

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



## FACULTAD DE QUÍMICA

### Alteraciones en Componentes de la Vía de la $\beta$ -catenina en Tumores del Cuello Uterino

Tesis  
que para Obtener el Título de

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

Presenta

**CRISTIAN PABLO MIGUEZ MUÑOZ**

México, D. F.

2006



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.

# Jurado Asignado

---

Presidente    Prof. Homero Hernández Montes  
Vocal        Prof. Felipe Cruz García  
Secretario   Prof. Alejandro García Carrancá  
1<sup>er</sup> Suplente   Prof. Enrique Ortega Soto  
2<sup>o</sup> Suplente   Prof. José Ignacio Páramo Ramírez

El presente trabajo se desarrolló en:

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM  
Instituto Nacional de Cancerología, SSA

Asesor del Tema

Sustentante

DR. ALEJANDRO GARCÍA CARRANCÁ

CRISTIAN PABLO MIGUEZ MUÑOZ

**A mis padres.  
Este esfuerzo ha sido  
tan mío como suyo.**

**A Montserrat.  
Trajiste luz a mi vida  
cuando las tinieblas  
eran más densas.**

# Agradecimientos

---

A mi Buen Señor Dios, por la vida y los honores inmerecidos.

Al Dr. Alejandro, por todo el apoyo durante estos años, por su inapreciable asesoría en cada paso de la tesis, y también por su paciencia, pero sobre todo, por su amistad.

A mis papás, porque ni todas las tesis del mundo alcanzarían para agradecer cuanto han hecho para que ésta llegase a ser. Los amo.

A Montse, porque sin tu apoyo y amor nunca hubiera dado acertadamente los últimos pasos de este trabajo. Te amo.

A toda la gente del labo: Miriam, Ana Laura, Paty, Ángeles, Lety, Alexandra, Rocío, Silvia, Dalia, Valerio, Alex, Brenda, Fabiola, por su amistad y por ayudarme en las técnicas escabrosas, pero en especial, porque trabajar con ustedes ha sido siempre enriquecedor.

A Marcela, por su ayuda incondicional, por permitirme trabajar en su laboratorio, por la confianza y las palabras de apoyo.

A PROBETEL, por el apoyo económico brindado durante la realización de este proyecto.

A los profesores que me ayudaron a dar lo mejor de mí durante la carrera y a quienes siempre recordaré con cariño: Raúl Garza, Fernando Montiel, Graciela Flores, Rafael Castillo.

A la bola: Calderón, Gabs, Lulú, Perelman, Crabtree, Serge. Sin ustedes jamás hubiera salido adelante en las clases, los laboratorios y aquellas interminables veladas de estudio. Dicen que quien encuentra un amigo encuentra un tesoro... tienen razón.

A los ñoños de la generación: Begoña, Santiago, Jiro, Nayeli, Poncho, Nohemí, David, porque gracias a ustedes nunca pude darme el lujo del ocio.

A todos los amigos de la Facultad: Emy, Marianilla, Gibrán, Juanito y Yeri, el Oso, Tubert y Fabiola, Pamela, Erika, Fernanda, Puka, Iván, Muñoz, ¡qué buenos recuerdos!, ¡qué tiempos aquellos!

A Hilda, porque nunca me dejaste desistir, pero en particular por esa amistad tan especial.

A Samantha, con toda mi admiración y cariño, por tu invaluable amistad y porque eres un verdadero ejemplo a seguir.

A mis tíos, tías, primos y primas, por su cariño y confianza. Son la mejor familia que cualquiera podría pedir.

A la Sra. Remedios, porque su amistad y apoyo han sido incondicionales, transgeneracionales y siempre oportunos. Que Dios le pague sus favores multiplicados.

De manera muy especial a mis señores Philippe, Mijangos y Alex del Toro, por su apoyo y ayuda durante estos difíciles años. Siempre estaré en deuda. Que Dios los bendiga.

A mis hermanitos... En la Tierra...

# Índice

---

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

INTRODUCCIÓN

ANTECEDENTES

Historia Natural del Cáncer

Mutaciones

Mutágenos químicos

Mutágenos físicos

Carcinógenos biológicos

Cáncer Cervicouterino

La Vía de Wnt y  $\beta$ -catenina

La cascada de señales de la familia de ligandos Wnt

Los receptores rizados de la familia Wnt

Mecanismos de transmisión de señales de la vía Wnt

Transmisión de la señal del receptor rizado a Dishevelled

Transmisión de la señal de Dishevelled a Axina

Transmisión de la señal de Dishevelled a GSK-3 $\beta$

Transmisión de la señal de GSK-3 $\beta$  a  $\beta$ -catenina

Transmisión de la señal de  $\beta$ -catenina a TCF

$\beta$ -catenina

Interacción intercelular y con el citoesqueleto

*$\beta$ -catenina* como proto-oncogen

Axina

Mutaciones en *Axina*

APC

Mutaciones en *APC*

Fundamento de las Técnicas

SSCP

PTT

JUSTIFICACIÓN

OBJETIVOS

HIPÓTESIS

## MATERIAL Y MÉTODOS

Electroforesis en gel de agarosa

SSCP del exón 6 del gen supresor de tumores *p53*

SSCP del exón 8 del gen supresor de tumores *p53*

SSCP de los exones 3, 4 y 6 de  *$\beta$ -catenina*

Pruebas de Truncamiento de Proteínas para el estudio de APC

## RESULTADOS

Análisis de Posibles Alteraciones del Gen Supresor de Tumores *p53*

Exón 6

Exón 8

Análisis de Posibles Alteraciones del Gen  *$\beta$ -catenina*

Exón 3

Exón 4

Exón 6

Estado Mutacional del Gen Supresor de Tumores *APC*

## DISCUSIÓN

## CONCLUSIONES

## REFERENCIAS

## APÉNDICE: SUSTANCIAS Y REACTIVOS

# Índice de Figuras y Tablas

---

- Figura 1. Crecimiento exponencial en función del número de divisiones celulares
- Figura 2. Progresión del cáncer
- Figura 3. Pérdida de la adhesión celular
- Figura 4. Substitución de pares de bases
- Figura 5. Mutaciones y sus efectos
- Figura 6. Virus humano del papiloma
- Figura 7. Precursores del carcinoma escamoso cervical
- Figura 8. Mapa genómico del HPV-16
- Figura 9. Distribución de mutaciones en p53
- Figura 10. Interacción de p53 con el DNA
- Figura 11. Degradación de la  $\beta$ -catenina por la vía de la ubiquitina
- Figura 12. Representación de un receptor del tipo 7TMS como el receptor rizado de Wnt
- Figura 13. Transmisión de la señal del receptor rizado a Dsh
- Figura 14. Transmisión de la señal de Dsh al complejo citoplasmático
- Figura 15. Liberación de  $\beta$ -catenina del complejo citoplasmático
- Figura 16. Activación transcripcional de genes regulados por TCF/LEF
- Figura 17. Proteínas con repeticiones Armadillo
- Figura 18. Unión de  $\beta$ -catenina con el citoesqueleto
- Figura 19. Mutaciones en la secuencia reguladora de  $\beta$ -catenina identificadas en tumores humanos
- Figura 20. Estructura primaria de Axina
- Figura 21. Estructura primaria de APC
- Figura 22. Frecuencia relativa de mutaciones en el gen *APC* y su relación con la estructura primaria de la proteína
- Figura 23. Representación esquemática del fundamento de la técnica de SSCP
- Figura 24. Representación esquemática del fundamento de la técnica de PTT
- Figura 25. Localización celular de  $\beta$ -catenina en tumores y líneas celulares de cáncer cervicouterino
- Figura 26. Modelo de los cambios genéticos en el desarrollo de cáncer colorrectal
- Figura 27. Oligonucleótidos y productos del análisis de APC por PTT

- Figura 28. Amplificación y purificación del producto de PCR del exón 6 de *p53*
- Figura 29. Ausencia de alteraciones en el exón 6 de *p53* en las líneas celulares C33A y SW480
- Figura 30. Ausencia de alteraciones en el exón 6 de *p53* en muestras tumorales y en líneas celulares
- Figura 31. Amplificación del exón 8 de *p53* con diferentes concentraciones de  $Mg^{2+}$
- Figura 32. SSCP del exón 8 de *p53* en muestras tumorales y en líneas celulares
- Figura 33. Amplificación del exón 3 de  *$\beta$ -catenina* con diferentes concentraciones de  $Mg^{2+}$
- Figura 34. Adecuada resolución de bandas a las condiciones establecidas para el SSCP de  *$\beta$ -catenina*
- Figura 35. Análisis por SSCP del exón 3 de  *$\beta$ -catenina* en diferentes líneas celulares
- Figura 36. Ausencia de alteraciones en el exón 3 de  *$\beta$ -catenina* en muestras tumorales
- Figura 37. Análisis por SSCP del exón 4 de  *$\beta$ -catenina* en diferentes líneas celulares
- Figura 38. Ausencia de alteraciones en el exón 4 de  *$\beta$ -catenina* en muestras tumorales
- Figura 39. Ausencia de alteraciones en el exón 6 de  *$\beta$ -catenina* en muestras tumorales
- Figura 40. Amplificación del exón 15 de *APC* con diferentes concentraciones de  $Mg^{2+}$
- Figura 41. Amplificación y purificación del exón 15 de *APC* de muestras tumorales y líneas celulares
- Figura 42. Prueba de Truncamiento de Proteínas (PTT) de APC en diferentes muestras
- Figura 43. Prueba de Truncamiento de Proteínas (PTT) de APC en diferentes muestras (2)
- Figura 44. Prueba de Truncamiento de Proteínas (PTT) de APC en diferentes muestras (3)
- Figura 45. Vía alternativa de ubiquitinación de  $\beta$ -catenina mediada por Siah-1
- Figura 46. La proteína APC, la MCR, y las NES

Tabla 1. Mutaciones puntuales

Tabla 2. Rango de separación de fragmentos de DNA en geles con diferentes cantidades de agarosa

Tabla 3. Oligonucleótidos empleados para el análisis de *p53*

Tabla 4. Oligonucleótidos empleados para amplificar exones de *β-catenina*

Tabla 5. Oligonucleótidos empleados para amplificar el exón 15 de *APC*

Palabras clave: Cáncer cervicouterino, HPV, p53, *β-catenina*, *APC*, Wnt, mutación

# Introducción

---

“Estoy entre aquellos que piensan que la ciencia tiene gran belleza.

Un científico en su laboratorio no sólo es un técnico:  
también es un niño puesto en frente de fenómenos naturales  
que lo impresionan como una historia fantástica.”

MARIE CURIE (1867-1934)

“El desenlace de cualquier investigación sería sólo puede ser  
hacer crecer dos preguntas allí donde antes sólo crecía una.”

THORSTEIN VEBLEN (1857-1929)

El crecimiento de las células en un organismo multicelular está regulado por la acción conjunta de los proto-oncogenes que promueven su desarrollo, y por la actividad de los genes supresores de tumores que lo inhiben. Uno de los primeros protooncogenes identificado en mamíferos es *Wnt-1*, el cual, al ser activado por integración de algunos tipos de virus, es capaz de causar cáncer. En el desarrollo embrionario, *Wnt-1* es un regulador clave de la segmentación polarizada, y junto con otros genes de este tipo, define la parte anterior y posterior del embrión en desarrollo. Este gen también tiene un papel clave en la patogénesis oncológica ya que cuando existen mutaciones que alteran la cascada de señales asociada a *Wnt-1*, una célula puede volverse cancerosa.

La cascada de señales asociada con *Wnt-1* está compuesta por el producto de este gen y su receptor, por un complejo citoplasmático que se une a  $\beta$ -catenina (efector clave de esta vía) y por una familia de reguladores nucleares de la transcripción. El complejo

citoplasmático está compuesto por una serina cinasa llamada glicógeno sintasa cinasa-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), una proteína supresora de tumores llamada adenomatosis poliposa del colon (APC) y una proteína de anclaje llamada Axina.

Cuando la  $\beta$ -catenina se asocia con el complejo citosólico Axina-APC-GSK-3 $\beta$ , es fosforilada por GSK-3 $\beta$  y marcada para degradación por la vía de la ubiquitina. La activación del receptor rizado de *Wnt-1*, a través de algunas moléculas intermediarias, lleva a la inactivación de la GSK-3 $\beta$  permitiendo la acumulación de  $\beta$ -catenina y su posterior translocación al núcleo, en donde, al asociarse con el factor de células T (TCF) / factor linfoide de acrecentamiento (LEF), los transforma de represores a activadores de la transcripción. El complejo  $\beta$ -catenina-TCF/LEF, conduce a la expresión de ciertos genes que estimulan la formación de tumores, tales como *Ciclina D*, *c-jun*, *fra-1*, y *c-myc*. Dado que *Wnt-1* y  *$\beta$ -catenina* son efectores positivos de esta cascada, ambos son considerados protooncogenes, mientras que *APC* y *Axina* tienen función de supresores de tumores.

Se ha sugerido que diferentes alteraciones en la vía de señalización mediada por  $\beta$ -catenina podrían resultar en una acumulación citoplasmática de esta proteína. Entre las más exploradas están: mutaciones inactivantes en *APC*; algún mecanismo que reduzca la expresión de E-cadherina membranal o que aumente su expresión citoplasmática; y mutaciones en la región reguladora de  *$\beta$ -catenina* que eliminen los sitios de fosforilación.

Se ha observado que las mutaciones en  *$\beta$ -catenina* generalmente son alternativas a las mutaciones en *APC* y estas últimas son suficientes para que los tumores colorrectales crezcan hasta cerca de 1 cm de diámetro, por lo que es razonable asumir que los tumores de este tejido se desarrollan a lo largo de una vía genética que involucra a *APC*, aunque no todos ellos contienen mutaciones somáticas de *APC* fácilmente detectables.

Las mutaciones germinales en el gen de *APC* se asocian con la poliposis adenomatosa familiar, y diferentes estudios han mostrado que cerca de 95% de las lesiones en *APC*

identificadas en este tipo de cánceres son mutaciones terminadoras de la traducción (es decir, generan una proteína truncada), y que el espectro de mutación es bastante heterogéneo. La mayoría de las mutaciones somáticas parecen estar acumuladas en una parte relativamente pequeña del exón 15. Esta región (correspondiente a menos de 10% de la secuencia codificante) contiene cerca de 65% de las mutaciones, por lo que se le ha llamado “mutation cluster region” (MCR).

La región codificante de *APC* es muy grande y las técnicas convencionales sólo permiten analizar fragmentos pequeños, por lo que sería necesario emplear un gran número de oligonucleótidos.

Dado que la mayoría de las mutaciones en *APC* generan codones de paro, se ha empleado una técnica que acopla *in vitro*, la transcripción y la traducción de fragmentos generados por RT-PCR, llamada “protein truncation test” (PTT). Esta técnica permite analizar genes grandes con un espectro de mutaciones caracterizado por una preponderancia de mutaciones terminantes de la traducción.

En nuestro laboratorio se ha observado la existencia de un patrón de localización citoplasmática y/o nuclear (similar al reportado en tumores de diferentes tejidos) en cerca de 50% de las muestras, por lo que se ha analizado la posible participación de la vía de señalización de la  $\beta$ -catenina en el desarrollo de los tumores de cuello uterino. En estos tumores, se ha mostrado que las infecciones persistentes por virus de papiloma humano de “alto riesgo”, son una causa necesaria para su desarrollo. Sin embargo, es también muy claro que se requieren otras alteraciones en genes celulares para que finalmente se desarrollen los tumores.

El desarrollo del cáncer cervicouterino se asocia en más de 95% de los casos con la presencia del virus humano del papiloma (HPV) de alto riesgo, cuya oncoproteína E6 favorece la inactivación y degradación de la proteína supresora de tumores p53. El

análisis mutacional de las muestras estudiadas no reveló mutaciones en los puntos calientes de este gen, localizados en los exones 6 y 8 del mismo.

El análisis por Polimorfismo Conformacional de Cadena Sencilla (SSCP) de los exones 3, 4 y 6 de *β-catenina* no reveló alteraciones genéticas en la región regulatoria de este importante efector de la vía Wnt.

El análisis por PTT del exón 15 de *APC* no permitió establecer o excluir la presencia o ausencia de mutaciones truncantes en este supresor de tumores. Sin embargo, con base en diversos reportes de la literatura, es posible especular sobre la existencia de, al menos, otros 6 mecanismos responsables por dicha localización: Disrupción de la degradación de  $\beta$ -catenina dependiente de Siah-1 (cuya expresión es mediada por p53) y *APC*; alteración de los mecanismos de degradación de  $\beta$ -catenina dependientes de hdlg (mediados o no por *APC*) por interacción de E6 con ésta; hipermetilación del promotor de *APC* con la subsecuente inhibición de su expresión; y mutaciones en otros componentes de la vía de señalización Wnt.

El hecho de que tantas alteraciones converjan sobre los componentes de la vía de Wnt en diferentes tipos de cáncer, indica que la desregulación que resulta de dichos cambios genéticos y/o epigenéticos tiene una fuerte presión selectiva a favor, en diversas etapas de la progresión hacia la malignidad y metástasis. La comprensión de las varias alteraciones que pueden presentarse y los mecanismos desencadenados, ayudará a tener un panorama más completo de la patogénesis molecular de esta importante enfermedad.

# Antecedentes

---

## CÁNCER

“Desde que nacemos, todos llevamos dentro la muerte,  
igual que una bella manzana su corazón.”

RAINER MARIA RILKE (1875-1926)

“La rebelión es un problema permanente. Las células olvidan constantemente su deber patriótico [...] y así, cada día, en cada tejido, hay una célula que rompe filas y empieza a dividirse otra vez, como si fuera incapaz de resistirse a la llamada secular de los genes a reproducirse.”

MATT RIDLEY. “GENOMA”, 2001.

Cáncer. Del nombre griego para el cangrejo. Esta enfermedad toma su nombre de la apariencia de las arterias tumorales generadas *de novo*, que se presentan en forma de pinzas de cangrejo (Ridley, 2001).

La frecuencia con que se presenta el cáncer se duplica en cada década de vida, y se observa principalmente en personas mayores (Ridley, 2001). Incluso, la edad avanzada ha sido descrita como el más potente carcinógeno, ya que la incidencia de esta enfermedad aumenta exponencialmente en los últimos años de vida (DePinho, 2000; Land, 1983; Editorial board, 1996).

El cáncer representa una fuerte carga social y económica. La Sociedad Americana del Cáncer estima que, en los Estados Unidos, en el año 2000 se diagnosticaron 1,220,100 nuevos casos de cáncer, y cerca de 80% de ellos en personas mayores de 55 años. Cada día, más de 1,500 individuos sucumben ante esta enfermedad, la mayoría tras un largo y

costoso tratamiento clínico (DePinho, 2000). Cerca de 40% de los estadounidenses serán afectados por esta enfermedad, y más de una quinta parte morirán de ella, habiendo una tendencia similar en los demás países desarrollados. La Organización Mundial de la Salud estima que el cáncer mata cerca de 6 millones de personas anualmente alrededor del mundo (Rennie, 1996). El cáncer es la enfermedad genética más común: en el mundo occidental una de cada tres personas lo desarrolla, y una en cinco muere por él (Futreal et al., 2001). Sin embargo, ha habido una disminución, de diferente magnitud en cada caso, en la incidencia de varios tipos de cáncer en los últimos años, gracias al avance en el conocimiento de esta enfermedad, permitiendo detecciones más tempranas y mejorías en los tratamientos (Rennie, 1996).

El cáncer es en realidad una familia de más de 100 enfermedades agrupadas bajo este título, todas con diferentes orígenes tisulares, apariencias histológicas, y eventos mutacionales (Anderson et al., 2001; Weinberg, 1996), en las que se presentan disturbios en las más fundamentales reglas del comportamiento de las células en un organismo multicelular (Alberts et al. 1994).

Un ser humano es una sociedad de células, descendientes de una sola célula creada en el momento de la concepción, pero que se adhiere a esas reglas básicas generadas durante miles de millones de años de evolución. Los miembros de esta sociedad son altamente altruistas, y están dispuestos a dormir e incluso a suicidarse, en bien del organismo mayor (Anderson et al., 2001). La apariencia y comportamiento de las células está determinado por los genes expresados en la misma (Jones, 1999). El crecimiento de las células está regulado por la acción conjunta de los proto-oncogenes que promueven su desarrollo, y por la actividad de los genes supresores de tumores que lo inhiben (Weinberg, 1991). Los oncogenes son aquellos alelos variantes que tienen mutaciones activantes en las células cancerosas, mientras que los supresores de tumores son los genes que en el cáncer sufren mutaciones inactivantes en ambos alelos (pérdida de

heterocigocidad) (Fearon, 1997), y el comportamiento anormal de las células cancerosas puede explicarse en términos de cambios cuantitativos y/o cualitativos en el conjunto de genes activos (Jones, 1999).

En los tejidos normales el balance entre estos sistemas de proliferación y muerte celular, está fuertemente regulado. En la mayoría de los órganos existen poblaciones de células tallo que pueden diferenciarse para repoblar el tejido durante la homeostasis normal de éste, o tras sufrir algún daño. Al irse diferenciando estas células pierden su capacidad para proliferar y mueren, de tal suerte que, aunque diferentes tejidos tienen diferentes capacidades de auto-regeneración, el número neto de células en el cuerpo adulto normal se mantiene en un nivel relativamente constante (Corn, 2002).

En contraste, los tumores se desarrollan por un desbalance entre los procesos de proliferación y muerte celular. Dentro de las alteraciones clave en el desarrollo tumoral se encuentran la inmortalización y la transformación. La evidencia reciente sugiere que las células cancerosas sobreviven por una mayor proliferación y por una falla en la muerte celular programada (apoptosis), por lo que en un primer paso, estas células se vuelven inmortales. Posteriormente las células se transforman, para lo cual es necesaria la activación de oncogenes y la inactivación de vías inhibitoras del crecimiento (controladas por genes supresores de tumores) (Corn, 2002).

