiol C, Munemitsu S, Polakis P. Binding of GSK3 β to the APC- β -catenin complex assembly. *Science* 1996;272:1023-1026.
75. Yost C, Farr GH, 3RD, Pierce SB, Ferkey DM, Chen MM, Kimelman D. GBP, an inhibitor of GSK-3, is implicated in *Xenopus* development and oncogenesis. *Cell* 1998;93:1031-1041.
76. Moon RT, Kohn AD, de Ferrari GV, Kaykas A. Wnt and β -catenin signaling: diseases and therapies. *Nat Rev Gen* 2004;5:689-699.
77. Logan CY, Nusse R. The Wnt Signaling pathway in development and disease. *Ann Rev Cell Dev Biol* 2004;20:781-810.
78. Behrens J, von Kries JP, Kuhl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W. Functional interaction of β -catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 1996;382:638-642.
79. Morin P. β -catenin signaling and cancer. *BioEssays* 1999;21:1021-1030.
80. Riese J, Yu X, Munneryn A, Eresh S, Hsu SC, Grosschedl R, Bienz M. LEF-1, a nuclear factor coordinating signaling inputs from wingless and decapentaplegic. *Cell* 1997;88:777-787.
81. Roose J, Molenaar M, Peterson J, Hurenkamp J, Brantjes H, Moerer P, van de Wetering M, Destree O, Clevers H. The *Xenopus* Wnt effector XTcf-3 interacts with Groucho-related transcriptional repressors. *Nature* 1998;395:608-612.

82. Barker N, Hurlstone A, Musisi H, Miles A, Bienz M, Clevers H. The chromatin remodeling factor Brg-1 interacts with beta-catenin to promote target gene activation. *EMBO J* 2001;20:4935-4943.
83. Hecht A, Vleminckx K, Stemmler MP, Van Roy F, Kemler R. The p300/CBP acetyltransferases function as transcriptional coactivators of beta-catenin in vertebrates. *EMBO J* 2000;19:1839-1850.
84. He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 1998;281:1509-1512.
85. Lin SY, Xia W, Wang JC, Kwong KY, Spohn B, Wen Y, Pestell RG, Hung MC. β -catenin, a novel prognostic marker for breast cancer: Its roles in cyclin D1 expression and cancer progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:4262-4266.
86. Tetsu O, McCormick F. β -catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 1999;398:422-426.
87. Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, Damico M, Pestell R, Ben-Ze'ev A. The cyclin D1 gene is a target of the β -catenin/LEF-1 pathway. *PNAS USA* 1999;96:5522-5527.
88. Nesbit CE, Tersak JM, Prochownik EV. MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene* 1999;18:3004-16.
89. Arber N, Hibshoosh H, Moss SF, Zhang Y, Begg M, Wang S, Weinstein IB, Holt PR. Increased expression of cyclin D1 is an early event in multistage colorectal carcinogenesis. *Gastroenterology* 1996;110:669-74.

90. Crawford HC, Fingleton BM, Rudolf-Owen LA, Goss KJ, Rubinfeld B, Polakis P, Matrisian LM. The metalloproteinase matrysin is a target of β -catenin transactivation in intestinal tumors. *Oncogene* 1999;18:2883-2891.
91. Marchenko GN, Marchenko ND, Leng J, Strongin AY. Promoter characterization of the novel human matrix metalloproteinase-26 gene: regulation by the T-cell factor-4 implies specific expression of the gene in cancer cells of epithelial origin. *Biochem J* 2002;363:253-262.
92. Mann B, Gelos M, Siedow A, Hanski ML, Gratchev A, Ilyas M, Bodmer WF, Moyer MP, Riecken EO, Buhr HJ, Hanski C. Target genes of β -catenin-T-cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:1603-1608.
93. Henderson BR. Nuclear-cytoplasmic shuttling of APC regulates β -catenin subcellular localization and turnover. *Nat Cell Biol* 2000;2:653-660.
94. Polakis P. mutations in the APC gene and their implications for protein structure and function. *Curr Opin Genet Dev* 1995;5:66-71.
95. Sparks AB, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Mutational analysis of the APC/ β -catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998;58:1130-1134.
96. Satoh S, Daigo Y, Fukukawa Y, Kato T, Miwa N, Nishiwaki T, Kawasoe T, Ishiguro H, Fujita M, Tokino T, Sasaki Y, Imaoka S, Murata M, Shimano H, Yamaoka Y, Nakamura Y. Axin1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of Axin1. *Nat Genet* 2000;24:245-250.

97. Damhen RP, Koch A, Denkhaus D, Tonn JC, Sorensen N, Berthold F, Behrens J, Birchmeier W, Wiestler OD, Pietsh T. Deletions of AXIN1, a component of the Wnt/Wingless pathway in sporadic medulloblastomas. *Cancer Res* 2001;61:7039-7043.
98. Peifer M, Polakis P. Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis-a look outside the nucleus. *Science* 2000;287:1606-1609.
99. Su TH, Chang JG, Yeh KT, Lin TH, Lee TP, Chen JC, Lin CC. Mutation analysis of CTNNB1 (β -catenin) and AXIN1, the components of Wnt pathway, in cervical carcinomas. *Oncol Rep* 2003;10:1195-1200.
100. Takeichi M. Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Curr Opin Cell Biol* 1993;5:806-811.
101. Shiozaki H, Oka H, Inoue M, Tamura S, Monden M. E-cadherin mediated adhesion system in cancer cells. *Cancer* 1996;77(8 Suppl):1605-13.
102. Frixen UH, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A, Lochner D, Birchmeier W. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol* 1991;113:173-85.
103. Hashimoto M, Niwa O, Nitta Y, Takeichi M, Yokoro K. Unstable expression of E-cadherin adhesion molecules in metastatic ovarian tumor cells. *Jpn J Cancer Res* 1989;80:459-463.
104. Serini G, Trusolino L, Saggiorato E, Cremona O, de Rossi M, Angeli A, Orlandi F, Marchisio PC. Changes in integrin and E-cadherin expression in neoplastic versus normal thyroid tissue. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:442-449.

105. Siitonen SM, Kononen JT, Helin HL, Rantala IS, Holli KA, Isola JJ. Reduced E-cadherin expression is associated with invasiveness and unfavorable prognosis in breast cancer. *Am J Clin Pathol* 1996;105:394-402.
106. Danen EH, de vries TJ, Morandini R, Ghanem GG, Ruitter DJ, van Muijen GN. E-cadherin expression in human melanoma. *Melanoma Res* 1996;6:127-131.
107. Pignatelli M, Ansari TW, Gunter P, Liu D, Hirano S, Takeichi M, Kloppel G, Lemoine NR. Loss of membranous E-cadherin expression in pancreatic cancer: correlation with lymph node metastasis, high grade, and advanced stage. *J Pathol* 1994;174:243-8.
108. Vleminckx K, Vakaet LJr, Mareel M, Fiers W, Van Roy F. Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell* 1991;66:107-119.
109. De Leeuw WJF, Berx G, Vos CBJ, Peterse JL, van de Viiver MJ, Litvinov S, van Roy FM, Cornelisse CJ, Cleton-Jansen AM. Simultaneous loss of the E-cadherin and catenins in invasive lobular breast cancer and lobular carcinoma in situ. *J Pathol* 1997;183:404-411.
110. Gagliardi G, Kandemir O, Liu D, Guida M, Benvestito S, Ruers TG, Benjamin IS, Northover JM, Stamp GW, Talbot IC, *et al.* Changes in E-cadherin immunoreactivity in the adenoma-carcinoma sequence of the large bowel. *Virchows Arch* 1995;426:149-54.
111. Kase S, Sugio K, Yamazaki K, Okamoto T, Yano T, Sugimachi K. Expression of E-cadherin and β -catenin in human non-small cell lung cancer and the clinical significance. *Clin Cancer Res* 2001;6:4789-96.

112. Mattijssen V, Peters HM, Schalkwijk L, Manni JJ, van 't Hof-Grootenboer B, de Mulder PH, Ruiters DJ. E-cadherin expression in head and neck squamous-cell carcinoma is associated with clinical outcome. *Int J Cancer* 1993;55:580-585.
113. Umbas R, Isaacs WB, Bringuier PP, Schaafsma HE, Karthaus HF, Oosterhof GO, Debruyne FM, Schalken JA. Decreased E-cadherin expression is associated with poor prognosis in patients with prostate cancer. *Cancer Res* 1994;54:3929-33.
114. Darai E, Scoazec JY, Walker-Combrouze F, Mlika-Cabanne N, Feldmann G, Madelenat P, Potet F. Expression of cadherins in benign, borderline, and malignant ovarian epithelial tumors: a clinicopathologic study of 60 cases. *Human Pathol* 1997;28:922-928.
115. Bringuier PP, Umbas R, Schaafsma HE, Karthaus HFM, Debruyne FMJ, Schalken JA. Decreased E-cadherin immunoreactivity correlates with poor survival in patients with bladder tumors. *Cancer Res* 1993;53:3241-3245.
116. Campbell RJ, Pignatelli M. Molecular histology in the study of solid tumors. *Mol Pathol* 2002;55:80-82.
117. Parr EL, Tung HN, Parr MB. Apoptosis as the mode of uterine epithelial cell death during embryo implantation in mice and rats. *Biol Reprod* 1987;36:211-225.
118. Norris DO. 1985. *Vertebrate endocrinology*. Lea and Febiger, Philadelphia.
119. Bronson FH, Dagg CP, Snell GD. *Reproduction In Biology of the laboratory Mouse*, 2nd ed. E.L. Green, ed. Dover Publications, New York. 1968Pp. 187-204.
120. Moon HS, Kim JI, Son YS, Kim BG, Park SY. E-cadherin expression in cervical carcinogenesis. *Kor J Obstet Gynecol* 1997;40:548-57.

121. Denk C, Hulsken J, Schwarz E. Reduced gene expression of E-cadherin and associated catenins in human cervical carcinoma cell lines. *Cancer Letters* 1997;120:185-193.
122. Wilding J, Vousden KH, Soutter P, McCrea PD, Del Buono R, Pignatelli M. E-cadherin transfection down-regulates the Epidermal Growth Factor Receptor and reverses the invasive phenotype of human Papilloma virus-transfected keratinocytes. *Cancer Res* 1996;56:5285-5292.
123. Ueda M, Gemmill RM, West J, Winn R, Sugita M, Tanaka N, Ueki M, Drabkin HA. Mutations of the β -catenin and γ -catenin genes are uncommon in human lung, breast, kidney, cervical and ovarian carcinomas. *Br J Cancer* 2001;85:64-68.
124. Vessey CJ, Wilding J, Folarin N, Hirano S, Takeichi M, Soutter P, Stamp GW, Pignatelli M. Altered expression and function of E-cadherin in cervical intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma. *J Pathol* 1995;176:151-9.
125. de Boer C, van Dorst E, van Krieken H, Jansen-van Rhijn CM, Warnaar SO, Fleuren GJ, Litvinov SV. Changing roles of Cadherins and catenins during progression of squamous intraepithelial lesions in the Uterine Cervix. *J Pathol* 1999;155:505-515.
126. Carico E, Atlante M, Bucci B, Nofroni I, Vecchione A. E-cadherin and α -catenin expression during tumor progression of cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 2001;80: 156-161.

127. Imura J, Ichikawa K, Takeda J, Fujimori T. β -catenin expression as a prognostic indicator in cervical Adenocarcinoma. *Inter J Mol Med* 2001;8:353-358.
128. Shinohara A, Yokoyama Y, Wan X, Takahashi Y, Mori Y, Takami T, Shimokawa K, Tamaya T. Cytoplasmic/Nuclear Expression without Mutation of Exón 3 of the β -Catenin Gene Is Frequent in the Development of the Neoplasm of the Uterine Cervix. *Gynecol Oncol* 2001;82:450-455.
129. Han AC, Edelson MI, Soler AP, Knudsen KA, Lifschitz-Mercer B, Czernobilsky B, Rosenblum NG, Salazar H. Cadherin expression in glandular tumors of cervix. *Cancer* 2000;89:2053-58.
130. Pereira-Suárez AL, Meraz MA, Lizano M, Estrada-Chavez C, Hernandez F, Olivera P, Perez E, Padilla P, Yaniv M, Thierry F, Garcia-Carranca A. Frequent alterations of the β -catenin protein in cancer of the uterine cervix. *Tumor Biol* 2002;23:45-53.
131. Yoshikawa H, Kawana T, Kitagawa K, Mizuno M, Yoshikura H, Iwamoto A. Detection and typing of multiple genital human papillomaviruses by DNA amplification with consensus primers. *Jpn J Cancer Res* 1991;82:524-31.
132. Berumen J, Casas L, Segura E, Amezcua JL, Garcia-Carranca A. Genome amplification of human papillomavirus types 16 and 18 in cervical carcinomas is related to the retention of E1/E2 genes. *Int J Cancer* 1994;56:640-645.
133. Ong CK, Chan SY, Campo MS, Fujinaga K, Mavromara-Nazos P, Labropoulou V, Pfister H, Tay SK, ter Meulen J, Villa LL, *et al.* Evolution of human papillomavirus type 18: an ancient phylogenetic root in Africa and intratype diversity reflect coevolution with human ethnic groups. *J Virol* 1993;67:6424-6431.

134. Kitaeva MN, Grogan L, Williams JP, Dimond E, Nakahara K, Hausner P, DeNobile JW, Soballe PW, Kirsch IR. Mutations in beta-catenin are uncommon in colorectal cancer occurring in occasional replication error-positive tumors. *Cancer Res* 1997;57:4478-81.
135. Ilyas M, Tomlinson IPM, Rowan A, Pignatelli M, Bodmer WF. β -catenin mutations in cell lines established from human colorectal cancers. *PNAS* 1997;94:10330-10334.
136. Hart IR, Saini A. Biology of tumor metastasis. *Lancet* 1992;339:1453-1457.
137. Jeffers MD, Paxton J, Bolger B, Richmond JA, Kennedy JH, McNicol AM. E-cadherin and integrin cell adhesion molecule expression in invasive and *in situ* carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol* 1997;64:481-6.
138. Van de Putte G, Kristensen GB, Baekelandt M, Lie AK, Holm R. E-cadherin and catenins in early squamous cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 2004;94:521-527.
139. Ramesh S, Nash J, McCulloch PG. Reduction in membranous expression of beta-catenin and increased cytoplasmic E-cadherin expression predict poor survival in gastric cancer. *Br J Cancer* 1999;81:1392-1397.
140. Yoshida R, Kimura N, Harada Y, Ohuchi N. The loss of E-cadherin, alpha- and beta-catenin expression is associated with metastasis and poor prognosis in invasive breast cancer. *Int J Oncol* 2001;18:513-520.
141. Krishnadath KK, Tilanus HW, van Blankenstein M, Hop WC, Kremers ED, Dinjens WN, Bosman FT. Reduced expression of the cadherin-catenin complex in