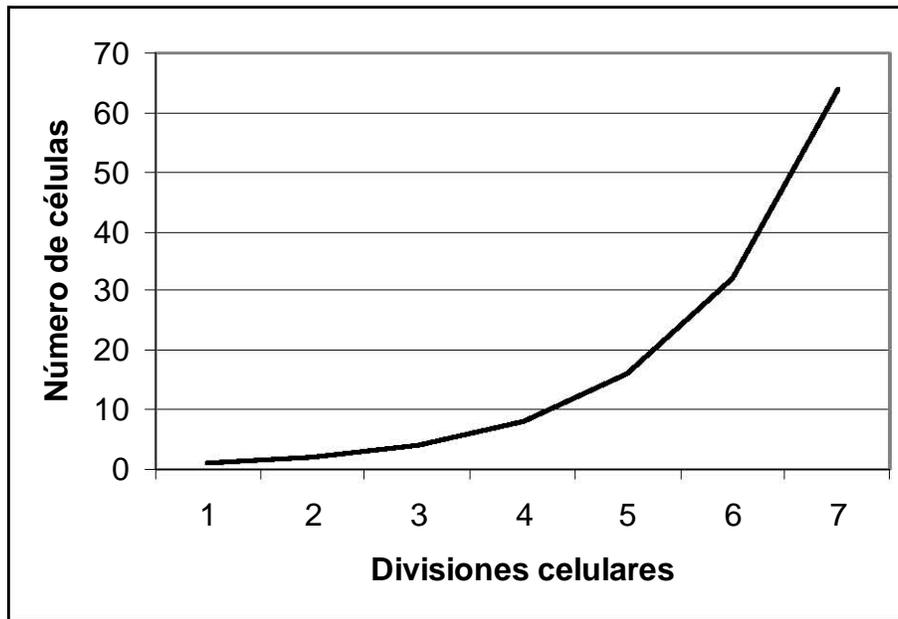
La transformación de una célula benigna en una maligna generalmente representa un proceso de varios años (siendo la excepción el retinoblastoma y otros cánceres infantiles) en que son necesarias diferentes alteraciones genéticas, y se calcula que para los más de 100 subtipos de cáncer, se deben alcanzar seis alteraciones esenciales en el proceso de malignización: autosuficiencia en la señalización del crecimiento; insensibilidad a las señales contra el crecimiento; resistencia a la apoptosis; potencial replicativo ilimitado; sostenimiento de la angiogénesis; y capacidad de invadir y realizar metástasis (Corn, 2002; Hemminki, 2001; Alberts et al., 1994).

En este contexto, una vez que una célula somática ha desarrollado un comportamiento “egoísta” debido a ciertas mutaciones, ésta y su descendencia comienzan a prosperar a expensas de sus células vecinas, pero al final destruyen toda la sociedad celular, llevando a la muerte del organismo (Alberts et al., 1994). El cáncer surge de la acumulación de mutaciones que promueven la selección de una clona celular que presenta un comportamiento agresivo cada vez mayor (Fearon, 1997).

Las células somáticas se multiplican mediante la mitosis, de tal forma que una célula madre se divide en dos células hijas. El caso de una célula cancerosa es el mismo, y de ella aparecerán otras dos, y de cada una de ellas otras dos. Es decir que, debido a sus características, el número de células cancerosas crecerá exponencialmente: 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, etc. (Figura 1). De continuar la tendencia, y tomando en cuenta que en el cuerpo humano existen entre  $3 \times 10^{12}$  y  $3 \times 10^{13}$  células somáticas (Ridley, 2001; Weinberg, 1996), en algún momento entre la 42ª y 46ª generación, todas las células del cuerpo serían cancerosas. No obstante, esto no ocurre porque el crecimiento exponencial de este tipo siempre encuentra algún obstáculo natural (Sagan, 1998). La historia evolutiva del cáncer se desarrolla durante varios años, durante los cuales surge una mezcla de células en cuyos genomas existen eventos mutacionales muy tempranos; tempranos; de rango medio; y tardíos. Dado que las mutaciones somáticas son aleatorias, muchas células hijas no serán viables o competitivas dentro de este contexto de selección natural (Anderson et al., 2001; Alberts et al., 1994) y se necesitarán muchas más duplicaciones para generar un tumor (Corn, 2002). Adicionalmente, debido a que muchos de los factores que contribuyen con tales cambios genéticos son ambientales, éstos están sujetos a la prevención (Alberts et al., 1994; Peto, 2001), de hecho, se estima que 90% de los cánceres humanos son influenciados por factores externos al individuo (Doll, 1981). De esta forma, la interacción de varios factores causativos, antagónicos y moduladores, afectan el desenlace de la aparición o no del cáncer (Soberón, 1996), así como su

progresión. Inclusive se calcula que cambiando varios comportamientos peligrosos (tabaquismo, dieta y estilo de vida), más de 200,000 vidas podrían salvarse anualmente del cáncer, aún si no se descubriesen nuevos tratamientos (Rennie, 1996).

Finalmente, al hacerse agresivo el cáncer y extenderse hacia otros tejidos, el organismo morirá mucho antes de que todas las células se vuelvan cancerosas, al verse seriamente afectado algún tejido y/u órganos necesarios para la supervivencia (Weinberg, 1996).



**Figura 1. Crecimiento exponencial en función del número de divisiones celulares**

Debido a que el proceso de mitosis produce dos células a partir de una, de volverse éstas inmortales, la población celular crecerá de manera exponencial.

En los cánceres esporádicos la inactivación de ambos alelos de los genes supresores de tumores ocurre somáticamente y se presume que la pérdida de heterocigocidad (LOH) brinda una ventaja en el crecimiento a la célula tumoral porque una mutación previa ha inactivado uno de los alelos del supresor. Consistente con la teoría de los dos eventos de Knudson, los cromosomas afectados por LOH generalmente albergan un gen supresor de tumores (Fearon, 1997), de los que hasta ahora, se han identificado cerca de 30 diferentes (Futreal et al., 2001). Esto significa que en este tipo de genes es necesaria una

pérdida de función para que se produzca cáncer. Este tipo de mutaciones son mucho más comunes en la predisposición genética, en relación con las mutaciones de ganancia de función, presumiblemente porque la pérdida de la función es enmascarada durante el desarrollo por el alelo normal, mientras que una mutación del otro tipo podría ser letal durante el desarrollo (Ponder, 2001).

A finales de los años 60 se habían identificado varios genes virales capaces de dirigir la transformación celular y posteriormente se encontraron análogos de éstos en el DNA de células normales. A estos genes celulares normales, capaces de regular el crecimiento y la diferenciación, se les llamó "proto-oncogenes", mientras que a sus contrapartes anormalmente activadas, caracterizadas por una ganancia de función, se les llamó "oncogenes" (Ponder, 2001). En contraste con los genes supresores de tumores, los oncogenes activados funcionan predominantemente en la célula y no es necesaria la mutación somática del segundo alelo para el desarrollo del cáncer (Fearon, 1997). Hasta la fecha se han identificado más de 100 de ellos (Fútrela et al., 2001). Existen cuando menos cuatro tipos diferentes de oncogenes: los receptores de señales externas de proliferación, cuyos productos se encuentran en la membrana celular; los que codifican señales de proliferación, secretadas al medio extracelular; los que intervienen en la transducción de las señales de proliferación; y los genes cuyos productos interactúan específicamente con el DNA estimulando la expresión génica, conocidos como factores de transcripción (Soberón, 1996).

Independientemente de si la primera mutación (que puede estar en la línea germinal, en los casos de síndromes familiares de cáncer) es en un supresor de tumores o en un oncogen, se requieren mutaciones adicionales para el desarrollo del cáncer (Fearon, 1997). La relación edad-incidencia y la evidencia experimental sugieren que el cáncer es una enfermedad de etapas múltiples (Hemminki, 2001; Land, 1983). De igual manera, se ha demostrado que, con pocas excepciones, los tumores son de origen monoclonal, es decir,

que provienen de una sola célula que sufrió una alteración genética que le permitió crecer más que sus vecinos (Hemminki, 2001; Alberts et al., 1994; Ponder, 2001). Los cánceres generalmente tienen muchas causas, y en general, se sabe que los genes involucrados pueden interactuar de forma ordenada o desordenada a lo largo de una vía poligénica del tipo:  $A \rightarrow B \rightarrow C \rightarrow D \rightarrow \dots$ . Adicionalmente, es posible que operen otras vías y que algunas se crucen con la anterior:  $A \rightarrow B \rightarrow L \rightarrow M \rightarrow \dots$ . De acuerdo con los diferentes estudios sobre las etapas necesarias para el desarrollo del cáncer, dependiendo del tipo y el tejido donde se inicie, son necesarias entre 3 y 7 alteraciones en los cánceres esporádicos, e incluso menos en los síndromes familiares (Hemminki, 2001). La proporción de mutaciones espontáneas en células humanas en cultivo es de aproximadamente  $2 \times 10^{-7}$  cambios por división celular. De conservarse esta proporción *in vivo*, cada célula acumularía sólo unas pocas mutaciones durante la vida del organismo (DePinho, 2000). A fin de que una célula cancerosa acumule las múltiples alteraciones genéticas requeridas para la tumorigénesis a lo largo de una sola vida humana, ésta debe volverse genéticamente inestable, es decir, tener un aumento sostenido en su proporción de mutaciones, en relación con las células normales no malignas. La inactivación de ciertos supresores de tumores, como APC (llamado así por la enfermedad asociada con su disfunción, Poliposis Adenomatosa del Colon) o p53, facilitan la proliferación de estas células, aunque esto no cause la inestabilidad genética *per se* (Lengauer, 2001). Estos genes generalmente se encargan de detener el ciclo celular en respuesta a daños en el DNA o a errores de replicación, dando tiempo para ser reparados antes de ser exacerbados o retenidos por la progresión del ciclo celular, por lo tanto, cualquier alteración en estos mecanismos puede resultar en una mayor velocidad de daño al DNA (Anderson, 2001), generando lo que se conoce como un “fenotipo mutador” (DePinho, 2000). En más de 70% de los tumores colorrectales se han encontrado mutaciones en los genes de APC y p53 (y del último en 55% de todos los cánceres humanos (Ridley, 2001)).

Sin embargo, se sabe que la inactivación de APC es uno de los primeros eventos en la progresión de este tipo de cáncer, mientras que la de p53 es un evento tardío (Alberts et al., 1994; Ridley, 2001). De esta forma, los genes supresores de tumores se pueden agrupar en dos tipos de acuerdo con sus características. Dentro del primer tipo se encuentran los genes cuya pérdida de función es el paso limitante para el desarrollo de cáncer, a los que se les ha llamado “porteros” (Ponder, 2001), estos genes regulan directamente el crecimiento tumoral, ya sea inhibiéndolo, o causando la muerte (Kinzler, 1997). Normalmente estos genes son responsables de mantener un número constante de células en poblaciones que se renuevan continuamente, asegurando que las células respondan adecuadamente a situaciones que requieren crecimiento celular neto, tal como el daño tisular (Kinzler, 1996). El segundo grupo contiene genes cuya pérdida de función acelera la adquisición de eventos (incluso mutaciones en los porteros (Kinzler, 1997)), debido a que están involucrados en la reparación del DNA y el mantenimiento de la integridad genómica, por lo tanto, no promueven directamente la neoplasia (Kinzler, 1997), y son llamados “guardianes” (Ponder, 2001). Un ejemplo típico de este tipo es el gen p53 (Aranda-Anzaldo et al., 1999; Xu et al., 1999).

En conjunto, los genes supresores de tumores constituyen puntos clave en muchas vías celulares complejas que regulan la proliferación, diferenciación, apoptosis, y respuesta al daño genético (Haber, 1997).

## HISTORIA NATURAL DEL CÁNCER

“Por mí se llega a la ciudad del llanto;  
por mí a los reinos de la eterna pena,  
y a los que sufren inmortal quebranto.”

DANTE ALIGHIERI. “LA DIVINA COMEDIA” (INFIERNO, III, 1), 1307.

“Dado semejante lapso, lo “imposible” se vuelve posible,  
lo posible, probable y lo probable, virtualmente seguro”

STEPHEN JAY GOULD. “EL PULGAR DEL PANDA”. 1980.

Una sola mutación no es suficiente para convertir a una célula saludable en una cancerosa que prolifere sin reparos (Alberts et al., 1994), y se ha demostrado que la activación de un oncogen es necesaria pero no suficiente para la tumorigénesis, es decir, que los oncogenes ejercen un efecto proliferativo no neoplásico que requiere de la colaboración de otros eventos genéticos (Sinn et al., 1987; Kinzler, 1996). Esta noción es apoyada por los estudios epidemiológicos que demuestran que la incidencia de cáncer es una función de la edad (Alberts et al., 1994; DePinho, 2000; Land, 1983). Tal hipótesis también es sustentada por el fenómeno de la progresión tumoral, donde un desorden moderado inicial en el comportamiento de una célula evoluciona gradualmente hasta un cáncer completo (Alberts et al., 1994).

Para aquellos cánceres que tienen una causa externa discernible se observa un tiempo de “incubación” de varios años, desde la exposición al carcinógeno hasta el desarrollo de la enfermedad. Durante este tiempo las células prospecto para el cáncer acumulan una serie de cambios, reflejados en nuevos fenotipos correlacionados con las etapas tempranas de la historia de la enfermedad (Alberts et al., 1994; Peto, 2001; Land, 1983).

Dentro de este modelo de carcinogénesis en pasos múltiples, cada paso requiere de la activación (o inactivación) de un gen distinto, y el fenotipo final podría necesitar la

expresión concomitante de varios de los genes previamente activados. Cada uno de estos pasos deriva de una alteración genética de baja probabilidad (Land, 1983; Sinn et al., 1987). Sin embargo, varios estudios sugieren que no es solamente la acumulación de mutaciones, sino el orden en que éstas ocurren, lo que determina la propensión a la neoplasia, y que sólo un subgrupo de genes que pueden alterar el crecimiento celular puede iniciar el proceso neoplásico (Kinzler, 1996).

Los carcinomas y tumores sólidos derivan de epitelios, en los que normalmente se encuentran varias capas celulares, de las cuales, la encargada de la proliferación es la capa basal (la más profunda). En ésta, las nuevas células epiteliales son generadas por mitosis y posteriormente migran hacia la superficie, diferenciándose paulatinamente en células aplanadas ricas en queratina, incapaces de dividirse (Alberts et al., 1994).

Cuando en una de las células basales normales ocurre una mutación somática (por ejemplo LOH del portero *APC* (Kinzler, 1997)) (Figura 2A), la proporción de divisiones celulares puede verse incrementada en esta célula, en relación con la pérdida celular. Esto da lugar a un epitelio hiperproliferativo caracterizado por una hiperplasia (Figura 2B) en que las células alteradas descendientes de aquélla continúan teniendo una apariencia normal (células naranjas en la figura) (Weinberg, 1996). En algún momento, una de estas células puede sufrir un nuevo cambio genético (célula rosa en la figura 2B), aumentando la falta de control en el crecimiento (Weinberg, 1996), con lo que se alcanza una etapa de displasia (Figura 2C), en que las células capaces de dividirse ya no están confinadas a la capa basal y existe algún desorden en el proceso de diferenciación, habiendo células en diferentes etapas del mismo (Alberts et al., 1994). Éstas aún parecen normales en cuanto a su forma y orientación (Weinberg, 1996).

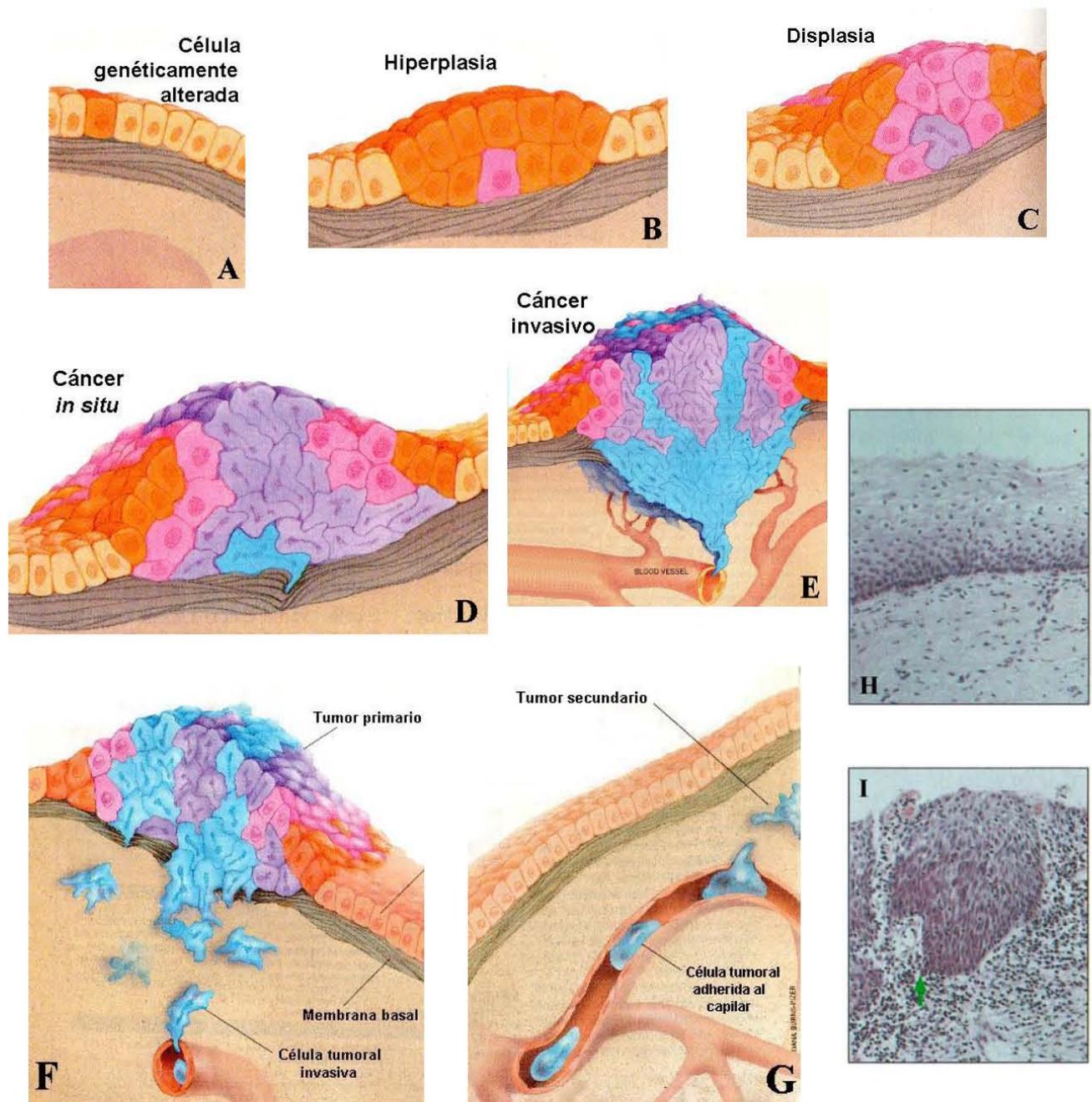
De continuar la progresión, por acumulación de nuevas lesiones genómicas como activaciones de oncogenes y/o pérdidas de supresores de tumores (célula violeta en la figura 2C), aparecerá un carcinoma *in situ* (Figura 2D), en el cual las células se vuelven

más anormales en crecimiento y forma (Weinberg, 1996). Mientras todas las células neoplásicas permanezcan unidas en una sola masa se dice que el tumor es benigno, y puede alcanzarse una cura completa con la remoción quirúrgica del mismo (DePinho, 2000). Sin embargo, existe evidencia reciente que sugiere que las células tumorales epiteliales son capaces de diseminarse a órganos secundarios en una época temprana del desarrollo del tumor primario, y que es posible detectarlas en la médula ósea de los pacientes al momento en que se realiza la remoción quirúrgica del tumor, y aún antes de haber metástasis manifiestas. Adicionalmente, el potencial proliferativo de las mismas se correlaciona con el avance de la enfermedad (Solakoglu et al., 2002).

En la etapa de carcinoma *in situ* es fundamental que la célula maligna sea capaz de instruir al hospedero para establecer un ambiente permisivo para el crecimiento y mantenimiento tumorales, incluyendo instrucciones para formar nuevos vasos sanguíneos, o ignorar los antígenos asociados con el tumor, para permitirle escapar de la vigilancia del sistema inmune (DePinho, 2000). La neovascularización es un paso crucial en la transición desde un pequeño grupo de células hasta un crecimiento maligno capaz de diseminarse por el cuerpo. Una vez que un carcinoma *in situ* ha alcanzado cierto tamaño, éste deja de crecer y llega a un estado estable en que el número de células que muere contrarresta el número de células proliferativas (Folkman, 1996) y que mantiene un borde claramente demarcado (Liotta, 1992). Tras meses o años en este estado, el tumor puede inducir el crecimiento de capilares y comenzar a invadir el tejido adyacente; el tumor comienza a expandirse rápidamente y, al parecer, una vez que un tumor se vuelve angiogénico tiende a permanecer así (Folkman, 1996).

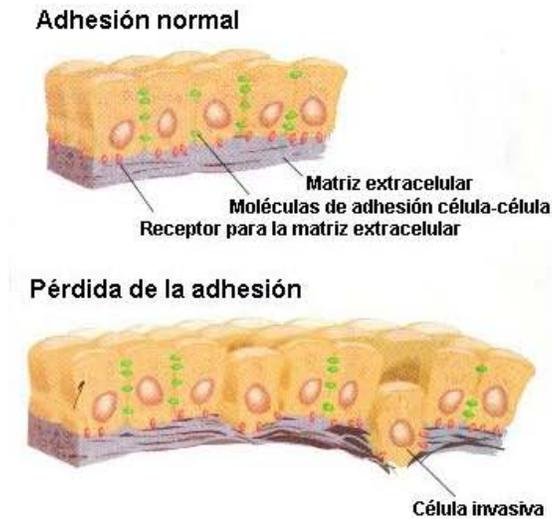
De acumularse más mutaciones (células azules en la figura 2D), el carcinoma *in situ* progresará a un carcinoma maligno o invasivo (Figura 2E), es decir, que las células cancerosas adquieren la capacidad de invadir el tejido vecino. Esta invasividad implica la habilidad de liberarse entre sí (Alberts et al., 1994; Ruoslahti, 1996) y también de la matriz

extracelular (Ruoslahti, 1996), y cruzar la lámina basal (lo que implica la liberación de metaloproteinasas para disolver la membrana basal) a fin de comenzar a invadir el tejido conectivo subyacente (Alberts et al., 1994; Ruoslahti, 1996). El borde del tumor deja de estar bien definido, formando un frente de invasión caracterizado por la ruptura de la membrana basal (Liotta, 1992) (Figura 2E, 2F, 2G y 2I; Figura 3). En condiciones normales, este desprendimiento enviaría una señal a la célula para realizar apoptosis, pero parece que algunos oncogenes pueden enviar mensajes falsos al núcleo, evitando el arresto del crecimiento o el suicidio (Ruoslahti, 1996). Dado que los vasos sanguíneos recientemente formados en los tumores son muy permeables, las células malignas pueden cruzar sus paredes fácilmente (Liotta, 1992) (Figura 2F) para diseminarse a través del sistema circulatorio a diferentes órganos y así formar tumores secundarios o metástasis (Figura 2G).