- esophageal adenocarcinoma correlates with poor prognosis. *J Pathol* 1997;182:331-338.
142. Shimazui T, Schalken JA, Girolodi LA, Jansen CF, Akaza H, Koiso K, Debruyne FM, Bringuier PP. Prognostic value of cadherin-associated molecules (α -, β -, and γ -catenins and p120cas) in bladder tumors. *Cancer Res* 1996;56:4154-8.
143. Hugh TJ, Dillon SA, O'Dowd G, Getty B, Pignatelli M, Poston GJ, Kinsella AR. Beta-catenin expression in primary and metastatic colorectal carcinoma. *Int J Cancer* 1999;82:504-11.
144. Kobayashi M, Honma T, Matsuda Y, Suzuki Y, Narisawa R, Ajioka Y, Asakura H. Nuclear translocation of beta-catenin in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2000;82:1689-1693.
145. Nhieu JT, Renard CA, Wei Y, Cherqui D, Zafrani ES, Buendia MA. Nuclear accumulation of mutated beta-catenin in hepatocellular carcinoma is associated with increased cell proliferation. *Am J Pathol* 1999;155:703-710.
146. Saito T, Oda Y, Sakamoto A, Tamiya S, Kinukawa N, Hayashi K, Iwamoto Y, Tsuneyoshi M. Prognostic value of the preserved expression of the E-cadherin and catenin families of adhesion molecules and of β -catenin mutations in synovial sarcoma. *J Pathol* 2000;192:342-350.
147. Gottardi CJ, Gumbiner BM. Adhesion signaling: how beta-catenin interacts with its partners. *Curr Biol* 2001;11:R797-4.
148. Dierick H, Bejsovec A. Cellular mechanisms of wingless/Wnt signal transduction. *Curr Top Dev Biol* 1999;43:153-90.

149. Nishita M, Hashimoto, MK, Ogata S, Laurent MN, Ueno N, Shibuya H, Cho KW. Interaction between Wnt and TGF-beta signaling pathways during formation of Spemann's organizer. *Nature* 2000;403:781-5.
150. Bienz M. APC: the plot thickens. *Curr Opin Genet Dev* 1999;9:595-603.
151. McCartney BM, McEwen DG, Grevengoed E, Maddox P, Bejsovec A, Peifer M. *Drosophila* APC2 and Armadillo participate in tethering mitotic spindles to cortical actin. *Nat Cell Biol* 2001;3:933-8.
152. Hirohashi S. inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *Am J Pathol* 1998;153:333-339.
153. Gumbiner BM. Regulation of cadherin adhesive activity. *J Cell Biol* 2000;148:399-403.
154. Wang HL, Wang J, Xiao SY, Haydon R, Stoiber D, He TC, Bissonnette M, Hart J. Elevated protein expression of cyclin D1 and fra-1 but decreased expression of c-myc in human colorectal adenocarcinomas overexpression β -catenin. *Int J Cancer* 2002;101:301-310.
155. Chan TA, Wang Z, Dang LH, Vogelstein B, Kinzler KW. Targeted inactivation of CTNNB1 reveals unexpected effects of β -catenin mutation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:8265-8270.
156. El-Ghobashy AA, Shaaban AM, Herod J, Innes J, Prime W, Herrington CS. Overexpression of cyclins A and B as markers of neoplastic glandular lesions of the cervix. *Gynecol Oncol* 2004;92:628-634.

157. Southern SA, McDicken IW, Herrington CS. Evidence for keratinocyte immortalization in high-grade squamous intraepithelial lesions of the cervix infected with high-risk human papillomavirus. *Lab Invest* 2000;80:539-44.
158. Skomedal H, Krristensen GB, Lie AK, Holm R. Aberrant expression of the cell cycle associated proteins TP53, MDM2, p21, p27, cdk4, cyclin D1, RB, and EGFR in cervical carcinomas. *Gynecol Oncol* 1999;73:223-228.
159. Motokura T, Arnold A. Cyclin A and oncogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 1993;3:5-10.
160. Cho NH, Kim YT, Kim JW. Correlation between G1 cyclins and HPV in uterine cervix. *Int J Gynecol Pathol* 1997;16:339-47.
161. Nichols GE, Williams ME, Gaffey MJ, Stoler MH. Cyclin D1 gene expression in human cervical neoplasia. *Mod Pathol* 1996;9:418-425.
162. Dellas A, Schultheiss E, Leivas MR, Moch H, Torhorst J. Association of p27Kip1, cyclin E and c-myc expression with progression and prognosis in HPV-positive cervical neoplasms. *Anticancer Res* 1998;18:3991-8.
163. Kanai M, Shiozawa T, Xin L, Nikaido T, Fujii S. Immunohistochemical detection of sex steroid receptors, cyclins, and cyclin-dependent kinases in the normal and neoplastic squamous epithelia of the uterine cervix. *Cancer* 1998;82:1709-19.
164. Quade BJ, Park JJ, Crum CP, Sun D, Dutta A. *In vivo* cyclin E expression as a marker for early cervical neoplasia. *Mod Pathol* 1998;11:1238-46.
165. Tae KY, Kyoung ChE, Hoon ChN, Hung KJ, Ick YW, Wook KJ, Ho LS. Expression of cyclin E and p27(KIP1) in cervical carcinoma. *Cancer Lett* 2000;153:41-50.

166. Van de Putte G, Kristensen GB, Lie AK, Baekelandt M, Holm R. Cyclins and proliferation markers in early squamous cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 2004;92:40-46.
167. Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 1989;243:934-7.
168. Zerfass-Thome K, Zwerschke W, Mannhardt B, Tindle R, Botz JW, Jansen-Durr P. Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene* 1996;13:2323-30.
169. Kyushima N, Watanabe J, Hata H, Jobo T, Kameya T, Kuramoto H. Expression of cyclin A in endometrial adenocarcinoma and its correlation with proliferative activity and clinicopathological variables. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002;128:307-12.
170. Furihata M, Ishikawa T, Inoue A, Yoshikawa C, Sonobe H, Ohtsuki Y, Araki K, Ogoshi S. Determination of the prognostic significance of unscheduled cyclin A overexpression in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 1996;2:1781-5.
171. Dobashi Y, Shoji M, Jiang SX, Kobayashi M, Kawakubo Y, Kameya T. Active cyclin A-CDK2 complex, a possible critical factor for cell proliferation in human primary lung carcinomas. *Am J Pathol* 1998;153:963-72.
172. Aaltomaa S, Lipponen P, Eskelinen M, Ala-Opas M, Kosma VM. Prognostic value and expression of p21(waf1/cip1) protein in prostate cancer. *Prostate* 1999;39:8-15.

173. Furihata M, Ohtsuki Y, Sonobe H, Shuin T, Yamamoto A, Terao N, Kuwahara M. Cyclin A overexpression in carcinoma of the renal pelvis and ureter including dysplasia: immunohistochemical findings in relation to prognosis. *Clin Cancer Res.* 1997;3:1399-404.

10. RESUMEN DE ARTICULOS POR PUBLICAR

Cellular distribution of cyclin D1, A, and E, and fra-1 and c-jun in different histologic types of cancer of the uterine cervix

María Alexandra Rodríguez-Sastre^{1,2}, Leticia González-Maya³, Ricardo Delgado⁴, and Alejandro García-Carrancá^{1, 2, *}

¹Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM, México D.F.

²División de Investigación, Instituto Nacional de Cancerología-SSA, México D.F.

³Facultad de Farmacia, UAEM, Cuernavaca, Morelos.

⁴Departamento de Patología, Instituto Nacional de Cancerología-SSA, México D.F.

*To whom correspondence should be addressed:

Alejandro García-Carrancá,

División de Investigación, Instituto Nacional de Cancerología, SSA

Avenida San Fernando No. 22, CP 14080, Tlalpan, México D. F., México.

Phone: (+ 52 55) 5628 0433

Fax: (+ 52 55) 5485 4371

email: carranca@servidor.unam.mx

Abstract

Objective. The goal of this study was to analyze if alterations of β -catenin influence the cellular distribution of cyclin D1, E, and A, as well as fra-1, and c-jun proteins in invasive cervical cancer and premalignant lesions. *Methods.* We performed an immunochemical staining analysis of cyclin D1, E, and A, and fra-1, and c-jun proteins in biopsy samples from 13 normal exocervical squamous epithelium, 27 premalignant lesions and a large series of 95 invasive tumors of different histologic type (53 squamous carcinomas, 21 adenosquamous carcinomas, and 21 adenocarcinomas). Statistical significance was evaluated by chi-square or Fisher's exact tests. *Results.* We observed cyclin D1 and E mainly distributed at the cytoplasm in all samples analyzed. Levels of cyclin D1 were observed decreased the nucleus of all samples analyzed. When we compared this with normal tissue, we found statistically significant differences ($p \leq 0.05$). Similarly, no cyclin E was found localized in the nucleus of squamous carcinomas and adenosquamous carcinomas ($p \leq 0.05$), and a decreased level was also observed in premalignant lesions and adenocarcinomas. We found no differences in the distribution of cyclin A between premalignant lesions and invasive cancer, as compared with normal tissue. While fra-1 was observed decreased in premalignant lesions and invasive cancer, no changes in c-jun were observed among all samples analyzed. *Conclusions.* Even though we expected and increased expression of target proteins of β -catenin, as a consequence of its alterations, on the contrary, we observed decreased levels of cyclin D1 and fra-1 in the nucleus. This suggests that, diminished levels may be associated with tumor progression, independently of alterations of the Wnt (β -catenin) signaling pathway.

Key words: cervical cancer; cyclin D1; cyclin A; cyclin E; fra-1; c-jun; squamous carcinoma; adenosquamous carcinoma; adenocarcinoma; premalignant lesions; normal tissue.

E-cadherin and β -catenin complexes and cancer of the uterine cervix

María Alexandra Rodríguez-Sastre and Alejandro García-Carrancá*.

Address:

Laboratorio de Virus y Cáncer,

Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer.

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM and

Instituto Nacional de Cancerología, SSA.

Avenida San Fernando No. 22

Sección XVI Tlalpan, DF.

14080. Mexico City, México.

Emails:

María Alexandra Rodríguez-Sastre, alexsastre2002@yahoo.com.mx

Alejandro García-Carrancá, carranca@servidor.unam.mx

*Corresponding author

Abstract

Cancer is the final result of a series of genetic and epigenetic changes that directly or indirectly influence tissue growth, differentiation, genome integrity and cell death. It is well established that alterations in the expression and function of cell-cell and cell-matrix adhesion molecules correlate with tumor progression. Alterations of cadherin/catenin complexes can lead to loss of cell adhesion, with subsequent cell transformation and increased metastatic potential. E-cadherin is the major protein involved in normal epithelial cell adhesion. Also, it has been identified as a suppressor of tumor progression in carcinoma cells, and plays essential roles in two different cellular processes: calcium-dependent intercellular adhesion and Wnt-mediated transcriptional activation. Moreover, β -catenin is now well known for its functions as a key element in a signal transduction network running from the membrane to the cytoskeleton and the nucleus. Although persistent infection with certain genotypes of human papillomavirus are now recognized as necessary for cancer of the uterine cervix to develop, additional cellular changes are clearly needed. Here we examine and summarize recent data on the most common alterations occurring to cadherin/catenin complexes in cancer, in particular in cancer of the uterine cervix. We also examine the role of adherent junction in the process of cancer development, in particularly in development of metastasis.

Abnormal distribution of E-cadherin and β -catenin in different histologic types of cancer of the uterine cervix

María Alexandra Rodríguez-Sastre^{a,f}, Leticia González-Maya^b, Ricardo Delgado^c,
Marcela Lizano^f, Gerardo Tsubaki^d, Alejandro Mohar^{e,f}, Alejandro García-Carrancá^{a,f,*}

^aDepartamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM, México D.F., Mexico

^bFacultad de Farmacia, UAEM, Cuernavaca, Morelos, Mexico

^cDepartamento de Patología, Instituto Nacional de Cancerología-SSA, México D.F., Mexico

^dDepartamento de Ginecología, Hospital Manuel Gea González, México D.F., Mexico

^eDepartamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM, México D.F., Mexico

^fDivisión de Investigación, Instituto Nacional de Cancerología-SSA, México D.F., Mexico

Received 7 September 2004

Available online 19 March 2005

Abstract

Objective. The goal of this study was to analyze the cellular distribution and possible alterations of β -catenin and E-cadherin proteins in different histologic types of uterine cervical cancer and precursor lesions, compared to normal controls.

Methods. We performed an immunohistochemical staining analysis of the cellular distribution of β -catenin and E-cadherin proteins in biopsy samples from 20 normal exocervical squamous epithelium, 43 premalignant lesions, and a large series of 126 invasive tumors of different histologic types that included 68 squamous carcinomas, 31 adenosquamous carcinomas, and 27 adenocarcinomas. Statistical significance was evaluated by the chi-square or Fisher's Exact test.

Results. We observed β -catenin abnormally distributed in the cytoplasm of 62% of premalignant lesions and more than 70% of invasive cancers, statistically significant when compared with normal tissue ($P < 0.05$). Similarly, we found that E-cadherin exhibit a significant abnormal distribution in the cytoplasm of 58% of premalignant lesions ($P < 0.05$) and in more than 71% of squamous carcinoma and adenosquamous carcinoma when compared with normal tissue ($P < 0.05$). We found no differences in the distribution of E-cadherin between adenocarcinomas compared with control samples. Interestingly, we found that both, β -catenin and E-cadherin, were absent in the membrane of nearly 40% premalignant lesions. Nuclear staining of β -catenin was rarely seen in any cases, contrary to what has been reported for this and other neoplasias.

Conclusion. Our findings indicate that cellular alterations of both β -catenin and E-cadherin are frequent in tumors of the uterine cervix of different histologic types, and support a role for these proteins in cervical cancer development.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Cervical cancer; β -catenin; E-cadherin; Squamous carcinoma; Adenosquamous carcinoma; Adenocarcinoma; Premalignant lesions; Normal tissue

Introduction

In Mexico, cervical cancer is still the leading cause of death among women with cancer, with almost 4000 annual

deaths and 23,000 new cases every year [1]. The main risk factors for its development are persistent infections with oncogenic or "high" risk types of Human Papillomavirus (HPV) such as types 16 and 18 [2]. "High" risk HPV types have been found in more than 99% of cervical carcinomas, suggesting a necessary role in tumor development [3]. While persistent viral infection is necessary, genetic alterations at the cellular level that are involved in the progression of precursor lesions to malignancy are still poorly understood.

* Corresponding author. División de Investigación, Instituto Nacional de Cancerología, SSA, Avenida San Fernando No. 22, CP 14080, Tlalpan, México D.F., México. Fax: +52 55 5485 4371.

E-mail address: carranca@servidor.unam.mx (A. García-Carrancá).

Recent reports have demonstrated that β -catenin is involved in two major cellular activities: signal transduction and intercellular adhesion [4]. β -catenin is a downstream transcriptional activator of the Wnt signaling pathway [5]. In the absence of Wnt signals, phosphorylation of β -catenin by glycogen synthase kinase 3- β (GSK-3 β) marks it for ubiquitin-mediated degradation through the proteasome pathway [6]. Activation of the Wnt pathway inhibits GSK, after which unphosphorylated β -catenin is translocated to the nucleus where it interacts with members of the T-cell factor/lymphoid-enhancer binding factor (TCF/LEF). This interaction subsequently forms a transcription complex that activates specific target genes [7], including major regulators of cell proliferation, such as cyclin D1 [8] and *c-myc* [9]. Different types of alterations affecting β -catenin signaling pathway have been found in several neoplasias [10–14].