**Figura 2. Progresión del cáncer**

A. El desarrollo del cáncer inicia con una mutación en una célula somática (naranja), que se encuentra dentro de una población normal (beige). B. La célula alterada y su descendencia comienzan a reproducirse en exceso, y una de éstas sufre una nueva alteración (rosa). C. Las células siguen creciendo y en algún punto una adquiere otra mutación (violeta). D. Las células comienzan a adquirir un crecimiento y forma más anormales. El tumor aún no rompe ninguna barrera entre tejidos y puede permanecer así hasta sufrir otra mutación (azul). E. Si el cambio permite a las células volverse invasivas, éstas traspasan la membrana basal; nótese la heterogeneidad celular, reflejo de la genética. F. Las células malignas entran a la circulación y se diseminan por el cuerpo (metástasis). G. Se forman tumores secundarios. H. Epitelio cervical normal. I. Carcinoma cervical que ha comenzado a ser invasivo (flecha verde). (A-G, tomadas y modificadas de Weinberg, 1996. H e I, tomadas de Alberts et al., 1994).



**Figura 3. Pérdida de la adhesión celular**

Una vez que una célula es capaz de liberarse de sus vecinas y de la matriz extracelular, puede dirigirse a otros tejidos volviéndose invasiva (Tomado y modificado de Ruoslahti, 1996).

En varios tipos de cáncer se ha encontrado que la pérdida de la adhesión celular en el epitelio depende de la pérdida de expresión de la molécula de adhesión célula-célula E-cadherina (Alberts et al., 1994; Ruoslahti, 1996), en especial, en el frente de invasión del tumor (Bienz, 1999). Adicionalmente, se ha demostrado que la invasividad de células tumorales puede suprimirse mediante la sobreexpresión de E-cadherina (Sadot et al., 1998; Ruoslahti, 1996). Se ha sugerido que esta adhesión celular puede estar regulada por los niveles de  $\beta$ -catenina (Hinck et al., 1994), ya que dicha proteína es capaz de asociarse con los dominios intracelulares de E-cadherina, y servir de ancla entre ésta y el citoesqueleto de actina (Shapiro, 2001; Hülsken et al., 1994; Wijnhoven, 1999). Por otro lado, evidencia experimental sugiere que la alteración de ciertos componentes del citoesqueleto de actina puede contribuir con la transformación celular (Pawlak, 2001).

Una vez que el cáncer se extiende a otros tejidos (metástasis; meta = más allá; estasis = inmovilidad, término acuñado en 1829 por Joseph Claude Recamier (Liotta, 1992)), se vuelve muy difícil de erradicar por cirugía o radiación localizada (Alberts et al., 1994) y es esta diseminación a tejidos distantes lo que hace tan letal al cáncer (Ruoslahti, 1996), de

hecho, cuando un tratamiento falla, la metástasis es la primer causa de muerte (Liotta, 1992).

Habiendo atravesado la lámina basal, las células cancerosas deben alcanzar un vaso sanguíneo y entrar a la circulación, recorrer el cuerpo, y salir de la misma en algún tejido (Alberts et al., 1994; Ruoslahti, 1996). En cada uno de estos pasos las células invasivas deben escapar a varios mecanismos de control que mantienen a las células normales en su lugar (Ruoslahti, 1996), de tal suerte que sólo menos de una en 10,000 células tumorales que abandonan el tumor primario sobreviven hasta establecer nuevas colonias tumorales; de ahí que este sea considerado como un proceso activo y no como una consecuencia accidental del crecimiento del tumor (Liotta, 1992).

Diferentes tipos de cáncer tienen sitios metastásicos favoritos, por ejemplo, el cáncer de pecho tiene una especial predilección por realizar metástasis hacia el hueso (Henderson et al., 2001). Esta atracción órgano-específica parece estar dirigida por la expresión de receptores para determinadas quimiocinas en la superficie de las células metastásicas (Moore, 2001). Una vez que estas células se establecen en otro tejido forman tumores secundarios (Alberts et al., 1994). Algunas de las metástasis contienen células que ya son angiogénicas y crecerán rápidamente. No obstante, algunas metástasis contendrán células no angiogénicas y permanecerán durmientes por años, volviéndose angiogénicas tras haber sido tratado o eliminado el tumor original (Folkman, 1996). Una colonia angiogénica se expandirá sólo si la angiogénesis asegura la nutrición. El tumor secundario formado tendrá entonces su propio suplemento vascular y podrá volverse una nueva fuente de células tumorales circulantes. Por lo tanto, las colonias metastásicas pueden hacer metástasis, acelerando así la deterioración del paciente (Liotta, 1992).

## MUTACIONES

“Los secretos de la evolución son la muerte y el tiempo [...] tiempo para la lenta acumulación de pequeñas mutaciones que eran *accidentalmente* adaptativas [...] Somos como mariposas que revolotean un solo día y piensan que aquello lo es todo.”

CARL SAGAN. “COSMOS”, 1980.

“- Mi procesamiento de información es perfectamente normal. Si compruebas mi registro, lo encontrarás completamente exento de error.

– Lo sé todo sobre tu registro de servicio, Hal... pero ello no prueba que tengas razón esta vez.

Cualquiera puede cometer errores...

– No quiero insistir en ello, Dave, pero yo soy incapaz de cometer un error. “

ARTHUR C. CLARKE. “2001 UNA ODISEA ESPACIAL”. 1968.

En 1953 Watson y Crick publicaron la estructura molecular del DNA. Ya desde entonces se sabía que una base purínica siempre se encuentra unida a una pirimidínica a través de puentes de hidrógeno, de tal suerte que los pares formados son: adenina (purina) con timina (pirimidina), y guanina (purina) con citosina (pirimidina). Este apareamiento de bases sugirió a estos autores un posible mecanismo de copiado para el material genético (Watson, 1953), ya que éste se encuentra formado por dos cadenas, y la secuencia de una es complementaria a la de la otra, siendo el orden de las bases el código que porta la información genética. Conociendo la secuencia de una cadena, se puede determinar la de la segunda (Watson, 1953). Durante el proceso de duplicación del DNA (replicación), la doble cadena se desenrolla y cada una de las cadenas sirve como templado (a través del apareamiento con desoxirribonucleótidos trifosfato) para la síntesis de la nueva cadena complementaria. La replicación del DNA está acoplada con la división celular ya que una célula no replica su DNA hasta que está lista para dividirse (Ritter, 1996; Watson, 1953).

Por definición, una mutación es una alteración en la secuencia de nucleótidos en el DNA y puede originarse por una agresión a la molécula (química, física o biológica), o por errores en el proceso de duplicación (Rawn, 1989). Estos son eventos estadísticamente aleatorios, así como el proceso mutacional, en el sentido de que las mutaciones tienen lugar independientemente de si éstas confieren o no una ventaja adaptativa al organismo en su ambiente (Hartl, 1996).

Las mutaciones que afectan uno o pocos pares de nucleótidos (mutaciones puntuales) caen en dos categorías generales: sustituciones y cambios en el marco de lectura (Tabla1). Existe una tercer categoría más diversa, de macrolesiones, que incluye alteraciones severas como translocaciones, inversiones, deleciones, inserciones o alteraciones en el número cromosómico (Davis, 1998).

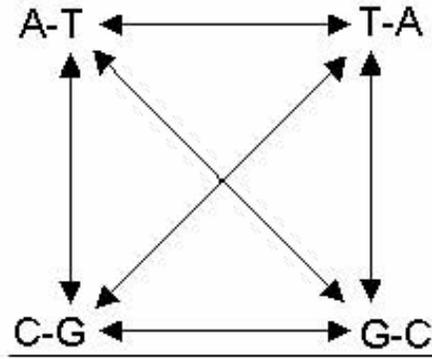
**Tabla 1. Mutaciones puntuales**

La sustitución de bases corresponde al cambio de una base por alguna de las otras tres. Los efectos de las sustituciones son diversos dependiendo de las características del aminoácido resultante y del contexto de los demás residuos. Los efectos de los cambios en el marco de lectura son severos, ya que resultan en una proteína alterada (tomado y modificado de Davis, 1998).

<b>Tipo de mutación</b>	<b>Subclase</b>	<b>Alteración genética</b>	<b>Efecto(s)</b>
Substitución de bases	Transición	Purina a Purina Pirimidina a Pirimidina	Sin sentido (terminación de la cadena) Mal sentido (posible proteína defectuosa)
	Transversión	Purina a Pirimidina Pirimidina a Purina	Mismo sentido (sin efecto)
Cambio en el marco de lectura	Adición	Cambia la longitud del DNA y mRNA en 1-4 nucleótidos	Fuera de marco: el ribosoma no lee el código normal para la proteína
	Delección		En marco (+3 o -3 nucleótidos): adición o delección de un aminoácido con posibles cambios

Las sustituciones de los pares de bases pueden ser de dos tipos, dependiendo del tipo de base inicial y final (Tabla 1), de tal forma que se puede hablar de transiciones y

transversiones. Es importante notar que para fines de secuencia en el DNA, en el caso de las últimas, A-T no es equivalente a T-A, así como C-G no lo es de G-C (Figura 4). Los efectos de estas mutaciones dependen del tipo y sitio particulares en que se den (Figura 4).



**Figura 4. Substituciones de pares de bases**

Las diagonales en la caja representan las transiciones;  
los lados representan las transversiones (tomado de Davis, 1998).

Los cambios en el marco de lectura (Figura 5) son adiciones o deleciones de uno a cuatro pares de nucleótidos consecutivos en la molécula de DNA. Cuando involucran 1, 2 o 4 pares, se obtienen marcos de lectura anormales y el mRNA es leído incorrectamente después del sitio de la mutación. Usualmente la cadena es terminada prematuramente por la formación de un codón de paro dentro del nuevo marco (UAA, UGA, o UAG). Cuando ocurren mutaciones de +3 o -3 nucleótidos, sencillamente se adiciona o se elimina un aminoácido de la proteína, lo que puede tener un efecto moderado o severo, dependiendo del sitio de la proteína en el que ocurre (Davis, 1998).

Nativa	ACC CAC UCU GGA UUG AAG GCA thr his ser gly leu lys ala
Mismo sentido	ACC CAU UCU GGA UUG AAG GCA thr <i>his</i> ser gly leu lys ala
Mal sentido	ACC CAC UCU GUA UUG AAG GCA thr his ser <i>val</i> leu lys ala
Sin sentido	ACC CAC UCU UGA UUG AAG GCA thr his ser <i>stop</i>
Cambio marco lectura (-1)	ACC ACU CUG GAU UGA AGG CA thr <i>thr</i> leu asp stop
Cambio marco lectura (+1)	ACC CAA CUC UGG AUU GAA GGC A thr <i>glu</i> leu trp ile <i>glu</i> gly

**Figura 5. Mutaciones y sus efectos**

Las mutaciones (asteriscos) en una secuencia de DNA y sus efectos (itálicas) sobre la correspondiente secuencia de aminoácidos (tomado y modificado de Davis, 1998).

La exactitud en la replicación del DNA depende de la correcta formación de puentes de hidrógeno entre la nueva base y la de la cadena templado. Cuando se considera que las bases pueden existir (aunque transitoriamente) en otras formas tautoméricas, es posible, por ejemplo, que en lugar de un par normal dC-dG, una dT en la cadena templado pueda unirse por puentes de hidrógeno con la forma tautomérica de la dG. La inserción de la misma sería un error de replicación que llevaría a una mutación. Con base en la vida esperada de las formas tautoméricas, estos errores ocurrirían cada  $10^4$  o  $10^5$  nucleótidos replicados, aunque experimentalmente se ha demostrado que ocurren con mucha menor frecuencia, habiendo cerca de un error cada  $10^9$  nucleótidos replicados. La razón de esta discrepancia es la habilidad de las células para detectar y corregir tales errores antes de que éstos sean perpetuados en la nueva cadena. (Blackburn, 1996; Watson, 1953).

Independientemente de estos mecanismos naturales (espontáneos) de mutación, existen otros factores que pueden contribuir con la inducción de mutaciones en el DNA. A los agentes que tienen tal capacidad se les llama mutágenos o carcinógenos. Dentro de

éstos, se puede hablar de tres categorías generales de acuerdo con su origen: mutágenos químicos, físicos, y biológicos.

### **Mutágenos químicos.**

Dentro de esta categoría se encuentran todos aquellos compuestos sintéticos y naturales que pueden interactuar con las bases del DNA y producir un cambio en la estructura química de las mismas, o un error en la interacción por puentes de hidrógeno (Blackburn, 1996).

Dentro de esta misma clasificación caen aquellos carcinógenos que como primer paso son metabólicamente activados *in vivo* para dar lugar a electrófilos que se unen covalentemente con diferentes moléculas, incluyendo el DNA. La mayoría de estas reacciones son llevadas a cabo por las oxidasas citocromo P-450, tal es el caso del benzo[*a*]pireno (presente en los productos de calcinación, como el humo del tabaco) (Blackburn, 1996). De acuerdo con varios estudios epidemiológicos, el tabaquismo ha sido clasificado como uno de los principales carcinógenos, siendo responsable por cerca de 30% de las muertes por cáncer (Peto, 2001; Trichopoulos, 1996).

Cabe mencionar que, con base en el conocimiento de los agentes sintéticos capaces de dañar al DNA, se han diseñado diferentes fármacos anticancerígenos cuya acción depende de la inducción de un gran daño genético al DNA de las células tumorales, con la subsecuente activación de los mecanismos apoptóticos (Blackburn, 1996; Corn, 2002).

### **Mutágenos físicos.**

El grupo de los mutágenos físicos incluye a todas las formas de radiación ionizante. La materia es radiactiva cuando los núcleos atómicos emiten partículas subnucleares, o radiación electromagnética característica. Cuando la radiación incide sobre algún electrón de los átomos que atraviesa, una cantidad de su energía es transferida al electrón, el cual,

es disparado del átomo en forma de un ion negativo. El átomo permanece como un ion positivo, formándose un par iónico (Navarrete, 1993).

Dentro de las radiaciones ionizantes más conocidas se encuentran aquellas producidas por el decaimiento de elementos radiactivos, y la radiación ultravioleta proveniente del sol, en particular los rayos ultravioleta B de alta frecuencia (responsables por más de 90% de los cánceres de piel) (Trichopoulos, 1996; Leffell, 1996), que producen dímeros entre bases adyacentes de pirimidinas (residuos de C o T) (Alberts et al., 1994; Leffell, 1996).

### **Carcinógenos biológicos.**

Los carcinógenos biológicos son básicamente de dos tipos: los endógenos y los exógenos. Los primeros se refieren a aquellos producidos en el cuerpo como resultado natural del envejecimiento y de los procesos biológicos normales, a través de la formación de radicales libres (Trichopoulos, 1996). Un radical libre es un átomo o una molécula que contiene uno o más electrones no apareados y que por tanto busca alcanzar la estabilidad donando o adquiriendo un electrón de moléculas adyacentes, lo que hace a estas entidades químicas altamente reactivas (Salvemini, 1994). Los radicales libres juegan diversos papeles biológicos tales como la regulación de procesos bioquímicos, ya que pueden ser empleados dentro de varias reacciones enzimáticas. Sin embargo, las células y tejidos poseen varios mecanismos para controlar la generación aberrante de estas especies reactivas, ya que un exceso de las mismas es capaz de dañar a la célula al reaccionar con diversas macromoléculas, entre las que se cuentan el DNA y varias proteínas celulares (Rice-Evans, 1993), de hecho, estas especies químicas se han asociado con varias enfermedades relacionadas con la edad, incluyendo el cáncer (Bianchini, 2001), y es bien sabido que el estrés oxidativo ataca la integridad del DNA (Aitken, 2001).

Los ácidos grasos tienen una relativa propensión a sufrir el ataque por radicales libres y convertirse ellos mismos en radicales libres, extendiendo el daño bioquímico hacia diferentes regiones celulares (Rice-Evans, 1993), por ello, no resulta sorprendente que la dieta juegue un importante papel en el desarrollo del cáncer, habiendo una asociación entre esta enfermedad y una dieta rica en grasas animales (saturadas) (Trichopoulos, 1996). De hecho, actualmente existe un consenso de que el cáncer es más común en personas con sobrepeso (Peto, 2001) u obesidad.

De acuerdo con varias estimaciones epidemiológicas, aún en un mundo libre de influencias externas (carcinógenos), una cuarta parte de los cánceres existentes se desarrollarían debido a la producción endógena de carcinógenos y por la ocurrencia de errores genéticos no reparados (Trichopoulos, 1996; Peto, 2001). Considerando esto, un individuo podría tener una mayor susceptibilidad al cáncer si hereda variantes genéticas normales que hacen que su cuerpo elimine ciertos carcinógenos menos eficientemente (Trichopoulos, 1996). La deficiencia en estos mecanismos de detoxificación que remueven radicales libres o subproductos del oxígeno, deja a las células incapaces de responder al estrés oxidativo, lo que se ha asociado con una propensión al desarrollo de malignidades (Strathdee y et al., 1992).

Diversos antioxidantes dietarios, como las vitaminas E y C, los carotenoides, y el selenio, han demostrado jugar un importante papel en la reducción del riesgo de cáncer. Otros micronutrientes como el zinc, cobre, manganeso, hierro, y el mismo selenio, son coenzimas clave de enzimas antioxidantes. Por otro lado, compuestos de origen vegetal como los flavonoides, también poseen una importante actividad antioxidante, de tal suerte que se ha demostrado que la cocoa, el vino tinto, el té verde, y el té negro tienen la capacidad de reducir significativamente la oxidación. De igual manera, una dieta rica en ajo y cebolla se asocia con una menor tasa de cáncer estomacal (Borek, 1997).

En cuanto a los carcinógenos biológicos externos, se tiene que los virus (y algunas bacterias como *Helicobacter pylori* (Bianchini, 2001)) pueden contribuir con el desarrollo de cáncer humano mediante una variedad de mecanismos que van desde la estimulación genética de la proliferación de la célula hospedera, hasta la inmunosupresión inducida por el virus, que permita la emergencia de tumores no relacionados directamente con el virus supresor (zur Hausen, 1991).

Los virus Epstein-Barr (EBV), de la hepatitis B (HBV), varios papilomavirus (HPV), y el virus humano de leucemia-linfoma de células T (HTLV-I), se han ligado consistentemente a malignidades específicas. Ninguna de estas infecciones es suficiente *per se* para producir cáncer. Sin embargo, los cánceres humanos asociados con virus son responsables de alrededor de 15% de la incidencia total de cáncer (zur Hausen, 1991; Trichopoulos, 1996).

## CÁNCER CERVICOUTERINO

“Los virus [...] son sólo máquinas, sutiles, seguro, pero estrictamente mecánicas, [...] son tiburones moleculares, un motivo sin una mente. Compacto, fuerte, lógico, totalmente egoísta, el virus está dedicado a hacer copias de sí mismo.”

RICHARD PRESTON. “THE HOT ZONE”. 1994.

“Los problemas que surgen durante la conquista, en parte son la consecuencia de las nuevas leyes y formas de organización que es obligado implantar para sostener su estado y su seguridad”

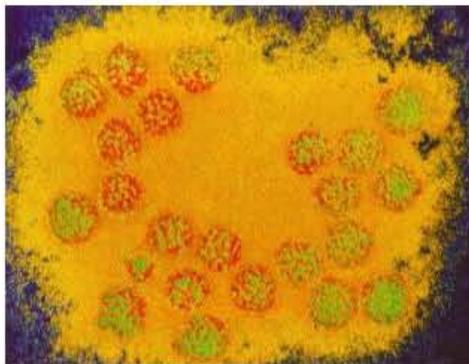
NICOLÁS MAQUIAVELO. “EL PRÍNCIPE”. 1532.

Aunque existían indicios que apuntaban hacia la existencia de un agente infeccioso como etiología del cáncer cervicouterino, por ejemplo, el bajo riesgo entre monjas católicas (Fraumeni y et al., 1969), la primer pista concreta surgió en el año de 1909, cuando Peyton Rous demostró que un pollo con un tipo de cáncer llamado sarcoma podía transmitir la enfermedad a un pollo sano. Su trabajo no fue tomado en cuenta en un principio porque no se tenía evidencia de que el cáncer fuese contagioso. Sin embargo, en el decenio de 1970 se descubrió una cepa de virus de cáncer animal, u oncovirus, que resultó ser el propio virus del sarcoma de Rous. Finalmente, a los 86 años, Rous recibió el premio Nobel. En poco tiempo comenzaron a descubrirse oncovirus humanos y se hizo patente que clases enteras de cáncer, tal como el cervical, tenían como etiología una infección viral (Ridley, 2001).

Al secuenciar el genoma del virus del sarcoma de Rous se encontró que éste portaba un oncogen, conocido hoy en día como *src*. Inmediatamente se descubrieron otros oncogenes procedentes de otros oncovirus. En 1975 se observó que el *src* no era un gen

viral, sino que es un gen que se encuentra en los pollos, los ratones, e incluso los humanos, sugiriendo que el virus del sarcoma de Rous robó su oncogen a uno de sus hospederos (Ridley, 2001). En los genomas de varios retrovirus (como el HTLV) se han encontrado oncogenes y se ha demostrado que estas secuencias transformantes son de origen humano, y cercanamente homólogas a las encontradas en el DNA humano (Goldfarb et al., 1982). Desde entonces se han identificado varios oncogenes virales (del poliomavirus, SV40, adenovirus, papilomavirus, etc.) capaces de inducir varios cambios en el fenotipo de las células, incluyendo la inmortalización, secreción de factores de crecimiento, pérdida de la inhibición por contacto, crecimiento independiente de anclaje, y transformación morfológica (Whyte et al., 1988).