In addition to its role in signal transduction, β -catenin has a major role in intracellular adhesion. It is localized at the calcium-dependent adherent junctions (AJs), where it binds the cytoplasmic domain of E-cadherin. Formation of this complex links the actin cytoskeleton with AJs via α -catenin and constitutes a key element in cell–cell adhesion [15]. In fact, mutant cadherin molecules whose catenin-binding sites have been deleted are impaired in their cell-binding function [16]. Several groups have proposed that E-cadherin functions as a tumor invasion suppressor gene, such that its loss allows or enhances invasion of adjacent normal tissues [17]. In addition, reduced E-cadherin expression has been observed in gastric cancers (42%) [18], infiltrated lobular breast carcinoma (85%) [19], colorectal carcinoma (57%) [20], lung endocrine tumors [21], and human cervical carcinoma-derived cell lines [22].

The role of β -catenin and E-cadherin has not been extensively studied in cervical cancer. Catenin gene expression was observed altered and associated with absent or reduced E-cadherin levels in cervical cancer-derived cell lines [22]. Normal mRNA levels of E-cadherin, and α - and β -catenin were observed in primary tumors from the cervix, compared with low levels in more advanced tumors [23]. On the contrary, increased β -catenin mRNA levels were found in 5 analyzed by micro-array technology [24]. Previous results from our laboratory showed that nearly 50% of tumors from the uterine cervix exhibited increased levels of expression or/and altered patterns of localization of β -catenin [25].

Here, we have analyzed the distribution of β -catenin and E-cadherin in samples from normal epithelium, premalignant lesions and a large series of invasive cancer of different histologic types that included 68 squamous carcinomas, 31 adenosquamous carcinomas, and 27 adenocarcinomas. The aim of this study was to evaluate differences in the distribution of these molecules during various stages of neoplastic progression within different histologic types of cervical cancer.

Materials and methods

Tissue samples

Normal tissue samples and tumors from the uterine cervix were collected from archives of the Department of Gynecology at the Hospital General Manuel Gea Gonzalez and the Department of Pathology at the Instituto Nacional de Cancerología, SSA, in Mexico City. Tissues were routinely fixed in 4% formalin and embedded in paraffin. A total of 189 specimens was analyzed, whose diagnosis were normal squamous epithelia (20 cases), low- and high-grade squamous intraepithelial lesions (SILs) (43 cases), invasive squamous carcinoma (68 cases), adenosquamous carcinoma (31 cases), and adenocarcinoma (27 cases). The median age of the patients was 48 years (range 21–85 years).

As normal controls, we used sections from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues from 20 normal cervixes from patients who underwent amputation of the cervix for prolapse (HTA and cervicitis) (age range, 20–74 years; median age, 33 years). The specimens were reevaluated blindly by experienced pathologists (R.D. and A.M.). All series included positive and negative controls. Replacement of the monoclonal antibody with mouse IgG1 protein of the same concentration was used as negative control. All controls gave satisfactory results. SW480 cell line was used as positive control. Actin, ECM, and vimentin were used as internal controls.

Immunohistochemical staining

Serial sections (3 μ m) were obtained from paraffin-embedded tissues and mounted on glass slides pre-treated with poly-L-Lysine. Sections were stained with hematoxylin and eosin for histologic classification or used for immunohistochemical detection of E-cadherin or β -catenin after deparaffinization in xylene and hydration in alcohol. To improve antigen reactivity, sections were pre-treated as described below. In short, sections were boiled for 10 min in citrate buffer (pH 6), cooled down in the same buffer, and subsequently incubated 5 min in 0.3% H₂O₂. Monoclonal antibodies (mAbs) against β -catenin (clone 14) and E-cadherin (clone 36) were obtained from Transduction Laboratories (Lexington, KY) and were used at 1:1000 dilutions. Tissue sections were incubated with primary antibodies for 30 min at room temperature in a humid chamber, rinsed in PBS, and treated with anti-mouse Envision System (Dako, Glostrup, Denmark). Diaminobenzidine was used as chromogen and sections were counterstained with hematoxylin. All slides were evaluated by two independent pathologists (R.D. and A.M.).

Determination of the immunoreactivity index

The proportion of stained cells and the cellular distribution of the epitope were used to score semiquantitatively the

immunohistochemical staining of β -catenin and E-cadherin. Percentage of positive tumor cells were scored as follows: 0 = no positive cells; 1 = 1–25% positives; 2 = 26–50% positives; 3 = 51–75% positives; and 4 = 76–100% positives. The intensity was estimated in comparison with the control and scored as follows: 0 = absence of staining; 1 = weak staining; 2 = moderate staining; 3 = strong staining.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the STATA 7.0 program. Differences between proportions were evaluated by the chi-square test and by Fisher's Exact test accordingly. *P* values equal or less than 0.05 was considered statistically significant.

Results

Abnormal distribution of β -catenin protein in normal cervical tissue, premalignant lesions, and invasive cancer

In the present study, we first evaluated expression levels and cellular distribution of β -catenin in a series of 188 samples by immunohistochemistry. The series included 20 normal squamous epithelial samples, 42 low- and high-grade squamous intraepithelial lesions (SILs), and 126 cases of invasive carcinoma (68 squamous carcinoma, 31 adenosquamous carcinoma, and 27 adenocarcinoma).

In normal epithelia, immunoreactivity was strongly observed in all cases at the plasma membrane of both basal and parabasal cells. No immunoreactivity was observed in superficial layers of normal epithelium (Figs. 1A and 2A).

On the other hand, while the majority of SILs (64%) exhibited β -catenin at the plasma membrane (27 out of 42), a positive immunoreactivity was also frequently observed at their cytoplasm (62%, 26 out of 42) (Figs. 1B–C). Interestingly, absent immunostaining at the membrane (36%) was observed in a large number of SILs. When we compared β -catenin staining between normal and SILs (both low and high grade), we found a significant difference between them ($P = 0.001$) (Table 1). It is worth nothing that, in these samples, β -catenin immunostaining was rarely observed in the nucleus. When β -catenin staining was compared between SIL and cancer, we found significant differences between them both at the membrane ($P = 0.0453$) and the cytoplasm ($P = 0.0084$).

In invasive carcinomas, while strong staining of β -catenin was found at the cytoplasm and predominantly at the invasion front, nuclear expression was also rarely observed (Fig. 1F). In squamous tumors, while β -catenin was frequently (75%) observed at the membrane (51 out of 68 cases), staining at the cytoplasm was also as frequently observed (76%; 52 out of 68 cases). Again, absent staining in the membrane was found in 25% (17 out of 68) of the samples (Figs. 1D–F). In adenosquamous carcinoma and adenocarcinoma, β -catenin was observed at the cytoplasm in most cases (91%; 28 out of 31; Figs. 2B–C, and 85%; 23 out of 27; Figs. 2D–E, respectively). When we compare cytoplasmic distribution of β -catenin either between normal tissue and adenosquamous carcinoma or between normal tissue and adenocarcinomas, we found significant differences ($P < 0.05$). Immunostaining at the membrane was found in more than 70% of both types of cancer (Figs. 2B–E). However, we did not find significant differences of β -catenin staining at the membrane between normal tissue

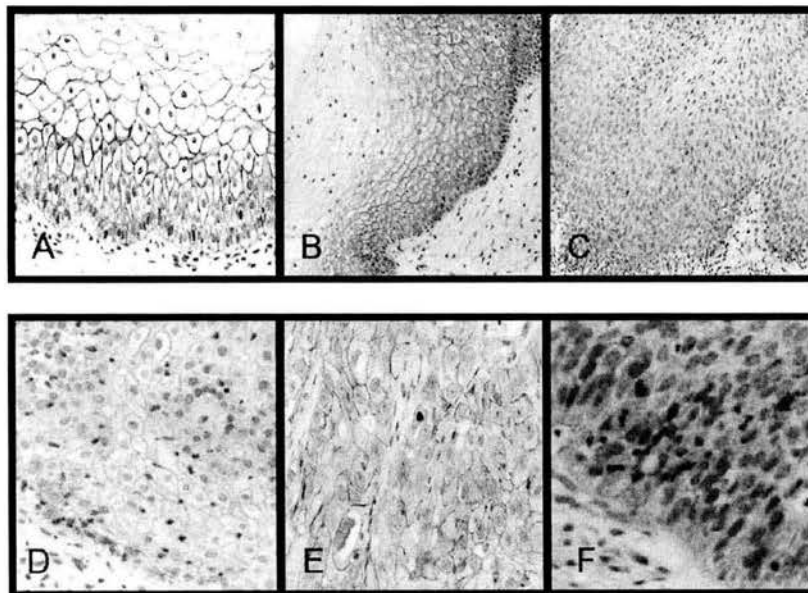


Fig. 1. Immunohistochemical staining of β -catenin in normal cervical uterine tissue (A), low- (B) or high-grade intraepithelial lesions (C), and squamous carcinoma (D, E, F). Strong cytoplasmic staining (B, D) and nuclear staining of β -catenin (F) are shown. Samples from paraffin-embedded tissues were obtained and processed for β -catenin staining as indicated in Materials and methods. Magnification is 40 \times .