A diferencia de muchos otros tipos de cáncer, en los que múltiples factores ambientales, biológicos y de estilo de vida contribuyen independiente o conjuntamente con la carcinogénesis, se ha demostrado que el cáncer cervical tiene un agente causante central, el virus humano del papiloma (HPV) (Figura 6), cuya contribución al riesgo de esta enfermedad es mucho mayor que la de cualquier otro factor (Franco, 1999).



**Figura 6. Virus humano del papiloma**

El virus de DNA, HPV, es el agente etiológico del cáncer cervicouterino, en particular, los tipos de alto riesgo (Tomado de Trichopoulos, 1996).

Los papilomavirus son un grupo de virus epiteliotrópicos que producen lesiones benignas de la piel (verrugas) y las membranas mucosas (condilomas), así como malignidades epiteliales (Lowy, 2001; White, 1994). En el siglo XIX se consideraba que las verrugas genitales eran alguna forma de sífilis o gonorrea y su naturaleza viral fue demostrada a principios del siglo XX cuando se observó que filtrados de las lesiones, libres de células, eran capaces de transmitir la enfermedad (Lowy, 2001).

Los papilomas son lesiones epiteliales benignas que surgen tras un periodo variable de latencia que va de semanas a meses. Estos pueden desarrollarse en prácticamente cualquier epitelio escamoso estratificado (ya sea la piel o las membranas mucosas). El virus debe infectar las células que posean una capacidad proliferativa a más largo plazo y por lo tanto, es probable que en el momento de la inoculación sea necesario un trauma en las capas superiores del epitelio debido a que las células proliferativas están localizadas en la capa basal del mismo (Lowy, 2001).

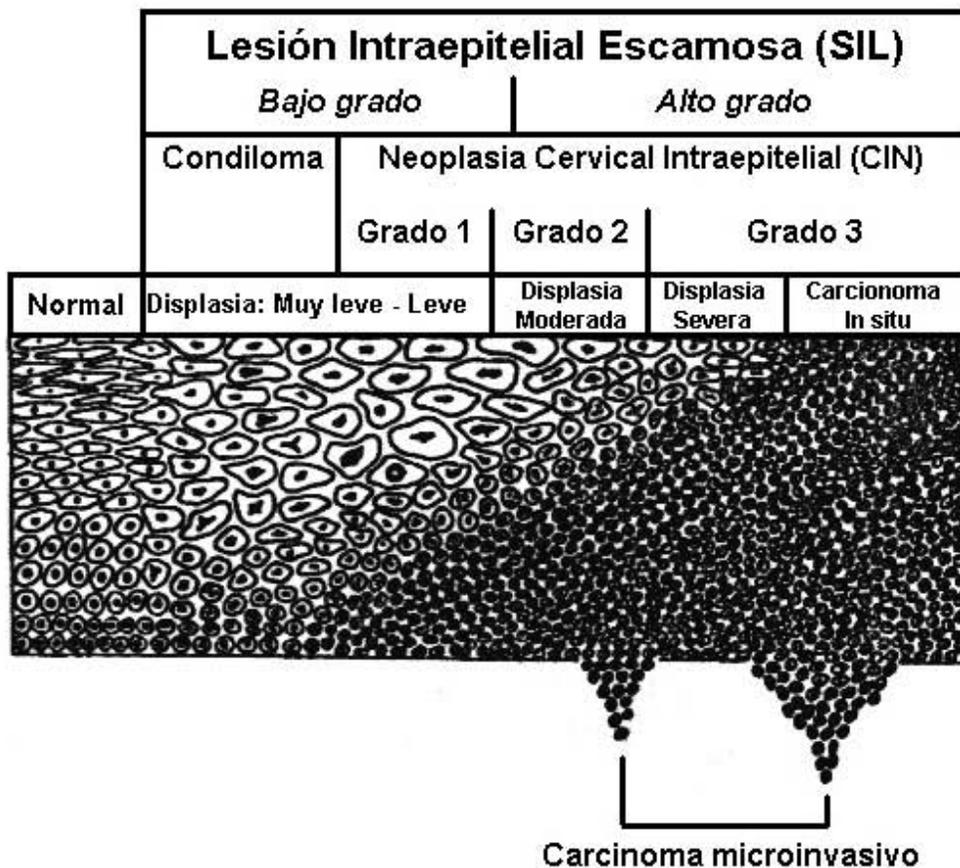
Las capas más profundas albergan pequeños números de genomas virales y transcriben bajas cantidades de RNA viral. La replicación vegetativa del DNA, la elevada expresión de proteínas virales y el ensamblaje de los virus, ocurre en las capas superiores que sufren una diferenciación terminal. El ensamblaje ocurre en el núcleo, donde los viriones generalmente permanecen aún después de que las células han sido descamadas al medio ambiente (Lowy, 2001; White, 1994).

El largo intervalo entre la infección inicial y el desarrollo del cáncer implica que factores adicionales al HPV juegan importantes papeles para la progresión hacia la malignidad. La exposición de las lesiones a co-carcinógenos, así como una función inmune celular defectuosa, se asocian con un mayor riesgo de infección persistente y progresión a altos grados de displasia (Lowy, 2001).

La displasia cervical, también conocida como lesión escamosa intraepitelial (SIL por sus siglas en inglés) en citología, o neoplasia cervical intraepitelial (CIN) en histopatología,

puede clasificarse en los grados I, II, y III. Este sistema de graduación asume que la severidad de la CIN representa un continuo morfológico y biológico de etapas progresivas que pueden llevar al desarrollo de un carcinoma escamoso invasivo (Ho et al., 1995). La severidad de la lesión se determina de acuerdo con el grado en el que el epitelio escamoso es reemplazado por células basaloides (Lowy, 2001) (Figura 7).

La mayoría de los cánceres ocurren en la zona de transformación del cérvix, donde las células columnares del endocérnix forman una unión con el epitelio escamoso estratificado del exocérnix. Debido a ello, cerca de 85% de los cánceres cervicales son cánceres de células escamosas, y la mayoría de los otros casos son adenocarcinomas, con un pequeño número de tumores neuroendocrinos de células pequeñas (Lowy, 2001).



**Figura 7. Precursores del carcinoma escamoso cervical**

Representación esquemática de los diferentes estadios precursores del cáncer cervical y las terminologías usadas para referirse a ellos (tomado y modificado de Lowy, 2001).

A través de un gran número de estudios epidemiológicos se ha establecido que la displasia cervical es una lesión asociada con el HPV (Ho et al., 1995; Hildesheim et al., 1994), en particular con los tipos que, debido a su frecuente detección en los cánceres cervicouterinos, se les ha denominado “oncogénicos” o de alto riesgo. (Villa et al., 2000; Wallin et al., 1999; Liaw et al., 1999; Ho et al., 1998; zur Hausen, 1991; Kessis et al., 1993). Debido a esto, se considera que la asociación entre la infección por HPV y el desarrollo de SIL es de tipo causal (Liaw et al., 1999).

El cáncer cervical es el tercero más común entre las mujeres alrededor del mundo, con cerca de 400,000 nuevos casos diagnosticados por año (Lowy, 2001). La proporción de supervivencia a 5 años para el cáncer cervical en los Estados Unidos (es decir, la cantidad de pacientes que sobreviven en 5 años, en comparación con una población libre de cáncer) es de 68.3% para todas las etapas; 90.9% para el localizado; 49.9% cuando existe una diseminación local; y 8.6% cuando hay metástasis (Editorial board, 1996), lo cual pone de manifiesto la importancia de un diagnóstico y tratamiento tempranos.

Se ha demostrado que las infecciones por HPV, o al menos el tiempo durante el cual puede detectarse el virus, son transitorios (Woodman et al., 2001; Ho et al., 1998; Hildesheim et al., 1994), probablemente debido a que el hospedero es capaz de suprimir al virus (Hildesheim et al., 1994). Sin embargo, estas infecciones, a pesar de ser transitorias y cortas, son recurrentes. Esto sugiere que es posible que una infección endógena se reactive, o bien representa una nueva exposición (Woodman et al., 2001). Cualquiera que sea la explicación, se ha demostrado que cuando una mujer es infectada simultáneamente con HPV 16 y otro tipo, el primero tiende a ser detectable durante mucho más tiempo (Woodman et al., 2001) y se sabe que una infección persistente con los virus de alto riesgo predice la aparición de una CIN (Schlecht et al., 2001; Liaw et al., 1999; Ho et al., 1995), y su progresión hacia un carcinoma (Hildesheim et al., 1994; Wallin

et al., 1999; Ho et al., 1995), al igual que la detección de una gran carga viral (Ylitalo et al., 2000).

La infección genital por HPV es una de las más comunes enfermedades de transmisión sexual, alcanzando una prevalencia máxima entre mujeres jóvenes (15 a 25 años) sexualmente activas, que va de 20 a 46% en diferentes países (Ho et al., 1998; Lowy, 2001), considerándose como factores de riesgo: relaciones sexuales antes de los 18 años; número de compañeros sexuales durante la vida; tabaquismo; y un bajo nivel socioeconómico (Editorial board, 1996). No obstante, debido a las condiciones particulares de los países en vías de desarrollo, la incidencia de cáncer cervical es mayor que en Europa y Norteamérica (Villa et al., 2000), siendo el cáncer más común de la mujer, donde puede alcanzar una prevalencia de 25% de los mismos (Lowy, 2001).

Los papilomavirus son un pequeño grupo de virus de DNA que inducen verrugas (o papilomas) en varios vertebrados superiores, incluyendo a los humanos. A finales de la década de 1970 se clonó exitosamente el primer genoma de estos virus en una bacteria, permitiendo con ello su estudio y un análisis mutacional sistemático (Howley, 2001).

Son virus de tamaño pequeño, sin envoltura, con una cápside icosaédrica de 52 a 55 nm de diámetro, compuesta por 72 capsómeros, y un genoma circular de DNA de cerca de 8,000 pares de bases (8 kbps) (Howley, 2001).

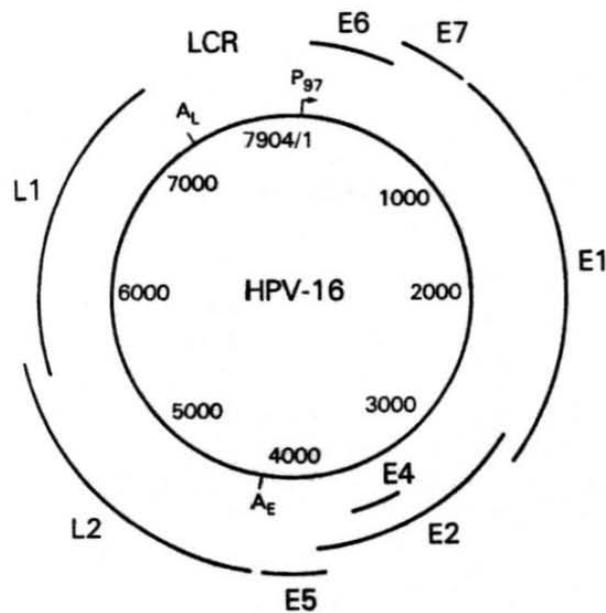
A la fecha, se han caracterizado más de 100 diferentes papilomavirus humanos y se estima que aún hay varios por descubrir. Debido a que los reactivos serológicos generalmente no distinguen a cada tipo, no se hace referencia a los mismos como serotipos. La clasificación más bien se basa en la especie de origen y el grado de relación de los genomas virales y se realiza comparando la secuencia de nucleótidos de regiones específicas del genoma. Con base en los criterios adoptados por el Comité de Nomenclatura de los Papilomavirus, la diferencia en la secuencia nucleotídica de los marcos abiertos de lectura (ORFs) de *E6*, *E7* y *L1*, de un nuevo tipo, no debe exceder

90% en relación con las secuencias correspondientes de los tipos conocidos. Una relación más cercana se considera un subtipo o una variante del tipo con el mayor grado de homología (Howley, 2001).

La cápside de los papilomavirus está formada por dos proteínas estructurales: L1, que representa cerca de 80% de la proteína viral total; y L2, que no es necesaria para el ensamblaje, aunque juega un papel en la encapsidación selectiva de DNA viral, aumentando así el potencial infeccioso de los viriones (Howley, 2001).

La cadena codificante contiene cerca de 10 ORFs que se clasifican como tempranos (E) o tardíos (L), con base en su localización en el genoma (Figura 8). La región temprana codifica proteínas virales reguladoras, incluyendo las necesarias para iniciar la replicación del DNA viral. Los ORFs *L1* y *L2* codifican las proteínas de la cápside viral. Existe una región del genoma en donde no hay ORFs, y se le ha llamado la región larga de control (LCR), la región reguladora río arriba, o la región no codificante. Esta región contiene elementos de respuesta a factores celulares (que dependiendo del tipo de virus, tienen cierta especificidad hacia un tejido o célula), así como a factores reguladores codificados por el mismo virus (Howley, 2001; White, 1994). Los genes tempranos conforman seis genes no estructurales (*E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6*, y *E7*) y dos ORFs de función desconocida (*E3* y *E8*). *E1* posee una actividad de replicasa. Las proteínas *E2* poseen funciones transactivadoras y transrepressoras. *E4* codifica una fosfoproteína citoplasmática cuya función biológica no ha sido dilucidada. La proteína *E5* interactúa con, y activa, receptores de factores de crecimiento. *E6* induce la degradación del supresor de tumores p53. *E7* se une e inactiva a las formas hipofosforiladas de la proteína supresora retinoblastoma (pRb), lo que resulta en la liberación del factor de transcripción E2F1. En cuanto a los productos de los genes tardíos, como se ha mencionado, L1 da origen a la cápside y L2 es necesaria para la encapsidación del genoma viral (Lowy, 2001).

El producto del gen E2 es un importante regulador de la transcripción y replicación viral. Originalmente fue descrito como un activador transcripcional. Sin embargo, se han identificado tres especies, de las cuales, la proteína de tamaño completo puede funcionar como transactivador o represor dependiendo de la localización de los sitios de unión de E2 en el genoma viral. Las otras dos formas más pequeñas pueden actuar como represores ya que carecen del dominio de transactivación y pueden formar heterodímeros inactivos con la proteína de tamaño completo. La expresión de los genes de la región temprana se encuentra bajo el control del producto de E2 a través de elementos de respuesta al mismo localizados en la LCR (Howley, 2001).



**Figura 8. Mapa genómico del HPV-16**

El genoma viral es una molécula de DNA circular de 7904 bps. El único promotor de la transcripción presente es P<sub>97</sub>. Los ORFs (E1 a E7, y L1 y L2) están indicados afuera del genoma circular. A<sub>E</sub> y A<sub>L</sub> representan los sitios de poliadenilación temprana y tardía, respectivamente (Tomado de Lowy, 2001).

En el caso de los HPVs asociados con el tracto genital, se ha demostrado que la unión de E2 a la LCR resulta en la modulación de la actividad promotora viral. Los genes

transformadores *E6* y *E7* son transcritos del promotor mayor temprano, el cual posee una actividad basal que puede ser reprimida por los productos de tamaño completo de *E2*, probablemente por interferencia con el ensamblaje del complejo de preinicio de la transcripción. Se ha demostrado que *E2* puede suprimir el crecimiento de líneas celulares de cáncer cervical positivas para HPV a través de la represión transcripcional de los genes virales *E6* y *E7* (Howley, 2001).

En estudios realizados en diferentes líneas celulares se ha observado que los HPVs de alto riesgo son capaces de transformar a las células, mientras que los virus de bajo riesgo no lo son. A través de estos ensayos se han podido identificar los genes virales directamente involucrados con la transformación celular, que corresponden a los ORFs de los genes *E6* y *E7* de los tipos de alto riesgo. De igual manera, el DNA de los últimos es capaz de inmortalizar cultivos primarios de fibroblastos humanos y células cervicales epiteliales humanas. Las líneas resultantes no son dependientes de anclaje y tampoco son tumorigénicas en ratones desnudos pero presentan propiedades de crecimiento alteradas y son resistentes a las señales para diferenciación terminal. Aunque todos los tipos de HPVs son capaces de inducir transitoriamente la proliferación celular, sólo los de alto riesgo pueden generar líneas inmortales que son refractarias a las señales de diferenciación (Howley, 2001).

Aunque la presencia de *E7* del HPV-16 es suficiente para transformar líneas celulares establecidas y para cooperar con *ras*, es necesaria la combinación de *E6* y *E7* para que se dé la inmortalización eficiente de fibroblastos o keratinocitos humanos (Howley, 2001). De hecho, se ha demostrado que es necesaria la cooperación de ambos genes para la formación tumoral, ya que tienen mecanismos complementarios, donde *E7* actúa principalmente como promotor de papilomas benignos, y *E6* como el agente que promueve la progresión de una lesión benigna a un tumor maligno (Lowy, 2001).

La capacidad de estos virus para formar papilomas, que es su característica particular, deriva de su capacidad para alterar las características normales de crecimiento del epitelio infectado a través de las funciones llevadas a cabo por las oncoproteínas E5, E6 y E7 (Lowy, 2001). De hecho, en las displasias de alto grado se ha encontrado que los ORFs principalmente expresados son los de *E6* y *E7*, y una mayor expresión de los mismos se asocia con lesiones más avanzadas (Lowy, 2001) debido a que predisponen a la célula hacia la acumulación de lesiones genéticas (Kessis et al., 1993). La progresión a carcinoma guarda una estrecha relación con la integración del genoma viral (en sitios al azar) en los cromosomas de las células hospederas, con la consecuente delección de grandes segmentos del mismo, generalmente de *E1* y *E2*, lo que permite mayores niveles de transcripción de *E6* y *E7* (Lowy, 2001; White, 1994; Kessis et al., 1993).

Estos pequeños virus tumorales de DNA han desarrollado un mecanismo en particular para formar complejos funcionalmente inactivos con el supresor de tumores p53. La proteína E6 de los HPVs de alto riesgo puede dar lugar a complejos con p53, mientras que no se ha detectado una interacción entre E6 de los virus de bajo riesgo y dicho supresor. No obstante que éste no es necesario para la proliferación celular normal, juega un papel fundamental en la respuesta celular al estrés genotóxico y citotóxico que amenaza la estabilidad genómica.

La proteína p53 suprime el crecimiento celular, en parte, a través de la activación transcripcional de p21, lo que lleva a una inhibición de las cinasas dependientes de ciclina que son críticas para la progresión G1 y el crecimiento celular. Adicionalmente, p53 regula directamente la transcripción de otros genes involucrados en la respuesta celular al estrés genotóxico y citotóxico, la apoptosis y el control del ciclo celular (Howley, 2001; Cordon-Cardo, 1999). Tras ocurrir un daño al DNA (como la exposición a radiación) aumentan los niveles nucleares de p53, lo que se asocia con una disminución en la síntesis replicativa de DNA y el arresto en G1, dando tiempo para que se lleven a cabo las reparaciones

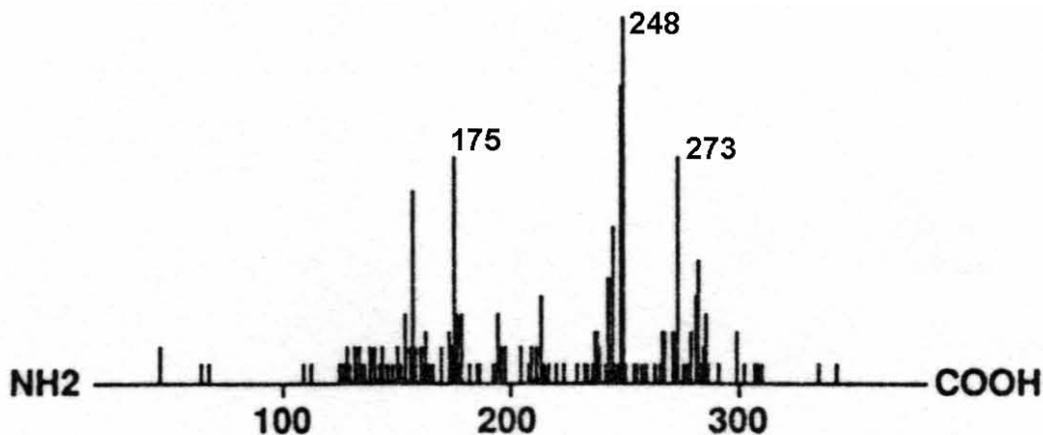
necesarias antes de que tales mutaciones sean “fijadas” y propagadas en la descendencia de estas células (Kuebritz et al., 1992; Bykov et al., 2002), actuando así como un guardián de la integridad genómica (Donehower, 1993; Aranda-Anzaldo et al., 1999). Si el daño no puede ser reparado, entonces p53 inicia la apoptosis (Donehower, 1993; Yonish-Rouach et al., 1991; Bykov et al., 2002). De hecho, la apoptosis dependiente de p53 parece jugar un papel clave en la eficacia de la quimioterapia, porque los tumores que contienen p53 mutante generalmente son más resistentes a la misma que aquellos que tienen una versión nativa del mismo (Bykov et al., 2002). El hecho de que la síntesis de proteínas celulares se vea disminuida en favor de una mayor producción de proteínas virales es suficiente para inducir la apoptosis, lo que explica la importancia que tiene E6 para el virus, al degradar a p53, un importante inductor de la apoptosis (Duke et al., 1996).

Originalmente descubierta en 1979 formando un complejo con el antígeno T del SV40 en células transformadas, la proteína p53 fue clasificada en principio como un antígeno tumoral y debido a que se empleó una forma mutante en los primeros ensayos de transfección, se le clasificó erróneamente como un oncogen, aunque en estudios subsiguientes se confirmó su actividad como supresor de tumores (Donehower, 1993).

La proteína p53 tiene un peso molecular de 53 kilodaltones (Alberts et al., 1994), y puede dividirse en tres regiones: 1) amino terminal, que contiene la zona de activación transcripcional; 2) porción central, que contiene bloques de secuencias altamente conservadas, en ella se localizan la mayoría de las mutaciones oncogénicas; 3) carboxilo terminal, que contiene las secuencias necesarias para oligomerización y localización nuclear (Prives, 1993). Debido a este dominio de oligomerización p53 se encuentra normalmente ensamblado en homotetrámeros y estructuras homo-oligoméricas (Weinberg, 1991) que le confieren la capacidad de unirse al DNA (Prives, 1993). Si hay moléculas mutantes que participen en la formación de complejos con monómeros nativos

se altera la función del complejo en conjunto (Weinberg, 1991), actuando de forma negativa dominante (Kuebritz et al., 1992), e incluso adquiriendo una función oncogénica (Harris, 1993).

El gen *p53* es el más frecuentemente mutado en los tumores humanos. Abarca cerca de 20 kbps en el DNA genómico, pero sus 11 exones tienen un tamaño de 2 a 3 kbps. Se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 17 (17p13). La vasta mayoría de las mutaciones se han localizado en los exones 5 a 8, entre los codones 130 y 290; habiendo tres codones: 175, 248, y 273, que presentan la más alta frecuencia mutacional y que han sido clasificados como “puntos calientes” (hot spots) (Donehower, 1993) (Figura 9).



**Figura 9. Distribución de mutaciones en p53**

Representación de la frecuencia acumulada de mutaciones en p53, en 424 tumores humanos de pecho, colon, hígado y pulmón. Los codones más frecuentemente mutados, o “puntos calientes”, son el 248, 175 y 273 (Tomado de Donehower, 1993).

Las mutaciones más comúnmente observadas son transiciones (C:G a T:A y G:C a A:T) en dinucleótidos CpG, las cuales se asocian con mutaciones espontáneas (Donehower, 1993). Más de 90% de tales mutaciones implica el cambio de la identidad de un aminoácido en la zona central hidrofóbica de la proteína, lo que tiene como consecuencia cambios conformacionales y la pérdida de la función (Harris, 1993) debido a que en esta

región se encuentran los aminoácidos necesarios para su unión con el DNA, así como un sitio de unión a zinc que es necesario para el mantenimiento de su conformación nativa (Prives, 1993; Cho et al., 1994) (Figura 10). Esto indica la importancia crítica que tiene la capacidad de unión al DNA para que p53 actúe como un supresor de tumores (Friend, 1994).



**Figura 10. Interacción de p53 con el DNA**

Se muestra la estructura del dominio central de p53 (verde claro) unido al DNA (azul). Los 6 aminoácidos más frecuentemente mutados en los cánceres humanos se muestran en color amarillo, y el átomo de zinc en color rojo (Tomado de Cho et al., 1994).

A pesar de la alta frecuencia con que se encuentran mutaciones en el gen *p53* en los cánceres humanos, en el caso de los cánceres cervicales HPV positivos usualmente se encuentra p53 nativo, mientras que en aquellos HPV negativo, generalmente se observan altos niveles de la proteína mutante (Donehower, 1993; Lowy, 2001). Por otro lado, en células infectadas con HPV los niveles de p53 son bajos en comparación con los de las células primarias no infectadas. Esto se debe a que las proteínas E6 de los HPVs de alto riesgo facilitan la rápida degradación de p53 a través de una proteólisis dependiente de la ubiquitina. E6 forma un complejo con la ubiquitina-proteín ligasa E6AP, que es un componente de la vía ubiquitina-proteasoma, la cual marca a las proteínas para degradación mediante la unión covalente de cadenas multiméricas de la proteína ubiquitina (Howley, 2001; Aranda-Anzaldo et al., 1999). Esto resulta en una disminución

de la vida media de p53, de varias horas, a 20 minutos, en keratinocitos humanos que expresan E6. Esto se refleja en la pérdida de la respuesta celular al daño al DNA mediada por la primera (Howley, 2001), lo que contribuye con la inestabilidad genómica (Donehower, 1993; Howley, 2001). Adicionalmente, E6 puede inhibir la interacción de p53 con sus sitios de unión en el DNA, así como la capacidad de unirse a p300/CPB, que es un coactivador de p53. Por otro lado, E6 también es capaz de activar a la telomerasa, lo que, junto con la inactivación de p53, puede llevar a la inmortalización celular (Lowy, 2001).

Se ha demostrado que los HPVs de alto riesgo están involucrados causalmente en la patogénesis del cáncer anogenital y particularmente en el del cérvix (Schlecht et al., 2001; Franco, 1993; Ylitalo et al., 2000; Ho et al., 1995; Liaw et al., 1999; Wallin et al., 1999; Hildesheim et al., 1994; Villa et al., 2000; Woodman et al., 2001; Editorial board, 1996; zur Hausen, 1991), estimándose una prevalencia de más de 95% de casos en los que el DNA de los mismos es detectable (Franco, 1999), de hecho, en la vasta mayoría, si no es que en todas las biopsias HPV positivas, se han encontrado transcritos originados en los ORFs de *E6* y *E7* (zur Hausen, 1991) cuya expresión continua parece ser necesaria para la carcinogénesis cervical, requiriéndose cambios genéticos adicionales para mantener el fenotipo maligno (Franco, 1999). Inclusive, en un estudio internacional, se concluyó que al menos 99.9% de los cánceres cervicales contienen DNA de HPV, siendo los de alto riesgo (HPV-16, HPV-18, HPV-31 y HPV-45) los más comúnmente encontrados (en 80% de los casos), con el HPV-16 presentando la más alta prevalencia al nivel mundial (Lowy, 2001).

De acuerdo con diferentes estudios epidemiológicos se ha encontrado que existe una proporción de momios que va desde 10 hasta más de 200, para la infección por HPV-16 y -18, como factor de riesgo para el desarrollo de las anormalidades clínicas asociadas

(displasias y cáncer), siendo la proporción más alta para un carcinógeno humano (Lowy, 2001).

La evidencia que liga a los HPVs con el cáncer cervical cumple todos los criterios para una relación etiológica. La asociación entre ambos es muy fuerte, consistente y específica para varios casos de cáncer en todo el mundo. Los estudios de cohortes muestran que la infección por HPV precede a las displasias y la malignidad; adicionalmente, se han podido reproducir importantes aspectos de esta enfermedad en diferentes modelos experimentales. Por lo tanto, la evidencia biológica es tan fuerte como para cualquier otro carcinógeno humano (Lowy, 2001), de hecho, la similitud de la respuesta al daño al DNA entre líneas celulares que expresan p53 mutante o E6 oncogénico, sugiere que las interacciones E6/p53 pueden ser funcionalmente equivalentes a las mutaciones de p53, lo que las predispone a adquirir alteraciones de una forma similar a la observada en células con p53 mutante, entre las que se encuentra la amplificación de genes específicos (oncogenes), el cual es un fenómeno asociado con algunos cánceres humanos (Kessis et al., 1993).

## LA VÍA DE Wnt Y $\beta$ -CATENINA

“Con su espada, que corta fina y fácilmente de un tajo, se lanza al ataque de la serpiente traidora y la parte por mitad, hasta el suelo, y volviendo a tajarse los dos trozos, golpea y sigue golpeando, asestándole tajos y más tajos hasta dejarla descarnada y desmenuzada en mil pedazos.”

CHRÉTIEN DE TROYES (1135-1190). “EL CABALLERO DEL LEÓN”.

“Hoy es necesario que exponga *los hechos* hasta donde los comprendo yo mismo. Helos sucintamente aquí”

EDGAR ALLAN POE (1809-1849). “EL EXTRAÑO CASO DEL SEÑOR VALDEMAR”.

### La cascada de señales de la familia de ligandos Wnt

Las proteínas Wnt pertenecen a una familia de glucoproteínas secretadas, ricas en cisteína, que controlan el desarrollo en diferentes organismos que van desde los gusanos nemátodos hasta los mamíferos y el humano. Sin embargo, la señalización desregulada de Wnt puede estar involucrada en la formación de tumores ya que, a nivel celular, controla la proliferación celular, la morfología de la célula, su motilidad, etc. (Dale, 1998; Pleasure, 2001). Las funciones de estos ligandos son diversas y dependen del contexto celular (Pleasure, 2001). A pesar de la importancia de esta vía en la embriogénesis, en el individuo adulto participa en la renovación de los epitelios, los cuales son la fuente de más de 90% de las malignidades. Varios de los tumores que surgen de los epitelios (intestino y piel, por ejemplo) están asociados con una regulación aberrante de la vía de Wnt (Taipale, 2001). Los genes *Wnt* conforman una familia de 18 miembros en la especie humana (Huelsken, 2001).

La altamente conservada vía de señalización de Wnt regula la proliferación celular, diferenciación, y destino celular. En los mamíferos esta vía juega un papel central en el

desarrollo del sistema nervioso central, riñones, placenta, tracto reproductivo y extremidades (Helmbrecht et al., 2001). A través de diferentes estudios se ha mostrado que la señalización intracelular de Wnt se diversifica en al menos 4 ramas: la vía de la  $\beta$ -catenina (también conocida como la vía Wnt canónica); la vía de la polaridad de células planares; la vía Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ ; y una vía que regula la orientación del eje y la división celular asimétrica (Huelsken, 2001).

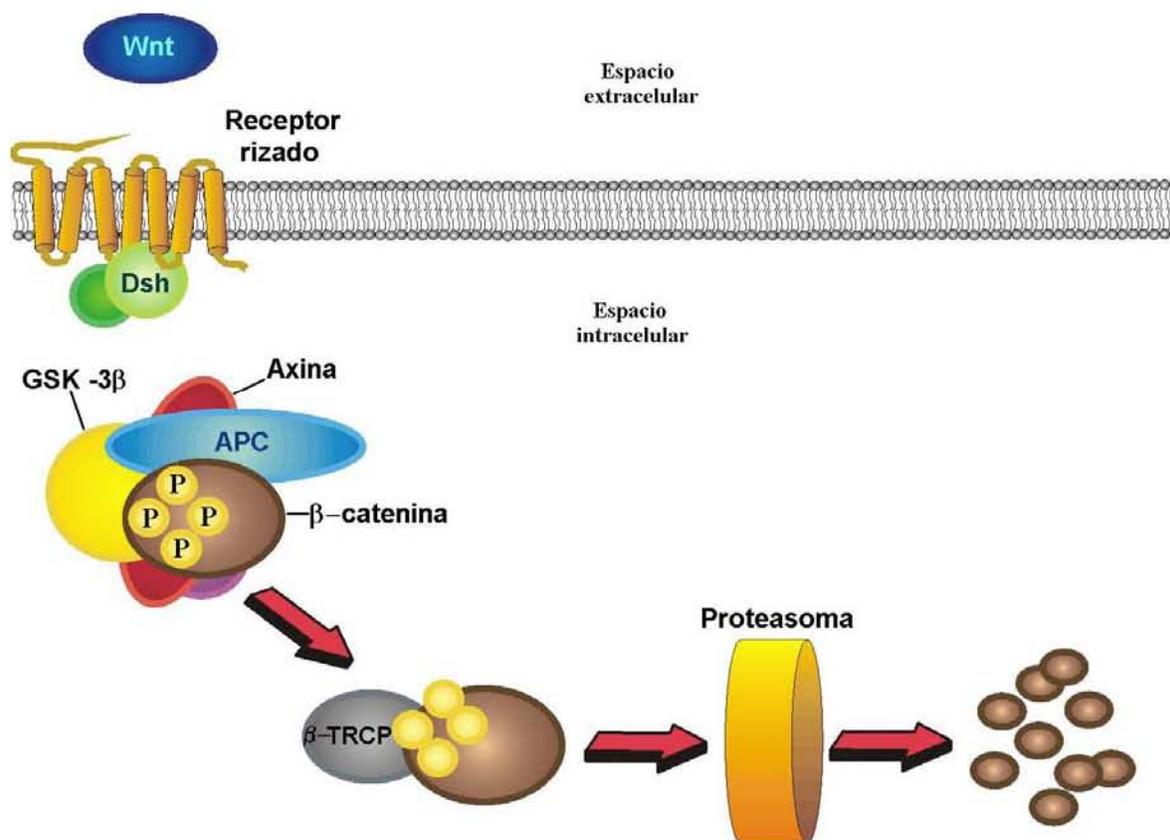
Se sugirió por primera vez un papel para Wnt dentro de la tumorigénesis gracias a la identificación del proto-oncogen *wnt-1* murino, que es frecuentemente activado por la inserción del virus murino de tumores mamarios (Seidensticker, 2000; Alberts et al., 1994), participando así en la inducción de hiperplasias mamarias en estos animales (Hinck, 1994).

La cascada de señales “canónica” asociada a Wnt está compuesta por este ligando, por su receptor (en forma de rizo), por un complejo citoplasmático que se une a  $\beta$ -catenina, y por una familia de reguladores nucleares de la transcripción. El complejo citoplasmático está compuesto a su vez por una serin/treonin cinasa llamada glucógeno sintasa cinasa-3 beta ( $\text{GSK-3}\beta$ ), una proteína supresora de tumores conocida como “poliposis adenomatosa del colon” (APC) y una proteína de anclaje llamada Axina (Clevers, 2000; Eklof, 2000) (Figura 11).

La señalización de Wnt inhibe la acción de la  $\text{GSK-3}\beta$  evitando que ésta fosforile a la  $\beta$ -catenina, la cual se vuelve estable, se solubiliza y se acumula en el citoplasma. Posteriormente es translocada al núcleo y mediante su interacción con la familia de reguladores de la transcripción TCF (T-cell factor) promueve la expresión de algunos genes blanco (Dale, 1998; Satoh, et al., 2000). En ausencia de la señal de Wnt,  $\text{GSK-3}\beta$  fosforila a  $\beta$ -catenina marcándola para su degradación por la vía de la ubiquitina (Eklof, 2000) y los niveles reducidos de la última permiten la adecuada represión de los genes

blanco (Taipale, 2001) (Figura 11). Se estima que la vida media de la  $\beta$ -catenina en ausencia de señales de Wnt es cercana a 30 minutos, pero en presencia de ligandos o de alteraciones de la vía, su vida media se puede extender hasta 4.5 horas (Rubinfeld et al., 1997).

Hasta ahora no se ha reportado evidencia formal para involucrar directamente a los genes Wnt en los cánceres humanos (Polakis, 1999).



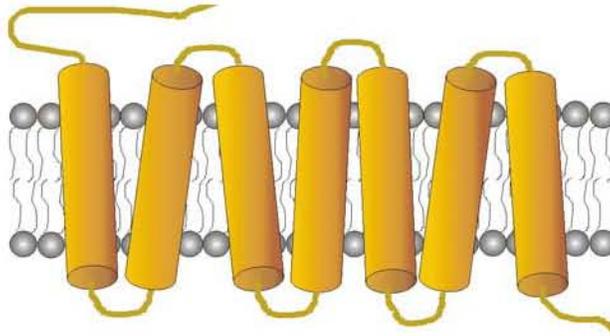
**Figura 11. Degradación de la  $\beta$ -catenina por la vía de la ubiquitina**

Cuando Wnt no estimula a su receptor, el complejo citoplasmático Axina-APC-GSK-3 $\beta$  interacciona con  $\beta$ -catenina, que es fosforilada por acción de la cinasa, y entonces marcada por  $\beta$ -TRCP para su degradación por la vía de la ubiquitina en el proteasoma.

### Los receptores rizados de la familia Wnt

Estructuralmente, los receptores rizados tienen un dominio extracelular capaz de unirse a Wnt, siete secuencias transmembranales y una cola carboxilo terminal intracelular. Debido

a su estructura forman parte de la superfamilia de receptores de siete pasos transmembranales, o 7TMS (seven-transmembrane-spanning) (Dale, 1998). En el genoma humano se han identificado diez miembros de la familia de receptores rizados (Huelsenken, 2001) (Figura 12).



**Figura 12. Representación de un receptor del tipo 7TMS como el receptor rizado de Wnt**

La regulación de la unión de Wnt a los receptores rizados es un punto clave de control en su señalización y la presencia del dominio amino terminal extracelular parece ser necesaria y suficiente para unirse a Wnt; sin embargo, las determinantes de especificidad hacia el subtipo de Wnt al que unirá se encuentran localizadas en el extremo carboxilo terminal de la molécula. Se han identificado genes de la familia Frzb que carecen de las secuencias 7TMS por lo que son secretadas igual que los Wnts y parecen formar con estos un complejo inactivo y es posible que actúen generando umbrales regionales de Wnt libre (Dale, 1998). De igual manera, se han identificado otras varias proteínas extracelulares que también pueden interactuar con los Wnt evitando su unión con los receptores, antagonizando esta vía por competencia (Seidensticker, 2000). La pérdida de estos factores reguladores de la actividad de Wnt podría contribuir con el cáncer (Polakis, 1999). De hecho, se ha especulado que debe haber expresión diferencial de receptores e inhibidores de Wnt para integrar el ambiente diverso de estos ligandos, e incluso, se ha reportado la expresión de gradientes opuestos de diferentes inhibidores y receptores que permiten diferencias regionales en los efectos de los Wnts (Pleasure, 2001).

Aunque no se ha reportado, es concebible que los receptores para Wnt, miembros de la clase 7TMS, pudieran ser activados constitutivamente por mutaciones sin sentido, ya que se han encontrado mutaciones de este tipo en otros receptores de esta familia, asociadas con cánceres humanos de células basales (Polakis, 1999).

Recientemente se reportó que los receptores rizados están acoplados con una proteína G, lo que sugiere que la activación de la vía clásica  $\beta$ -catenina-TCF-LEF requiere de subunidades específicas de la proteína G de forma temprana, antes de la estabilización de  $\beta$ -catenina en células de mamíferos (Liu et al., 2001). De igual manera, se identificó una nueva vía de señalización (diferente de la de  $\beta$ -catenina) para estos receptores que involucra a las cinasas N-terminales de c-Jun, que podría llevar a la muerte celular por apoptosis (Lisovsky, 2002).

### **Mecanismos de transmisión de señales de la vía Wnt**

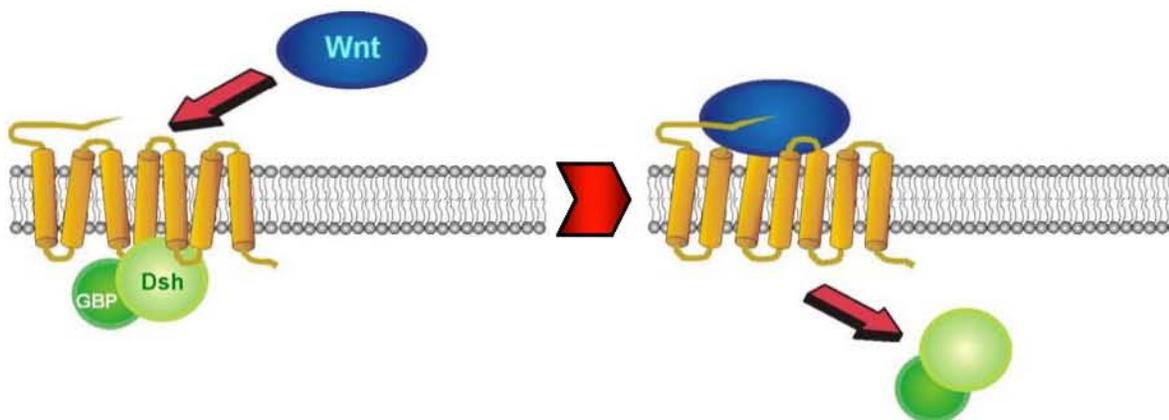
La unión de Wnt al receptor rizado se lleva a cabo a través de ciertos dominios extracelulares especializados para tal función que se encuentran unidos a sus regiones transmembranales respectivas mediante segmentos presumiblemente flexibles. La unión de los Wnts al dominio extracelular podría provocar su movimiento a través de grandes distancias moleculares, como parte de la transmisión de la señal, formando o rompiendo contactos entre las secuencias transmembranales (Dale, 1998).

### **Transmisión de la señal del receptor rizado a Dishevelled**

Dado que el dominio intracelular del receptor no tiene motivos enzimáticos, la señal es transmitida mediante el reclutamiento o liberación de moléculas intracelulares de señalización. Las proteínas de la familia Dishevelled (Dsh) (originalmente identificado en *Drosophila*) son proteínas citoplasmáticas que podrían funcionar como adaptadores moleculares ya que contienen dominios de interacción proteína-proteína pero no motivos

enzimáticos. El modelo más plausible plantea la posibilidad de que los cambios inducidos por Wnt en el receptor rizado aumentan la afinidad del último por Dsh, lo que es consistente con la acumulación membranal que se ha observado al estimular el receptor con moléculas solubles de Wnt. Una vez en la membrana, Dsh es capaz de unirse a otros factores subsecuentes en la cadena (Dale, 1998; Seidensticker, 2000).

Recientemente se ha encontrado que la fracción membranal de Dsh es hiperfosforilada por acción de la caseína cinasa  $\epsilon$  (CKI $\epsilon$ ) (Dale, 1998; Seidensticker, 2000; Huelsken, 2001), y que esta hiperfosforilación se correlaciona con la estabilización de  $\beta$ -catenina. Adicionalmente, algunos experimentos han permitido ubicar a la CKI $\epsilon$  río abajo de Wnt, el receptor rizado, y Dsh, pero río arriba de GSK-3 $\beta$  y  $\beta$ -catenina, lo que sugiere que esta enzima se encuentra involucrada en la inhibición del complejo de destrucción de  $\beta$ -catenina mediada por Dsh (Seidensticker, 2000) (Figura 13).



**Figura 13. Transmisión de la señal del receptor rizado a Dsh**

Al unirse Wnt a su receptor ocurre un cambio conformacional en el mismo, el cual libera a Dsh y GBP hacia el citoplasma. Dicha liberación podría ser dependiente de la fosforilación de Dsh.