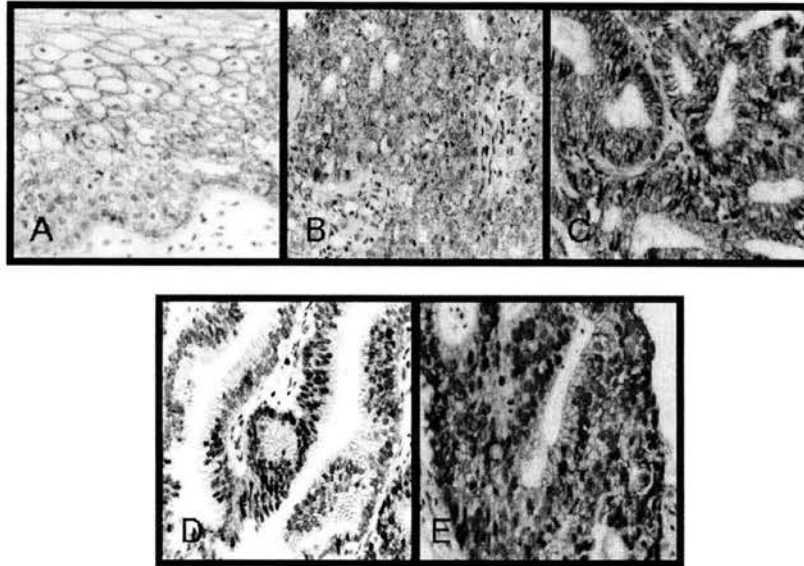


Fig. 2. Immunohistochemical staining of β -catenin in normal cervical uterine tissue (A), adenosquamous carcinoma (C, D), or adenocarcinoma of the uterine cervix (E, F). Strong membrane/cytoplasmic staining is indicated (B–F). Magnification is $40\times$.

and adenosquamous carcinomas ($P = 0.2746$). Nuclear staining was observed in only a few cases: one adenosquamous carcinoma (out of 31) and two adenocarcinomas (out of 27) (data not shown). The majority of squamous samples corresponded to stage II tumors, while adenosquamous and adenocarcinomas were between stages II and III. No significant differences were observed when the clinical stage of the tumors was compared to the localization of β -catenin.

Abnormal distribution of E-cadherin in normal cervical tissue, premalignant lesions, and invasive cancer

In this study, we have also analyzed E-cadherin expression and distribution patterns in these tumors (Table 2). Homogeneous but weak cytoplasmic staining was observed in normal squamous epithelium, with intense reactivity at cell-to-cell borders in all samples analyzed (12 out of 12; Fig. 3A).

In SILs, E-cadherin was mainly localized in the basal and parabasal layers. In general, immunostaining was less intense and seemed to disappear in cell–cell junctions in 40% of the cases (17 out of 43). In the majority of SILs cases, E-cadherin was found both at the membrane (26 out

of 43 samples; 60%) and the cytoplasm (25 out of 43; 58%). When compared to normal tissue, staining in SILs was found significantly different between them, both at the membrane ($P = 0.0108$) and the cytoplasm ($P = 0.0002$) (Fig. 3B). On the contrary, we did not find significant differences for E-cadherin staining between SIL and invasive cancer either at the membrane ($P = 0.7230$) or the cytoplasm ($P = 0.4149$).

In squamous tumors, E-cadherin expression was observed in 66% of the cases (45 out of 68) at the cellular membrane ($P = 0.015$) and in 73% of the cases (50 out of 68) at the cytoplasm ($P \leq 0.05$; Figs. 3C–D). In only 4 out of 68 cases analyzed, E-cadherin staining was observed in the nucleus (data not shown). In adenosquamous tumors, E-cadherin was mainly localized in the cytoplasm in 71% of these cases (22 out of 31, $P \leq 0.05$), although it was also seen at the membrane in 64% of them (20 out of 31, $P = 0.0195$) (Fig. 3E). No membrane staining for E-cadherin was observed in 36% of these samples (11 out of 31). In adenocarcinomas, E-cadherin expression was observed at the membrane in 55% of the cases (15 out of 27) ($P = 0.0068$), as well as in the cytoplasm in 37% of the cases (10 out of 27; $P = 0.017$) (Fig. 3F). Again, in 45% of these

Table 1
Distribution of β -catenin in normal squamous epithelium, premalignant lesions, and invasive cancer

Cellular localization	Immunostaining	Control	SIL ^a	P^b	Invasive cancer					
		$n = 20$	$n = 42$		Squamous	P^b	Adenosquamous	P^b	Adenocarcinoma	P^b
					$n = 68$		$n = 31$		$n = 27$	
Membrane	Moderate/Strong	20 (100%)	27 (64%)	0.001	51 (75%)	0.009	28 (91%)	0.275	19 (70%)	0.014
Cytoplasm	Absent/Weak	20 (100%)								
	Moderate/Strong		26 (62%)	0.000	52 (76%)	0.000	28 (91%)	0.000	23 (85%)	0.000

^a SIL: squamous intraepithelial lesion.

^b Fisher's Exact test. P value of each group is the result of its comparison with the control group.

Table 2
Distribution of E-cadherin in normal squamous epithelium, premalignant lesions, and invasive cancer

Cellular localization	Immunostaining	Control	SIL ^a	<i>P</i> ^b	Invasive cancer					
		<i>n</i> = 12	<i>n</i> = 43		Squamous <i>n</i> = 68	<i>P</i> ^b	Adenosquamous <i>n</i> = 31	<i>P</i> ^b	Adenocarcinoma <i>n</i> = 27	<i>P</i> ^b
Membrane	Moderate/Strong	12 (100%)	26 (60%)	0.010	45 (66%)	0.015	20 (64%)	0.019	15 (55%)	0.007
Cytoplasm	Absent/Weak	12 (100%)								
	Moderate/Strong		25 (58%)	0.000	50 (73%)	0.000	22 (71%)	0.000	10 (37%)	0.017

^a SIL: squamous intraepithelial lesion.

^b Fisher's Exact test. *P* value of each group is the result of its comparison with the control group.

cases membrane immunostaining of E-cadherin was not observed (12 out of 27 cases). No E-cadherin was observed in the nucleus of any adenosquamous carcinoma or adenocarcinoma. When adenosquamous carcinoma and adenocarcinoma were compared for E-cadherin staining at the cytoplasm, we found significant differences ($P = 0.0096$).

Discussion

Alterations in cell adhesion are among the common features that describe a tumor, including irregularities in adhesion molecules [26]. Decreased function of E-cadherin has been detected in cervical squamous carcinoma and carcinoma in situ [27,28]. We previously detected an aberrant localization of β -catenin in a small group of squamous tumors of the uterine cervix [25]. Our aim in this study was to determine if β -catenin and E-cadherin are altered during neoplastic progression of uterine cervical cancer by analyzing their localization in normal epithelial tissue, premalignant lesions, and invasive cancer of different histologic origin (squamous carcinoma, adenosquamous carcinoma, and adenocarcinoma).