### **Transmisión de la señal de Dishevelled a Axina**

Se ha demostrado que existen dos dominios de Dsh que interactúan directamente con Axina, sugiriendo que la primera bloquea la función de la última mediante una acción directa y no debido a competencia por la unión con GSK-3 $\beta$ . Es posible que Dsh altere la

conformación de Axina de tal forma que la accesibilidad de  $\beta$ -catenina para ser fosforilada por GSK-3 $\beta$  se vea reducida (Seidensticker, 2000), sin embargo, la función inhibitoria de la GBP sobre la última parece ser el mecanismo preponderante (Figura 14).

### **Transmisión de la señal de Dishevelled a GSK-3 $\beta$**

La glucógeno sintasa cinasa-3 es una serin/treonin cinasa citoplasmática que originalmente se identificó por su papel dentro del metabolismo del glucógeno. Se ha demostrado que la sobreexpresión de Dsh inhibe la acción de GSK-3 $\beta$  (Dale, 1998). Aunque no es claro el mecanismo de acción de Dsh, se sabe que esta proteína junto con una proteína de unión a GSK-3 (GBP) inhiben la acción de la GSK-3 $\beta$  como respuesta a la señal de Wnt (Clevers, 2000) (Figura 14).

### **Transmisión de la señal de GSK3- $\beta$ a $\beta$ -catenina**

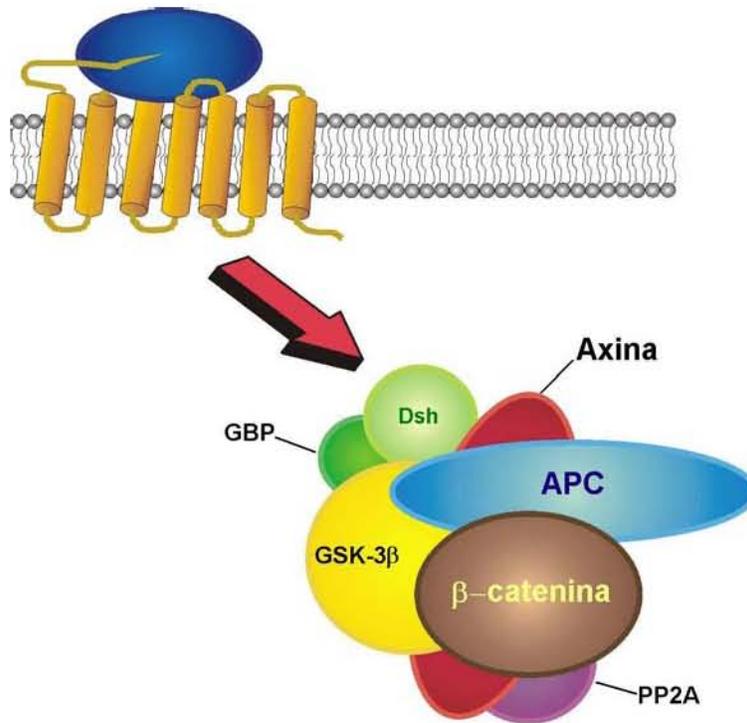
$\beta$ -catenina es un miembro de una familia de proteínas que se caracterizan por la presencia de varias secuencias llamadas armadillo (Arm), las cuales constan de 42 aminoácidos cada una (Ilyas et al., 1997) y que intervienen en un amplio rango de interacciones proteína-proteína. La inhibición de la actividad de la GSK-3 $\beta$  mediada por la señal de Wnt previene la degradación de  $\beta$ -catenina favoreciendo su acumulación (Dale, 1998). La fosforilación de  $\beta$ -catenina por GSK3- $\beta$  requiere la formación de un gran complejo multiproteico que contiene a GSK-3 $\beta$ ,  $\beta$ -catenina, APC y Axina; esta última contiene sitios de unión para  $\beta$ -catenina, GSK-3 $\beta$  y APC, además de que parece ser la única proteína del complejo que posee actividad de unión a la GSK-3 $\beta$  por lo que tiene una función de anclaje para todo el complejo (Eklof, 2000) (Figura 14).

Una vez formado el complejo la Axina misma es fosforilada por GSK-3 $\beta$ , lo que también facilita la fosforilación de APC, y esta fosforilación se ve aumentada aún más al unirse  $\beta$ -

catenina; a su vez, la forma fosforilada de APC aumenta su afinidad por la  $\beta$ -catenina favoreciendo así la degradación de ésta, lo que representa un mecanismo de retroalimentación negativa que es capaz de regular los niveles de la misma. La unión entre Axina y APC parece no verse afectada por sus estados de fosforilación. Por otro lado, la forma heterodimérica de la proteína fosfatasa 2A (PP2A), una importante serin/treonin fosfatasa, puede unirse directamente a Axina para desfosforilar a APC, cuyo estado de fosforilación está finamente regulado en este complejo (Ikeda et al., 2000). Es probable que una rápida respuesta a las señales de Wnt requiera la acción de PP2A para revertir los pasos de fosforilación mediados por GSK-3 $\beta$  (Seidensticker, 2000).

Cuando Wnt estimula esta vía la acción de GSK-3 $\beta$  es detenida,  $\beta$ -catenina es desfosforilada y por lo tanto se vuelve invisible para la maquinaria de la ubiquitinación. Sin embargo, para que esta proteína pueda interactuar con otros componentes río abajo de la vía de Wnt, debe ser liberada del complejo Axina/APC. Aparentemente, la inhibición de GSK-3 $\beta$  tiene consecuencias fatales para este complejo y promueve la liberación de  $\beta$ -catenina. La desfosforilación de Axina disminuye la afinidad de ésta por  $\beta$ -catenina, así como su estabilidad celular. Adicionalmente, la desfosforilación del dominio central de APC (siete repeticiones de aminoácidos con motivos SXXXS, que son un posible blanco para GSK-3 $\beta$ ) disminuye la afinidad que esta proteína tiene por  $\beta$ -catenina (Seidensticker, 2000) (Figura 14).

Esto sugiere que la integridad del complejo de destrucción depende de los eventos de fosforilación llevados a cabo por GSK-3 $\beta$ , resaltando la importancia de la afinidad de cada componente por los demás (Seidensticker, 2000).

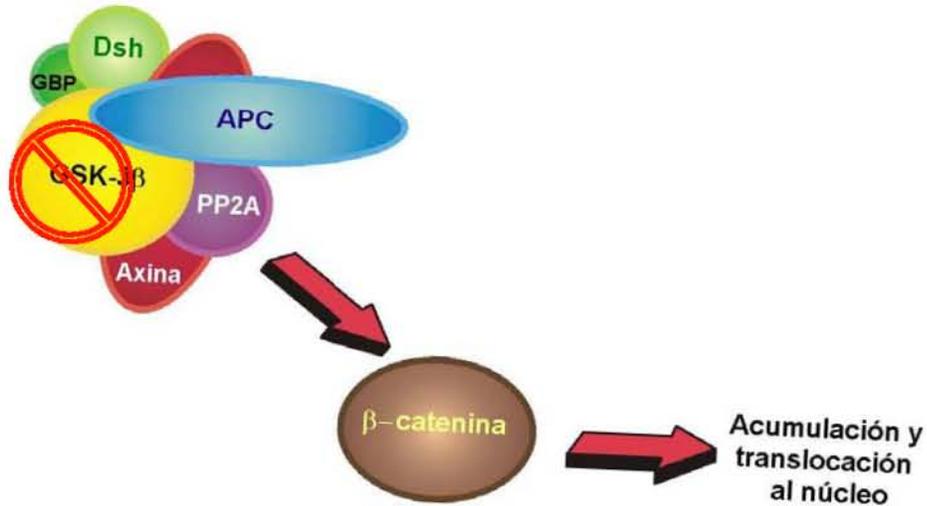


**Figura 14. Transmisión de la señal de Dsh al complejo citoplasmático**

Dsh se une al complejo citoplasmático bloqueando la actividad de GSK-3 $\beta$  y disminuyendo la afinidad de los componentes entre sí. Como consecuencia,  $\beta$ -catenina es liberada en su forma hipofosforilada, lo que conduce a su acumulación citoplasmática.

### Transmisión de la señal de $\beta$ -catenina a TCF

La inactivación del complejo de destrucción de  $\beta$ -catenina lleva a la acumulación citosólica y subsecuente translocación de la misma al núcleo (Figura 15). Hasta ahora no es claro si esta translocación es una consecuencia natural de la acumulación citosólica o si está regulada por señales de Wnt (Seidensticker, 2000), aunque se ha sugerido que las presenilinas (proteínas alteradas en la enfermedad de Alzheimer) están involucradas en esta translocación, mediante la señalización de Wnt (Nishimura et al., 1999). Por otro lado, evidencia experimental reciente sugiere que la proteína APC podría estar involucrada en este proceso (Henderson, 2000).



**Figura 15. Liberación de  $\beta$ -catenina del complejo citoplasmático**

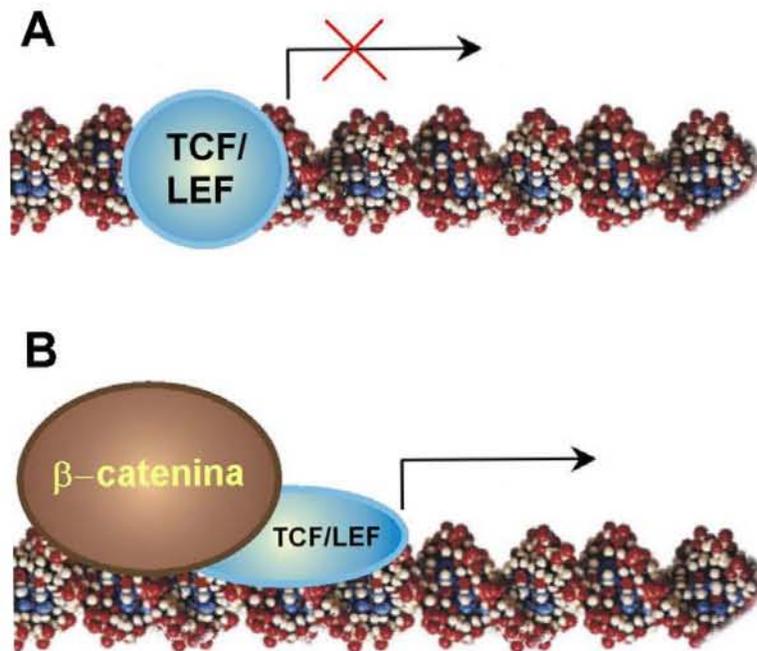
Debido a la inhibición de la actividad de GSK-3 $\beta$ , el complejo citoplasmático es desestabilizado y  $\beta$ -catenina es liberada al citosol en su forma desfosforilada que no es marcada para la vía de la ubiquitina. Esto lleva a su acumulación y translocación al núcleo a través de mecanismos no del todo claros.

Se ha demostrado que una vez en el núcleo,  $\beta$ -catenina es capaz de unirse a los factores de unión al DNA de la familia de TCF y regular la transcripción (Figura 16), y se ha demostrado que Wnt induce la asociación de  $\beta$ -catenina con LEF1 (Porfiri et al., 1997). Los miembros de la familia de TCF incluyen a LEF-1 (factor estimulante de linfocitos 1) y a TCF-1, los cuales tienen funciones en la linfopoyesis y en interacciones epiteliales del mesénquima, respectivamente (Dale, 1998). En los mamíferos existen cuatro miembros conocidos de la familia TCF-LEF: TCF1, 3, y 4, y LEF1 (Korinek et al., 1997).

Los TCFs son factores de transcripción "arquitecturales" que introducen dobleces en el DNA y que por sí mismos son débiles activadores de la transcripción, pero la unión de  $\beta$ -catenina es capaz de cambiar las capacidades de doblaje de estas proteínas ya que la última parece funcionar como un coactivador transcripcional (Huber, 1997). Se ha demostrado que la interacción de TCF con  $\beta$ -catenina está mediada por la secuencia conservada de 60 aminoácidos del extremo amino terminal, mientras que las secuencias Arm 3–8 de la  $\beta$ -catenina son necesarias para su unión con TCF. Por otro lado, la

presencia del extremo carboxilo terminal de  $\beta$ -catenina también es necesaria para la señalización de Wnt por interacción con otros componentes de la maquinaria transcripcional (Dale, 1998). Un dominio de los TCFs se une de manera secuencia-específica a las regiones reguladoras de ciertos genes, mientras que la  $\beta$ -catenina provee un dominio de transactivación. Por lo tanto, la activación transcripcional de los genes blanco ocurre sólo cuando los TCFs están unios a  $\beta$ -catenina (Korinek et al., 1997) (Figura 16).

Recientemente se identificó un grupo de proteínas nucleares llamadas *pygopus* que se encuentran formando un complejo con  $\beta$ -catenina *in vivo* y que son necesarias para la transcripción mediada por TCF, ya que es probable que jueguen un papel dentro del acceso que tienen TCF o  $\beta$ -catenina a la cromatina (Thompson et al., 2002).



**Figura 16. Activación transcripcional de genes regulados por TCF/LEF**

Tras acumularse y translocarse al núcleo,  $\beta$ -catenina se une a los factores de transcripción TCF/LEF para coactivar a los genes blanco de la vía Wnt. **A.** Cuando los factores TCF/LEF se encuentran solos son débiles activadores de la transcripción, actuando, inclusive, como represores de la misma. **B.** Al unirse  $\beta$ -catenina a los mismos (y a otros elementos de la maquinaria de transcripción), ésta funciona como coactivador transcripcional.

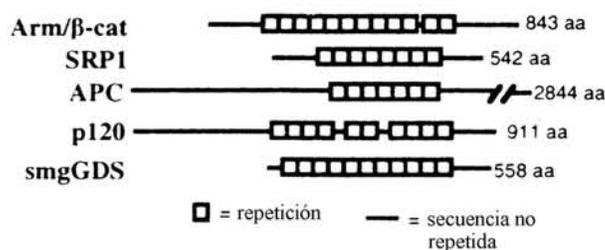
## **$\beta$ -catenina**

El gen de la  *$\beta$ -catenina* se encuentra en el cromosoma humano 3p21 (Wright et al., 1999) y codifica una proteína de 94 kDa con varios dominios estructurales. El dominio central contiene 13 repeticiones armadillo imperfectas que se pliegan para formar una superhélice que contiene un surco cargado positivamente que se supone debe interactuar con las regiones ácidas de APC, TCF y cadherinas (Dale, 1998; Wijnhoven, 1999).

La  $\beta$ -catenina tiene funciones duales ya que actúa como un componente estructural clave en las uniones entre células y es un importante blanco de la vía de Wnt, y al parecer, el aumento de la reserva de  $\beta$ -catenina libre monomérica es independiente de su asociación con la maquinaria de adhesión (Wright et al., 1999; Bienz, 1999).

La estructura primaria de la  $\beta$ -catenina consiste en una porción aminoterminal de aproximadamente 1390 aminoácidos (Huber, 1997) que contiene múltiples sitios de fosforilación para GSK-3 $\beta$  (Bienz, 1999), una región central de 550 aminoácidos que contiene las repeticiones armadillo, y una región ácida carboxilo terminal de 100 aminoácidos que parece contener la función de transactivación necesaria para la activación genética por el complejo  $\beta$ -catenina-TCF (Huber, 1997).

Las repeticiones Arm están conformadas por un motivo de 42 aminoácidos. Se encuentran presentes en varias proteínas que tienen diversas funciones celulares y que están altamente conservadas a lo largo de la evolución. La presencia y el arreglo de motivos Arm en tal diversidad de proteínas sugiere que estas unidades ligadas constituyen un dominio estructural (Peifer, 1994) (Figura 17).



**Figura 17. Proteínas con repeticiones Armadillo**

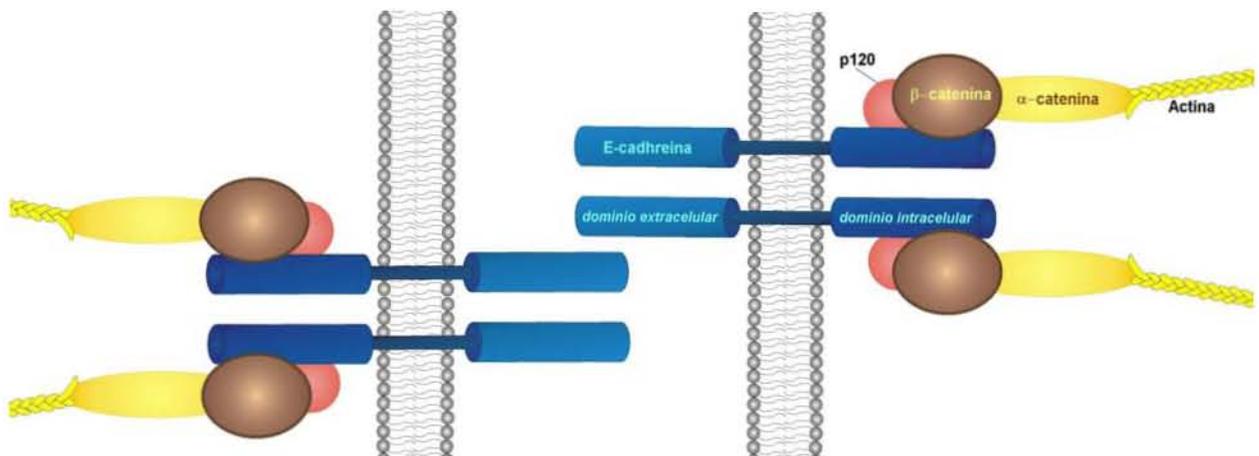
Representación esquemática de algunas proteínas que contienen copias múltiples de Armadillo (cuadrados). Estas repeticiones están definidas como secuencias  $\geq 10$  de 48 aminoácidos similares a una secuencia consenso (Tomado y modificado de Peifer, 1994).

El motivo secuencia armadillo codifica una unidad estructural que forma una molécula superhelical elongada cuando éste se repite. Esta estructura elongada está compuesta enteramente por  $\alpha$  hélices y asas conectoras, de tal forma que constituye una superhélice dextrógira de hélices. La forma general del dominio es aproximadamente cilíndrica. En ella, cada repetición interactúa extensamente con sus vecinas y entre todas forman un solo dominio con un núcleo hidrofóbico continuo. Esto sugiere que es una estructura compacta con poca flexibilidad ya que movimientos amplios podrían romper este núcleo hidrofóbico (Huber, 1997).

La mayoría de las cadenas básicas de los residuos están mantenidas en su posición mediante extensas interacciones con otros residuos, lo que confiere una distribución de la carga que forma una larga superficie básica en forma de banda. Aunque las regiones de unión con  $\beta$ -catenina de las cadherinas, APC, y los miembros de la familia TCF no muestran una homología significativa, todas ellas son ácidas; de hecho, la fosforilación de la región de unión a  $\beta$ -catenina de APC por GSK-3 $\beta$  haría a la misma más ácida, lo que es consistente con el hecho de que tras ser fosforilada aumenta su afinidad por su blanco molecular (Huber, 1997). APC, E-cadherina y TCF compiten de forma mutuamente exclusiva por la unión con  $\beta$ -catenina (Bienz, 1999).

### Interacción intercelular y con el citoesqueleto

La  $\beta$ -catenina se identificó originalmente como una proteína que interactúa con el dominio intracelular de las cadherinas uniéndolas con la  $\alpha$ -catenina, la cual a su vez, media el anclaje del complejo de cadherina con el citoesqueleto cortical de actina (Ikeda et al., 2000; Wright et al., 1999) (Figura 18). De esta función se deriva su nombre, catenina (del latín *catena* o cadena) (Morin, 1999). Las cadherinas determinan las interacciones homotípicas entre células en la formación de tejidos sólidos y el establecimiento de límites entre diferentes tipos celulares (Hinck, 1994).



**Figura 18. Unión de  $\beta$ -catenina con el citoesqueleto**

$\beta$ -catenina normalmente está involucrada en la adhesión celular actuando como “eslabón de cadena” entre la  $\alpha$ -catenina (unida a su vez a las fibras de actina) y el dominio intracelular de la E-cadherina.

La cadherina epitelial (E-cadherina) es el componente funcional clave de las uniones adherentes en las células epiteliales y juega un papel crucial en el establecimiento y mantenimiento de la adhesión intercelular, polaridad celular y arquitectura tisular (Wijnhoven, 1999; Hinck, 1994). Las uniones adherentes son regiones especializadas de la membrana en que la E-cadherina de células adyacentes hace contacto entre sí. La desestabilización de estas uniones permite la invasividad de las células epiteliales y por lo tanto la progresión de los carcinomas. Mutantes de cadherina que carecen del dominio

extracelular se comportan como dominantes negativas, es decir, secuestran a las cateninas impidiendo que interactúen con la E-cadherina intacta (Hülsken, 1994).

Se ha demostrado que la  $\beta$ -catenina interactúa con la E-cadherina a través de las secuencias Arm pero no a través de ninguno de los dominios terminales, mientras que la interacción con APC se da en las secuencias Arm y con el extremo amino terminal, el que es suficiente para unirse a APC. De lo anterior se ha concluido que la E-cadherina y el producto del gen supresor de tumores APC compiten activamente por las secuencias Arm de  $\beta$ -catenina y que la primera tiene mayor afinidad. De cualquier forma, ambas proteínas parecen tener un papel similar en cuanto a su actividad como supresoras de tumores. APC podría secuestrar variantes reguladoras negativas de  $\beta$ -catenina evitando que interfieran con la adhesión intercelular mediada por E-cadherina (Hülsken, 1994). Por otro lado, los complejos cadherina-catenina son mediadores clave en la adhesión célula-célula y pueden actuar como supresores de la invasividad (Wijnhoven et al., 2000).