Our finding that, in normal cervical epithelium, β -catenin is localized only at the plasma membrane in cells of the basal and parabasal layers agrees with its known function in cell adhesion [29]. Namely, that it remains at the membrane due to its binding to the cytoplasmic domain of E-cadherin. In contrast, frequent cytoplasmic localization of β -catenin was observed in SILs. In fact, it was clearly detected at the membrane and was present in the cytoplasm in 62% of all SILs analyzed.

In the present study that included 126 invasive carcinomas of different histologic types, we found a striking cytoplasmic localization of β -catenin in the majority of the cases (more than 76%). These data suggest that the presence of β -catenin in the cytoplasm may be related to the malignant phenotype of epithelial cells from the uterine cervix. Altered localization can be due to stabilization and subsequent accumulation of β -catenin in the cytoplasm, possibly due to activation of the Wnt signaling pathway, mutations in the APC gene, dysfunction of GSK3 β , or mutations of the β -catenin gene itself [30]. However, no mutations in the β -catenin gene were found in 40 of these samples analyzed (data not shown and [25]). Another explanation may be that alterations in E-cadherin, possibly

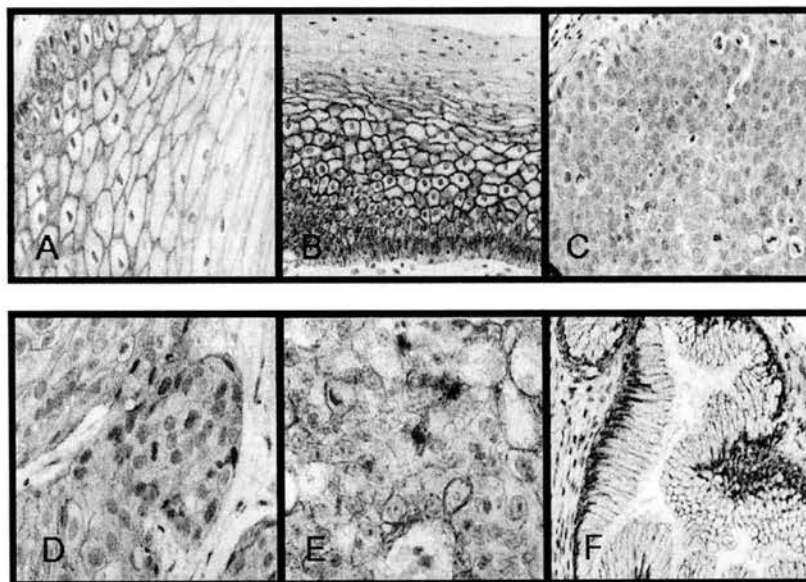


Fig. 3. Immunohistochemical staining of E-cadherin in normal cervical uterine tissue (A), high-grade intraepithelial lesions (B), squamous carcinoma (C, D), adenosquamous carcinoma (E), or adenocarcinoma (F). Strong membrane/cytoplasmic staining is indicated (B–F). Magnification is 40 \times .

affecting its binding to β -catenin, can induce its membrane detachment and consequently increase its cytoplasmic levels. Importantly, although differences in protein localization were found among various histologic types of cervical cancer, there was no significantly different proportion (28/31 of adenosquamous carcinoma, 23/27 of adenocarcinoma, and 52/68 of squamous carcinoma).

Loss of cell–cell interactions have been reported to be important in tumor progression. It is worth mentioning that although we found an aberrant localization of β -catenin in the cytoplasm of invasive cervical carcinoma cells, membrane localization of this protein was not totally absent. Moreover, a strong positive signal at membrane was found for β -catenin in more than 70% of the cases. Even some studies report an increase [29], other report a reduction [31]. Therefore, we can speculate that cell adhesion may be altered but not completely lost in cervical cancer, or that the loss of the β -catenin/E-cadherin complex is not necessary.

Recently, Van de Putte et al. found a reduction in membrane-associated expression of β -catenin (10%) and an increase in its cytoplasmic localization (75%), while nuclear staining was not relevant in early squamous cervical carcinoma [32]. These data are in agreement with our results.

It is worth emphasizing that no β -catenin expression was found in the nucleus of any of the samples analyzed. This could be linked to the fact that probably in our samples, wild type APC could be exerting its ability to act as a nuclear exporter of β -catenin from the nucleus [33]. Absent nuclear β -catenin staining in our samples could also stress the fact that some well-known transcriptional targets of this molecule (like *c-myc* and cyclin D1) are now known to be independent of its regulation, indicating that nuclear accumulation of β -catenin is not mandatory in some cases [34]. These results differ from those reported previously for colon cancer and hepatocellular carcinoma, where nuclear localization was frequently observed [35,36]. In this study, as well as that of Imura et al. [37], nuclear translocation was not seen as frequently as in other carcinomas. Their data and those presented here suggest that nuclear translocation of β -catenin may be an infrequent event in cervical cancer progression, and that nuclear translocation might not be associated with malignant potential or development of not only cervical adenocarcinoma, but also squamous and adenosquamous carcinomas.

Decrease or loss of E-cadherin expression is a common finding in many human epithelial cancers, including cervical cancer [38,39], but a decreased expression in this molecule had also been described in metastasis, but not primary tumors [23,27]. Hypermethylation of CDH1 has been proposed as an explanation for decreased E-cadherin expression [40,41], and was even suggested as a potential marker for identifying cervical cancer patients at high risk for relapse [42]. As expected, we found that, in normal cells, E-cadherin localizes only at the cellular membrane, both in basal and parabasal cell layers. However, in SILs and

invasive tumors, E-cadherin was observed both at the plasma membrane and in the cytoplasm. A reduction of protein levels at the membrane was clear in all cases, with an important decrease that ranges from 36% to 45%. This situation may result in reduced cell adhesion normally observed in cervical cancer and intraepithelial lesions [38,43].

The progressive reduction of E-cadherin expression in basal cells of the intermediate and superficial layers of the cervix epithelium (30% of all cases) indicates a possible participation of this molecule in the scaling process of the stratified epithelium. It also suggests that E-cadherin may play an important role in the maintenance of adult tissue structures [27]. Recently, Van de Putte et al. found a diminished expression of membrane-associated E-cadherin in early squamous cervical carcinoma and proposed this changes as early events in cervical carcinogenesis [32].

E-cadherin was observed, both at the membrane and in the cytoplasm, in 13 SIL, although in five cases it was absent. It is interesting to note that in 12 out of 17 cases of SIL in which E-cadherin remained absent at the membrane, there was an abnormal localization of this protein in the cytoplasm, suggesting that the absence of E-cadherin at the membrane with its consequent localization in the cytoplasm could be an important event in SIL progression. This fact is strongly associated with the loss of β -catenin that we previously observed at the plasma membrane. In summary, our findings indicate that alterations of these proteins are frequent in cancer of the uterine cervix, suggesting that they may play an important role in their development.

Acknowledgments

We thank Celedonio Gómez, Brenda Peralta, and Sergio Uribe for their technical assistance. This work was supported in part by grants from PAPIIT-UNAM (IN20921 to A.G.C.) and Instituto Nacional de Cancerología, SSA (01021IBI).