### ***$\beta$ -catenina como proto-oncogen***

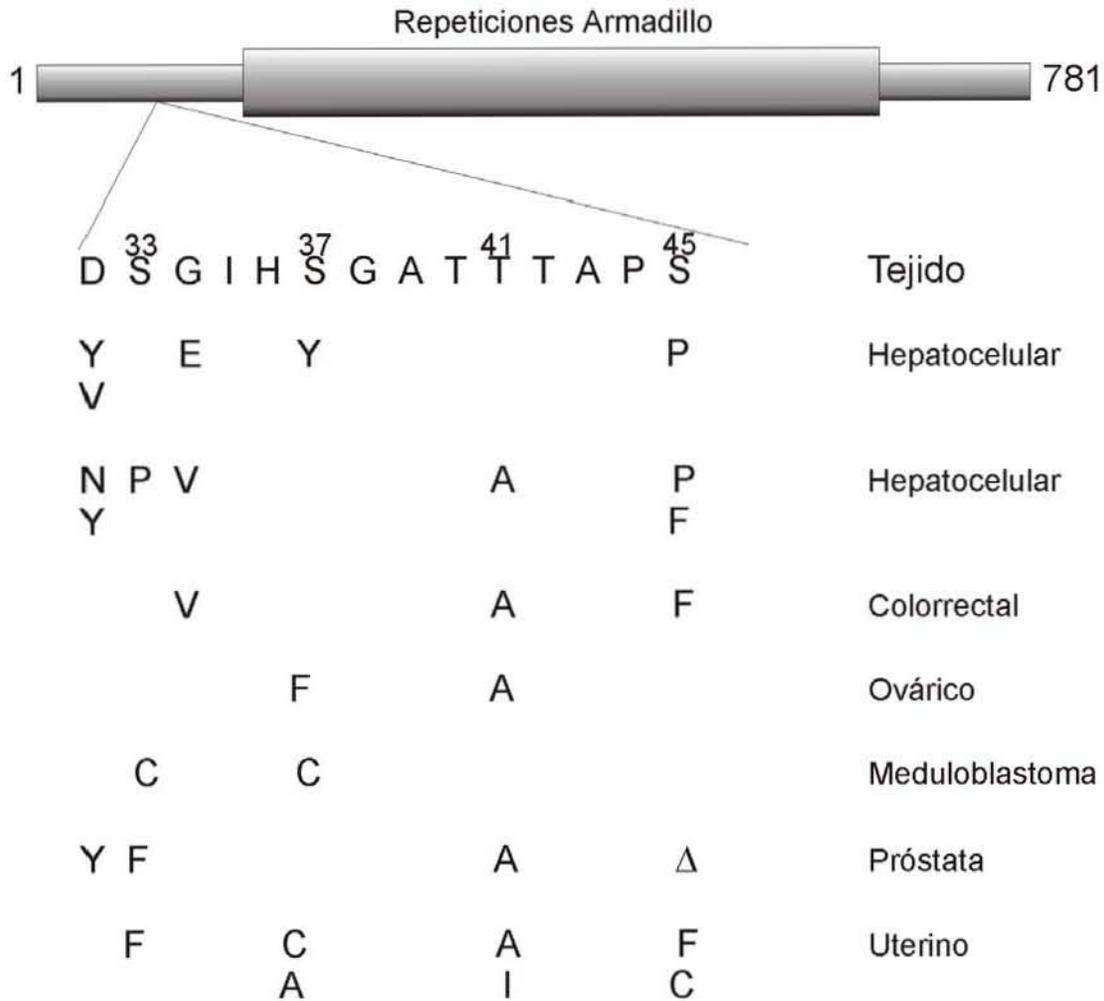
El crecimiento de las células en un organismo multicelular está regulado por la acción conjunta de los proto-oncogenes que promueven su desarrollo, y por la actividad de los genes supresores de tumores que lo inhiben (Weinberg, 1991). El mejor criterio para definir a un oncogen es encontrarlo consistentemente mutado de forma funcionalmente significativa en tumores humanos primarios. Otro criterio adicional para la oncogenicidad incluye la interacción con otros oncogenes conocidos. La  $\beta$ -catenina cumple con ambos criterios (Polakis, 1999), adicionalmente, la forma mutada de la misma posee la capacidad para transformar células en cultivo (Kinzler, 1996).

El dominio amino terminal de la  $\beta$ -catenina contiene un motivo de fosforilación de GSK-3 $\beta$  y secuencias consenso de ubiquitinación que son críticos para su regulación (Wei et al.,

2000; Wright et al., 1999). Este dominio de fosforilación contiene tres serinas y una treonina, cada una separada de la otra por tres residuos (Morin, 1999) (Figura 19). El gen de la  $\beta$ -catenina se encuentra frecuentemente mutado (en cerca de 50% de los casos) en los codones 33, 37, 41 y 45 del exón 3 (Rubinfeld et al., 1997; Ilyas et al., 1997; Fuckuchi et al., 1998; Takahashi et al., 2000), o bien presentan deleciones intersticiales del mismo exón (Wijnhoven et al., 2000) (Figura 19). Al no ser fosforilada, la  $\beta$ -catenina aumenta su estabilidad en citoplasma favoreciendo su translocación al núcleo (Takahashi et al., 2000) en donde, al asociarse con los factores TCF o LEF, los transforma de represores a activadores de la transcripción (Wei et al., 2000; Clevers, 2000) que a su vez llevan a la expresión de ciertos genes que estimulan la formación de tumores como *Ciclina D*, *c-jun*, *fra-1*, y *c-myc*. (He et al., 1999; Ikeda et al., 2000; Wijnhoven et al., 2000; Mann et al., 1999). Los protooncogenes *c-jun* y *fra-1* son componentes del complejo de transcripción AP-1, que es capaz de aumentar la expresión del receptor activador de plasminógeno tipo urocinasa (uPAR), el cual facilita la proteólisis de la matriz extracelular acelerando la formación de plasmina en la superficie celular, y también es capaz de aumentar la motilidad, teniendo papeles potenciales en procesos fisiológicos, pero también en la formación de metástasis. De acuerdo con esto, se ha observado un aumento concomitante en la expresión de  $\beta$ -catenina y de uPAR en tumores y metástasis. Adicionalmente, se ha observado que el incremento en los niveles de  $\beta$ -catenina reduce la expresión de la proteína ZO-1, la que se colocaliza con E-cadhreina en la membrana e interactúa directamente con  $\beta$ -catenina, y que es necesaria para el ensamblaje de las uniones adherentes entre células, estableciendo otro mecanismo que facilite la metástasis (Mann et al., 1999).

Las mutaciones activantes en  $\beta$ -catenina se han correlacionado con inmunotinción citoplasmática y nuclear que confirman la translocación de la  $\beta$ -catenina a estos

compartimentos celulares (Fukuchi et al., 1998; Takahashi et al., 2000; Wei et al., 2000; Wijnhoven et al., 2000). Sólo es necesaria la mutación de uno de los sitios de fosforilación para que la proteína sea refractaria a la degradación (Bienz, 1999).



**Figura 19. Mutaciones en la secuencia reguladora de  $\beta$ -catenina identificadas en tumores humanos**

Se presenta la secuencia de los residuos 32 a 45 (ubicados en el exón 3), con las correspondientes mutaciones identificadas en los tejidos descritos (código de aminoácidos de una letra). Sólo se muestran mutaciones de sentido incorrecto, y una delección ( $\Delta$ ) del codón 45 en el cáncer de próstata. Nótese la afectación a los sitios de fosforilación (residuos 33, 37, 41 y 45).

Las mutaciones encontradas en el exón 3 de  $\beta$ -catenina han sido mayoritariamente mutaciones puntuales de sentido incorrecto en residuos de serina y treonina en las que se observan transiciones C:G a T:A o T:A a C:G (Fukuchi et al., 1998). De hecho, la segunda G de las secuencias de tipo CTGGA ha sido reportada como un punto caliente mutacional que da lugar a este tipo de transiciones (Takahashi et al., 2000). El mismo tipo de mutaciones han sido frecuentemente observadas en el gen supresor de tumores p53 (Fukuchi et al., 1998) y éstas pueden deberse a exposición a diferentes agentes mutagénicos como la Aflatoxina B<sub>1</sub> o el humo del cigarrillo, resultando en mecanismos endógenos de desaminación: las transiciones de C a T podrían generarse por desaminación enzimática de la citosina o por la presencia de radicales de oxígeno y óxido nítrico (Harris, 1993).

Sin embargo, se ha reportado que hay alteraciones genéticas en el exón 3 de  $\beta$ -catenina que parecen no participar en la tumorigénesis, por lo que se han sugerido diferentes alteraciones por las cuales podría existir una acumulación de  $\beta$ -catenina en el citoplasma, entre ellas: mutaciones inactivantes en *APC* o bien, algún mecanismo que reduzca la expresión de E-cadherina membranal o que aumente su expresión en el citoplasma (Wijnhoven et al. 2000). No obstante, recientemente se encontró en muestras de cáncer endometrial una alta frecuencia de mutaciones en el exón 3 de  $\beta$ -catenina que producen cambios en residuos adyacentes a Ser33, los que se correlacionan con la acumulación de la proteína en el citoplasma y el núcleo (Ikeda T. et al., 2000). De forma similar, se ha detectado una alta frecuencia de mutaciones puntuales en el exón 3 de  $\beta$ -catenina que llevan a la pérdida de residuos de serina/treonina, en neoplasmas sólidos pseudopapilares pancreáticos (Tanaka et al., 2001).

Por otro lado, se sabe que no se observan mutaciones de *APC* en la mayoría de los cánceres gástricos, pero a pesar de ello, y de la ausencia de mutaciones en el exón 3 de  $\beta$ -catenina, se ha detectado una localización nuclear y/o citoplasmática de la última en muestras de cáncer gástrico, sugiriendo que dicha acumulación podría deberse a otros mecanismos (Sasaki et al., 2001).

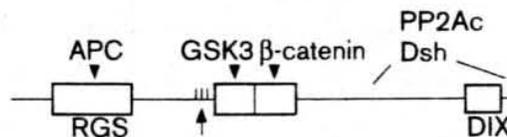
En estudios realizados en algunas líneas celulares se han encontrado mutaciones fuera del exón 3: se detectó una transversión heterocigota G a T en el codón 183 del exón 5 (segunda secuencia Arm) que introduce un aminoácido polar en el lugar de un no polar. Una transversión heterocigota G a C en el codón 245 del exón 5 (tercera secuencia Arm) sin provocar cambios importantes en la polaridad. En dos líneas celulares se encontraron transiciones homocigotas A a G en el codón 287 del exón 6 (cuarta secuencia Arm) en una región de  $\beta$ -catenina que forma complejos con E-cadherina y con APC (Ilyas et al., 1997).

La evidencia actual indica que  $\beta$ -catenina puede ser activada oncogénicamente por mutación genética directa, por la inactivación del supresor de tumores APC, o por la activación de la vía de señalización de Wnt (Polakis, 1999). Adicionalmente, se han reportado niveles elevados de mRNA de  $\beta$ -catenina en células de carcinoma colorrectal, indicando que su transcripción está aumentada en el tejido neoplásico (Mann et al., 1999). El hecho es que las mutaciones en  *$\beta$ -catenina* pueden sustituir a las de *APC*, y son responsables por aproximadamente la mitad de cánceres (colorrectales, al menos) con *APC* nativo (Sparks et al., 1998; Mann et al., 1999).

## Axina

En algunos experimentos *in vitro* se observó que  $\beta$ -catenina no era eficientemente fosforilada por GSK-3 $\beta$ , lo que sugirió que otra proteína debería estar involucrada en esta reacción enzimática, y se identificó a Axina como un posible candidato, ya que era capaz de antagonizar a  $\beta$ -catenina al mismo nivel que GSK-3 $\beta$ . Ambas se unen en sitios vecinos en la región central de la primera. Posteriormente, se observó *in vivo* la existencia de un complejo cuaternario que, además de las tres proteínas anteriores, incluía a APC. De esta forma se determinó que Axina sirve como una plataforma para el ensamblaje de los componentes individuales de este complejo, de hecho, ésta facilita la fosforilación de  $\beta$ -catenina y de APC y ella misma es fosforilada por GSK-3 $\beta$ , lo que aumenta modestamente su estabilidad, aunque no parece afectar su unión con los otros componentes del complejo (Bienz, 1999).

Axina contiene un dominio altamente conservado en su extremo carboxilo terminal, llamado DIX, que se relaciona con el dominio amino terminal de Dishevelled (Figura 20). Este dominio es necesario para la dimerización de Axina, que parece ser un paso necesario para la degradación de  $\beta$ -catenina. De igual manera, este dominio media la asociación con Dsh, lo que sugiere que la unión de éste con Axina produce un cambio en el complejo citoplasmático que evita la fosforilación de los sustratos de GSK-3 $\beta$  y una posibilidad es que Dsh, activado por Wnt, cause la disociación del complejo, liberando moléculas de  $\beta$ -catenina desfosforilada (Bienz, 1999).



**Figura 20. Estructura primaria de Axina**

Se indican los diferentes sitios de unión de las proteínas del complejo citoplasmático así como los sitios de unión de Dsh. La flecha indica los sitios de fosforilación de GSK-3 $\beta$ . (Tomado de Bienz, 1999).

### **Mutaciones en *Axina***

En estudios recientes en líneas celulares de hepatoblastomas y en carcinomas hepatocelulares primarios se han encontrado mutaciones en el gen de *Axina1* que predicen proteínas truncadas carentes del sitio de unión de  $\beta$ -catenina, estos resultados fueron corroborados por la observación de distribución citoplásmica o nuclear de  $\beta$ -catenina. Se introdujo *Axina* no mutada en dichas células empleando un adenovirus y se observó inducción de la apoptosis confirmando el papel de la *Axina* como supresora de tumores (Sato et al., 2000). Mediante estudios cristalográficos de los dominios de interacción entre *Axina* y APC se ha especulado sobre posibles mutaciones en esta región de *Axina* que podrían impedir su interacción con APC y por lo tanto promover la acumulación de  $\beta$ -catenina (Eklof, 2000). Recientemente se han identificado mutaciones en *Axina* y *Axina2* en carcinomas del colon sin y con inestabilidad microsatelital, respectivamente, y también han resultado en una acumulación nuclear y citoplasmática de  $\beta$ -catenina (Huelsenken, 2001).

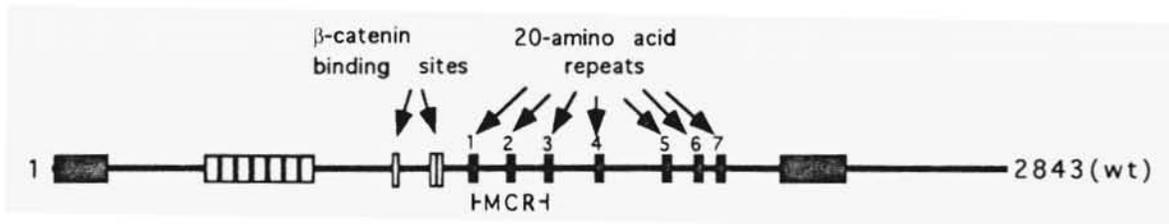
### **APC**

En 1991 se identificó el gen supresor de tumores *APC*, codificado por el locus FAP (Bienz, 2002; Groden et al., 1991). La observación de una delección intersticial de la banda cromosomal 5q21 en un paciente con cientos de pólipos y sin historia familiar de cáncer indicó que el gen *APC* podría estar localizado en ese punto (Fearon, 1997; Bérout, 1996; van der Luijt et al., 1994).

La proteína *APC* está conformada por 2843 aminoácidos que forman múltiples dominios y motivos. La vasta mayoría de las mutaciones resultan en un producto truncado carente del extremo carboxilo terminal (Polakis, 1997; Henderson, 2000; Kinzler, 1996). En el extremo amino terminal de la proteína se encuentra un dominio de oligomerización que

consta de secuencias de aminoácidos que forman estructuras helicoidales que median ciertas interacciones entre proteínas. Es probable que los polipéptidos APC existan como oligómeros y que un polipéptido mutado pueda formar una mezcla de oligómeros con la proteína nativa (Figura 21) (Polakis, 1997).

APC también cuenta con 13 repeticiones armadillo que son típicamente retenidas por las formas mutantes. Posteriormente se encuentra un motivo único de unión a  $\beta$ -catenina formado por 3 repeticiones de 15 aminoácidos entre los residuos 1020-1169. En la región central de la proteína se encuentra una serie de 7 motivos de 20 aminoácidos que guardan una alta identidad entre sí y que comparten cierta identidad con los sitios de unión a  $\beta$ -catenina de 15 aminoácidos, sugiriendo que los motivos de 20 aminoácidos también pueden unir a la última. Si este es el caso, existen en total 10 sitios de unión a  $\beta$ -catenina que ocupan un tercio de la secuencia completa de APC. Dado que el límite 3' de la MCR (Mutation Cluster Region o Región de Acumulación de Mutaciones) termina aproximadamente en el codón del aminoácido 1500, faltarán al menos 5 de las 7 repeticiones de 20 aminoácidos en la mayoría de las proteínas mutantes (Figura 21) (Polakis, 1997).



**Figura 21. Estructura primaria de APC**

Las flechas señalan las repeticiones de aminoácidos.

1-7: probables sitios de unión de  $\beta$ -catenina (Tomado de Polakis, 1997).

El tercio carboxilo terminal contiene un tramo de aproximadamente 200 aminoácidos llamado el dominio básico, donde existe un alto contenido de arginina y lisina, así como un porcentaje anormalmente alto de prolina, lo que es muy común en proteínas que se

asocian con los microtúbulos. Este dominio casi siempre es eliminado por las mutaciones en APC (Figura 22). Finalmente, en el extremo carboxilo terminal se encuentra una secuencia de unión a la proteína humana supresora de tumores discs large (hDLG) (Polakis, 1997).

La proteína APC tiene la capacidad de dimerizarse a través de su dominio amino terminal así como de interactuar con al menos otras 6 proteínas:  $\beta$ -catenina,  $\gamma$ -catenina (o placoglobina), tubulina, EB1, hDLG, y GSK-3 $\beta$  (Morin et al., 1997; Polakis, 1997).

Las principales funciones adscritas a APC se han enfocado principalmente a procesos que tienen lugar en el citoplasma tales como la promoción de la degradación de  $\beta$ -catenina y su intervención putativa en la migración y adhesión celular. Sin embargo, recientemente se descubrió que APC puede localizarse en el núcleo de células tumorales y unirse *in vitro* a secuencias de DNA ricas en AT. Esto llevó a la identificación de dos secuencias de exportación nuclear (NESs) cerca del extremo amino terminal y se demostró que APC puede unirse a  $\beta$ -catenina en el núcleo para promover su exportación al citoplasma para su posterior destrucción, de hecho, la degradación de  $\beta$ -catenina dependiente de APC es reducida por mutaciones en las NESs. APC es exportado del núcleo a través de la vía CRM1/exportina, indicando que este supresor de tumores también interactúa con el receptor CRM1/exportina (Henderson, 2000). Al buscar secuencias consenso NES en APC se encontraron tres secuencias en las repeticiones de 20 aminoácidos 3, 4 y 7 (20R3, 20R4, y 20R7, respectivamente) (Figura 22). La NES 20R3 se superpone a la MCR, y la observación de que mutaciones más cercanas al extremo 5' (amino terminal) se asocian con formas más atenuadas de cáncer, podría explicarse en términos de una fuerte selección contra la presencia de los NES 20R, implicando la capacidad de APC para salir del núcleo dentro de su función como supresor de tumores. De hecho, se ha demostrado que la distribución subcelular de APC es imitada

por aquella de  $\beta$ -catenina, sugiriendo que la distribución de la última es consecuencia de la de la primera. Esto quiere decir que las NES 20R tienen una gran importancia funcional en la reducción de los niveles nucleares de  $\beta$ -catenina y es posible que ésta permanezca positivamente atrapada en el núcleo por una forma mutante de APC (Rosin-Abersfeld et al., 2001).

### **Mutaciones en APC**

Las mutaciones de *APC* son los eventos genéticos más comunes causantes de enfermedades en los humanos (Morin et al., 1997). Cuando éstas se encuentran en la línea germinal se asocian con FAP, mientras que las mutaciones somáticas se han encontrado en los carcinomas colorrectales y otros tumores del tracto digestivo (van der Luijt et al., 1994). Los tumores del colon y el recto se cuentan entre los neoplasmas humanos más comunes. Aproximadamente 5% de la población occidental desarrollará una de estas malignidades durante su vida. Una pequeña proporción de las mismas ocurre de forma hereditaria dentro de un síndrome conocido como poliposis adenomatosa familiar del colon (FAP) (Bienz, 2000), que es un estado precanceroso dominante autosómico (Bérout, 1996). Se considera que existe un síndrome familiar de cáncer cuando numerosos miembros de la familia desarrollan cáncer a una edad especialmente joven o los individuos afectados desarrollan múltiples cánceres primarios (Fearon, 1997).

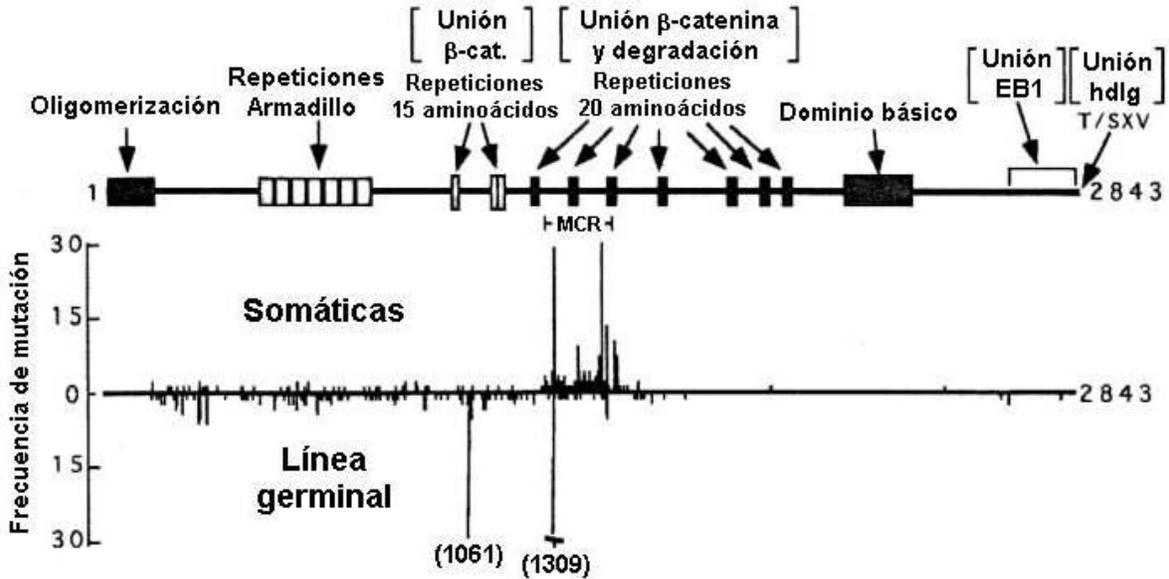
Los pacientes con FAP desarrollan grandes números de pólipos adenomatosos benignos en el epitelio del recto y del colon en la edad adulta temprana. Casi invariablemente, algunos de ellos evolucionarán a ser invasivos y harán metástasis si no son removidos quirúrgicamente (Bienz, 2000; Polakis, 1997). Por otro lado, la mayoría de los tumores colorrectales esporádicos presentan ambos alelos de *APC* inactivados (Bienz, 2000). Generalmente se acepta que los tumores comienzan a crecer en el colon/recto de los pacientes con FAP cuando una célula apropiada adquiere una mutación somática en el

locus de *APC* que acompañe a la mutación germinal preexistente (pérdida de heterocigocidad). (Lamlum et al., 2000; Henderson et al., 2000; Wei et al. 2000). Aunque las mutaciones de *APC* en la línea germinal son poco frecuentes, las mutaciones somáticas están presentes en más de 70% de todos los pólipos adenomatosos y carcinomas colorrectales (Fearon, 1997).