References

- [1] Secretaría de Salud (Mex). Registro Histopatológico de Neoplasias en México. Secretaría de Salud, México D. F. 1999.
- [2] zur Hausen H. Molecular pathogenesis of cancer of the cervix and its causation by specific human papillomavirus types. *Curr Top Microbiol Immunol* 1994;186:131–56.
- [3] Walboomers JM, Jacobs MB, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999;189:12–9.
- [4] Peifer M. Beta-catenin as oncogene: the smoking gun. *Science* 1997;275:1752–3.
- [5] Huber O, Bierkamp C, Kemler R. Cadherins and catenins in development. *Curr Opin Cell Biol* 1996;5:685–91.
- [6] Polakis P. The oncogenic activation of beta-catenin. *Curr Opin Genet Dev* 1999;9:15–21.
- [7] Hecht A, Kemler R. Curbing the nuclear activities of β -catenin. *EMBO Rep* 2000;1:24–8.
- [8] Tetsu O, McCormick F. β -catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 1999;398:422–6.

- [9] He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, et al. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 1998;281:1509–12.
- [10] Zurawel RH, Chiappa SA, Allen C, Raffel C. Sporadic medulloblastomas contain oncogenic β -catenin mutations. *Cancer Res* 1998;58:1344–7.
- [11] Gamallo C, Palacios J, Moreno G, Calvo de Mora J, Suarez A, Armas A. β -catenin-expression pattern in stage-I and stage-II ovarian carcinomas: relationship with beta-catenin-gene mutations and clinic pathological features, and clinical outcome. *Am J Pathol* 1999;155:527–36.
- [12] Fukuchi T, Sakamoto M, Tsuda H, Maruyama K, Nozawa S, Hirohashi S. β -catenin mutation in carcinoma of the uterine endometrium. *Cancer Res* 1998;58:3526–8.
- [13] Miyoshi Y, Iwao K, Nagasawa Y, Aihara T, Sasaki Y, Imaoka S, et al. Activation of the β -catenin gene in primary hepatocellular carcinomas by somatic mutations involving exon 3. *Cancer Res* 1998;58:2524–7.
- [14] Voeller HJ, Truica CI, Gelmann EP. β -catenin mutations in human prostate cancer. *Cancer Res* 1998;58:2520–3.
- [15] Jamora C, Fuchs E. Intercellular adhesion, signaling and the cytoskeleton. *Nat Cell Biol* 2002;4:E101–8.
- [16] Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 2000;14:1837–51.
- [17] Pignatelli M, Ansari TW, Gunter P, et al. Loss of membranous E-cadherin expression in pancreatic cancer: correlation with lymph node metastasis, high grade, and advanced stage. *J Pathol* 1994;174:243–8.
- [18] Huiping C, Kristjansdottir S, Jonasson JG, Magnusson J, Egißson V, Ingvarsson S. Alterations of E-cadherin and β -catenin in gastric cancer. *BMC Cancer* 2001;1:16–22.
- [19] Bex G, van Roy F. The E-cadherin/catenin complex: an important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression. *Breast Cancer Res* 2001;3:289–93.
- [20] Garinis GA, Spanakis NE, Menounos PG, Manolis EN, Peros G. Transcriptional impairment of β -catenin/E-cadherin complex is not associated with β -catenin mutations in colorectal carcinomas. *Br J Cancer* 2003;88:206–9.
- [21] Clavel CE, Nollet F, Bex G, Tejpar S, Nawrocki-Rabi B, Kaplan HH, et al. Expression of the E-cadherin-catenin complex in lung neuroendocrine tumors. *J Pathol* 2001;194:20–6.
- [22] Denk C, Hulsken J, Schwarz E. Reduced gene expression of E-cadherin and associated catenins in human cervical carcinoma cell lines. *Cancer Lett* 1997;120:185–93.
- [23] Fujimoto J, Ichigo S, Hirose R, Sakaguchi H, Tamaya T. Expression of E-cadherin α - and β -catenin mRNAs in uterine cervical cancers. *Tumor Biol* 1997;18:206–12.
- [24] Shim C, Zhang W, Rhee CH, Lee JH. Profiling of differentially expressed genes in human primary cervical cancer by complementary DNA expression array. *Clin Cancer Res* 1998;4:3045–50.
- [25] Pereira-Suárez AL, Meraz MA, Lizano M, Estrada-Chávez C, Hernández F, Olivera P, et al. Frequent alterations of the β -catenin protein in cancer of the uterine cervix. *Tumor Biol* 2002;23:45–53.
- [26] Hart IR, Saini A. Biology of tumor metastasis. *Lancet* 1992;339:1453–7.
- [27] Vessey CJ, Wilding J, Folarin N, et al. Altered expression and function of E-cadherin in cervical intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma. *J Pathol* 1995;176:151–9.
- [28] Jeffers MD, Paxton J, Bolger B, Richmond JA, Kennedy JH, McNicol AM. E-cadherin and integrin cell adhesion molecule expression in invasive and in situ carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol* 1997;64:481–6.
- [29] Shinohara A, Yokoyama Y, Wan X, Takahashi Y, Mori Y, Takami T, et al. 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* 2001;82:450–5.
- [30] Dierick H, Bejsovec A. Cellular mechanisms of wntless/Wnt signal transduction. *Curr Top Dev Biol* 1999;43:153–90.
- [31] Moon HS, Park WI, Choi EA, Chung HW, Kim SC. The expression and tyrosine phosphorylation of E-cadherin/catenin adhesion complex, and focal adhesion kinase in invasive cervical carcinomas. *Int J Gynecol Cancer* 2003;13:640–6.
- [32] Van de Putte G, Kristensen GB, Backelandt M, Lie AK, Holm R. E-cadherin and catenins in early squamous cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 2004;94:521–7.
- [33] Henderson BR. Nuclear-cytoplasmic shuttling of APC regulates beta-catenin subcellular localization and turnover. *Nat Cell Biol* 2000;2:653–60.
- [34] Chan TA, Wang Z, Dang LH, Vogelstein B, Kinzler KW. Targeted inactivation of CTNNB1 reveals unexpected effects of β -catenin mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:8265–70.
- [35] Kobayashi M, Honma T, Matsuda Y, Suzuki Y, Narisawa R, Ajioka Y, et al. Nuclear translocation of beta-catenin in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2000;82:1689–93.
- [36] Nhieu JT, Renard CA, Wei Y, Cherqui D, Zafrani ES, Buendia MA. Nuclear accumulation of mutated beta-catenin in hepatocellular carcinoma is associated with increased cell proliferation. *Am J Pathol* 1999;155:703–10.
- [37] Imura J, Ichikawa K, Takeda J, Fujimori T. β -catenin expression as a prognostic indicator in cervical adenocarcinoma. *Inter J Mol Med* 2001;8:353–8.
- [38] Carico E, Atlante M, Bucci B, Nofroni I, Vecchione A. E-cadherin and α -catenin expression during tumor progression of cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 2001;80:156–61.
- [39] Inoue M, Ogawa H, Miyata M, Shiozaki H, Tanizawa O. Expression of E-cadherin in normal, benign, and malignant tissues of female genital organs. *Am J Clin Pathol* 1992;98:76–80.
- [40] Graff JR, Gabrielson E, Fujii H. Methylation patterns of the E-cadherin 5'/CpG island are unstable and reflect the dynamic, heterogeneous loss of E-cadherin expression during metastatic progression. *J Biol Chem* 2000;275:2727–32.
- [41] Chen CL, Liu SS, Ip SM, Wong LC, Ng TY, Ngan HY. E-cadherin expression is silenced by DNA methylation in cervical cancer cell lines and tumours. *Eur J Cancer* 2003;39:517–23.
- [42] Widschwendter A, Ivarsson L, Blassnig A, et al. CDH1 and CDH13 methylation in serum is an independent prognostic marker in cervical cancer patients. *Int J Cancer* 2004;109:163–6.
- [43] de Boer CJ, van Dorst E, van Krieken H, Jansen-van Rhijn CM, Warnaar SO, Fleuren GJ, et al. Changing roles of cadherins and catenins during progression of squamous intraepithelial lesions in the uterine cervix. *Am J Pathol* 1999;155:505–15.