También se ha encontrado LOH en *APC* en hasta 38% de casos de cáncer primario de pecho aunque sólo se han descrito dos mutaciones puntuales que llevan a la sustitución de un aminoácido, por lo tanto, a diferencia de los melanomas y carcinomas de colon, la desregulación de la vía Wnt parece no ser un evento frecuente en este tipo de cáncer (Schlosshauer et al., 2000).

Las mutaciones en  *$\beta$ -catenina* generalmente son una alternativa a las mutaciones en *APC*. Se ha propuesto que las mutaciones en el exón 5 de  *$\beta$ -catenina* no son eventos iniciadores de la tumorigénesis y por lo tanto pueden ser seleccionados en adición a las mutaciones en *APC* (Lamlum et al., 2000).

Más de 60% de las mutaciones somáticas oncogénicas en *APC* se encuentran en una región relativamente pequeña del exón 15 (codones 1286-1513), que representa menos de 10% de la secuencia codificante y por esto se le ha denominado MCR (Figura 22) (van der Luijt et al., 1994; Schlosshauer et al., 2000). Cerca de 95% de las mutaciones truncan la proteína antes de las secuencias de interacción con  $\beta$ -catenina aunque se mantiene cierta capacidad de unión a la misma (Eklof et al., 2000, van der Luijt et al., 1994). Por otro lado, las mutaciones germinales identificadas en los pacientes con FAP están distribuidas por toda la secuencia codificante, y aproximadamente 70% están localizadas en la parte 5' del exón 15 (entre los codones 713 y 1597) (Figura 22) (van der Luijt et al., 1994).



**Figura 22. Frecuencia relativa de mutaciones en el gen de APC y su relación con la estructura primaria de la proteína**

En la parte superior se representa la estructura primaria de la proteína y se indica la función correspondiente a cada fragmento. En la parte inferior se representa la frecuencia relativa de mutaciones encontrada en células somáticas y de línea germinal; nótese la alta proporción en la MCR de las primeras. (Tomado y modificado de Polakis, 1997).

Las NESs presentes en APC, que le permiten salir del núcleo celular, están altamente conservadas y son adyacentes a la MCR. Como resultado de los eventos mutacionales esta capacidad se pierde y  $\beta$ -catenina se acumula en el núcleo (Rosin-Arbesfeld et al., 2000; Henderson, 2000), y se ha demostrado que la expresión transitoria de APC normal en células SW480 (que contienen  $APC^{mut/mut}$ ) aumenta la exportación nuclear de  $\beta$ -catenina y su degradación (Henderson, 2000). Estos hallazgos brindan una explicación mecánica del patrón mutacional observado en los tumores colorrectales, la que revela una fuerte selección para retener la primera repetición de 20 aminoácidos en al menos uno de los alelos mutantes (Rosin-Abersfeld et al., 2000), a fin de mantener a la  $\beta$ -catenina atrapada en el núcleo.

Por otro lado, se ha encontrado que la forma endotelial de APC se encuentra asociada con las zonas adhesivas apicolaterales de las células epiteliales, que contienen a las

uniones adherentes constituidas por E-cadherina, y varias condiciones genéticas que causan la deslocalización de APC de estas zonas resultan en una aparente estabilización de  $\beta$ -catenina, lo que sugiere que la asociación de APC con las uniones adherentes podría ser crítica para la degradación de  $\beta$ -catenina, lo que resultaría ventajoso por dos razones. Primero, esto permitiría al complejo citoplasmático degradar eficientemente a la  $\beta$ -catenina liberada de las uniones. Segundo, podría permitir una eficiente respuesta a la activación del receptor rizado en la membrana plasmática (Bienz, 1999).

## FUNDAMENTO DE LAS TÉCNICAS

“Las cosas deben ponerse tan simples como sea posible.

Pero no más simples.”

ALBERT EINSTEIN (1879-1995)

“Ahora conozco tus dignos oficios. Nada puedes aniquilar en grande,  
y al presente lo intentas en pequeño”

J. W. GOETHE. “FAUSTO”, 1808

### SSCP

La técnica de SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism, o Polimorfismo Conformacional de Cadena Sencilla) fue descrita originalmente en 1989 por Masato Orita y colaboradores, como una forma para identificar polimorfismos en el DNA humano así como mutaciones puntuales en fragmentos cortos de DNA, permitiendo detectar hasta 90% de todos los cambios que pueden presentarse en una secuencia dada (Orita et al., 1989). En breve, tras amplificar un fragmento de DNA mediante PCR, el producto es colocado en una solución alcalina desnaturizante que favorece la separación de las dos cadenas de DNA. Posteriormente, la muestra es colocada en un gel no desnaturizante, lo cual permite la formación de puentes de hidrógeno entre las bases de una misma cadena, con lo que cada una de ellas adquiere una conformación tridimensional predominante y semiestable, característica de la secuencia de bases presente (secuencia de referencia). El cambio de una sola base (se trate de una mutación puntual o un polimorfismo) altera la conformación tridimensional de la cadena sencilla produciendo un cambio en su movilidad electroforética y haciendo que la banda correspondiente al fragmento aparezca en una posición diferente a la que se observa en el caso de la secuencia de referencia (Figura 23). Los cambios en la movilidad electroforética pueden hacerse más evidentes, en ocasiones, agregando glicerol al gel. Es importante cuidar que

la temperatura no se eleve mucho, pues esto podría destruir algunas de las conformaciones semiestables (Orita et al., 1989).

Esta técnica es particularmente útil para realizar monitoreos rápidos del estado mutacional de ciertos genes, en especial, cuando existen “puntos calientes” dentro de la secuencia que permiten orientar el análisis a ciertas regiones. Por ejemplo, mediante esta técnica se hizo un estudio de varias muestras tumorales en los que se detectaron numerosos cambios en la movilidad electroforética de fragmentos amplificados de la porción central del gen supresor de tumores *p53*, los que se correlacionaron positivamente con mutaciones puntuales, deleciones puntuales, o inserciones puntuales, detectadas mediante secuenciación directa de tales fragmentos (Gaidano et al., 1991). Sin embargo, la utilidad de esta técnica se ve limitada por el tamaño de los fragmentos a analizar, el cual idealmente debe encontrarse entre 100 y 300 bps (Toledo, 1994). La incorporación de nucleótidos marcados radiactivamente ( $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  dNTP) permite la localización del material genético dentro del gel mediante autorradiografía.

## Productos de PCR

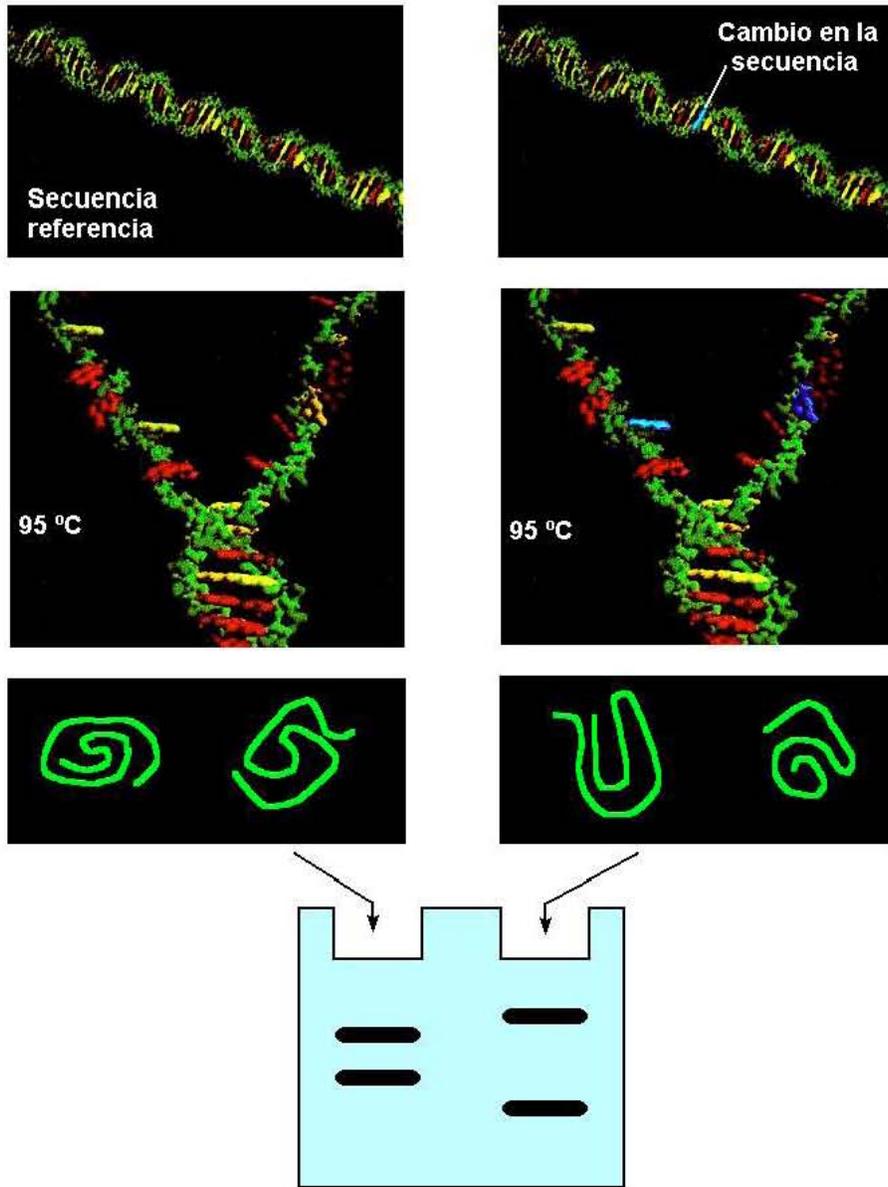


Figura 23. Representación esquemática del fundamento de la técnica de SSCP

**PTT**

La técnica de PTT (Protein Truncation Test o Prueba de Truncamiento de Proteínas) se basa en la transcripción y traducción *in vitro* de una secuencia particular de DNA.

Cuando una mutación genera un codón de paro en una secuencia, o bien, cuando da lugar a un cambio en el marco abierto de lectura en el cual aparece un codón de paro, la traducción de la proteína en cuestión es detenida prematuramente, resultando en un producto truncado cuya función está, si no ausente, al menos alterada.

En esta técnica el fragmento de interés es amplificado mediante PCR (y en ocasiones, RT-PCR), incorporando al oligonucleótido sentido la secuencia promotora (regiones del DNA de doble cadena a las que las RNA polimerasas se unen para iniciar la transcripción (Ritter, 1996)) del bacteriófago T7. Así, cuando los productos de la PCR son agregados a una mezcla que contiene la maquinaria transcripcional del bacteriófago, ésta identifica a su promotor y comienza la transcripción del mRNA correspondiente, el cual es traducido posteriormente en el fragmento de proteína codificado por la secuencia analizada. Si en ésta se encuentra una mutación que produzca un codón de paro, el producto resultante estará truncado, es decir, que tendrá un tamaño menor que el producto de una secuencia nativa.

Cuando estos productos son resueltos en un gel desnaturalizante de poliacrilamida (Sambrook, 1989), una proteína truncada presentará una mayor movilidad electroforética en relación con una proteína nativa (Figura 24). La detección de los productos se realiza a través de la incorporación de aminoácidos marcados radiactivamente ( $[^{35}\text{S}]$  metionina).

Esta técnica ha sido empleada para detectar mutaciones terminadoras de la traducción en la MCR del gen de *APC*, localizada en el exón 15 (Giardiello et al., 1997; van der Luijt et al., 1994; Powell et al., 1993). La PTT es particularmente útil en el caso de este gen, pues las mutaciones están distribuidas a lo largo de una gran porción del mismo, el cual está formado por más 8.5 kbps de marco abierto de lectura (Powell et al., 1993), lo que hace

complicado el análisis de su estado mutacional mediante otras técnicas convencionales como el SSCP (van der Luijt et al., 1994; Groden, 1991).

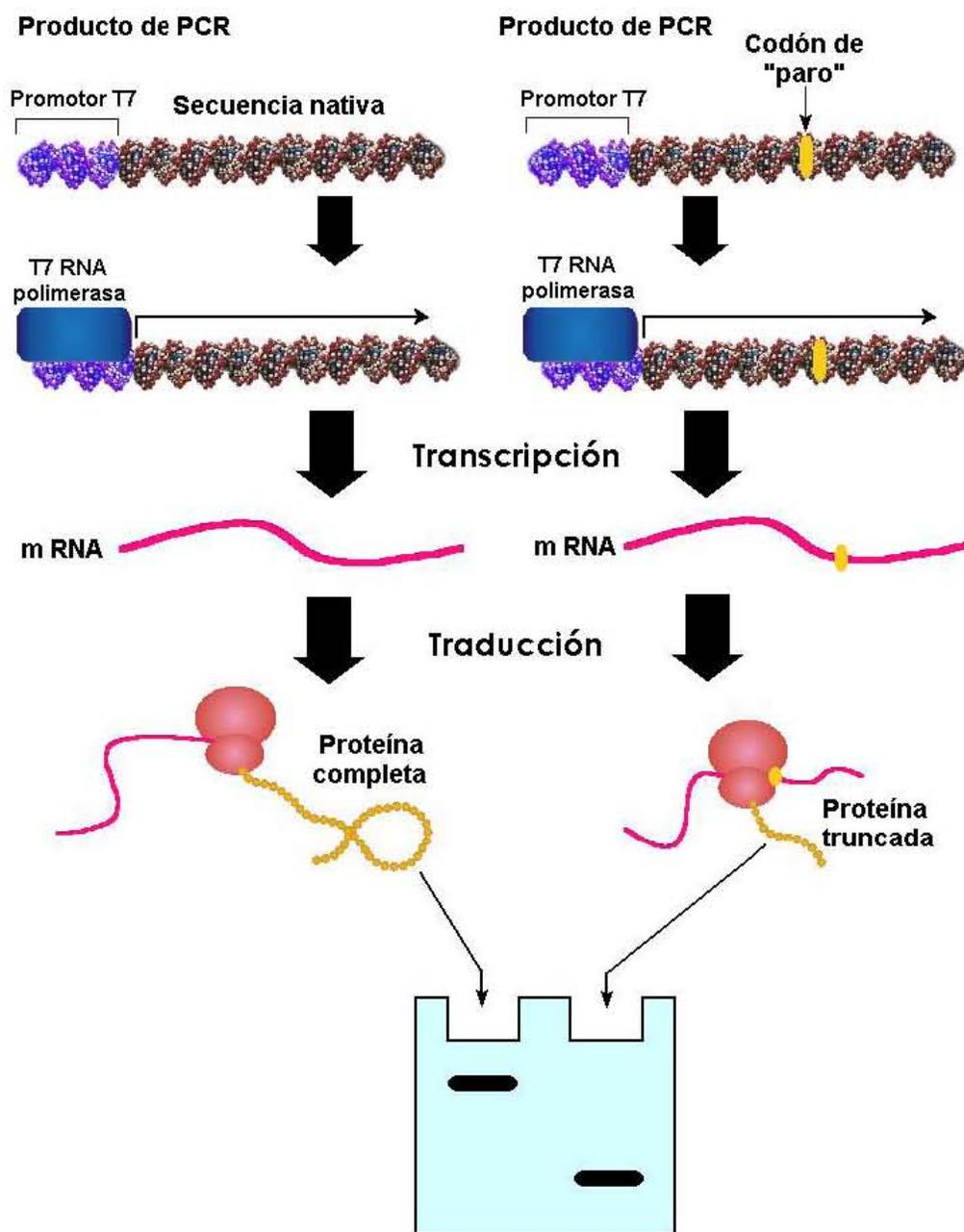


Figura 24. Representación esquemática del fundamento de la técnica de PTT

## Justificación

---

“No hay nada que merezca más nuestro patrocinio que la promoción de la ciencia y literatura. El conocimiento es, en cada país, la base más segura de la felicidad pública.”

GEORGE WASHINGTON, DIRIGIDO AL CONGRESO. ENERO 8, 1790

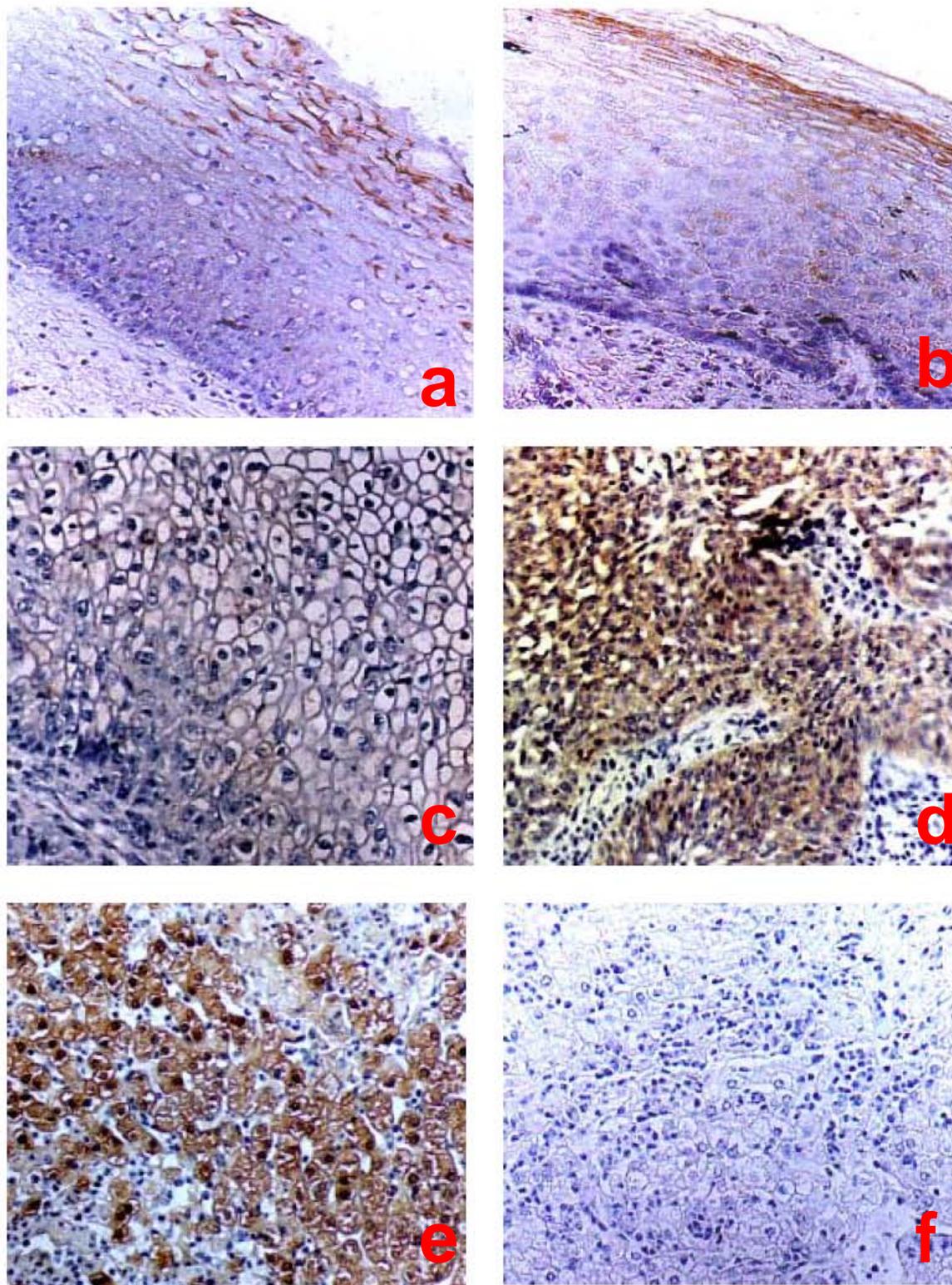
“La investigación básica es donde los científicos son libres para perseguir su curiosidad e interrogar a la Naturaleza, no con un fin práctico a corto plazo en la mira, sino el de buscar el conocimiento por sí mismo [...] Watson y Crick no estaban imaginando la cura de las enfermedades genéticas cuando se rompieron la cabeza sobre la difracción de rayos X del DNA”

CARL SAGAN. “EL MUNDO Y SUS DEMONIOS”, 1996

Existe una fuerte asociación entre el cáncer cervicouterino y la presencia de HPVs de alto riesgo (Peto, 2001). Se sabe que la génesis de esta malignidad está determinada por la disrupción de puntos de chequeo del ciclo celular, como es el caso de las proteínas supresoras de tumores pRb y p53. La ausencia de la última, que es un guardián del genoma, favorece la acumulación de mutaciones y conduce al desarrollo de la patología.

En nuestro laboratorio se ha demostrado, mediante inmunocitoquímica de muestras de tumores cervicouterinos, la localización citoplasmática y/o nuclear de  $\beta$ -catenina en aproximadamente 50% de los casos estudiados (Pereira-Suarez et al., 2002) (Figura 25). Esta no es la primera vez que observan alteraciones concurrentes de la vía de p53 y de  $\beta$ -catenina.

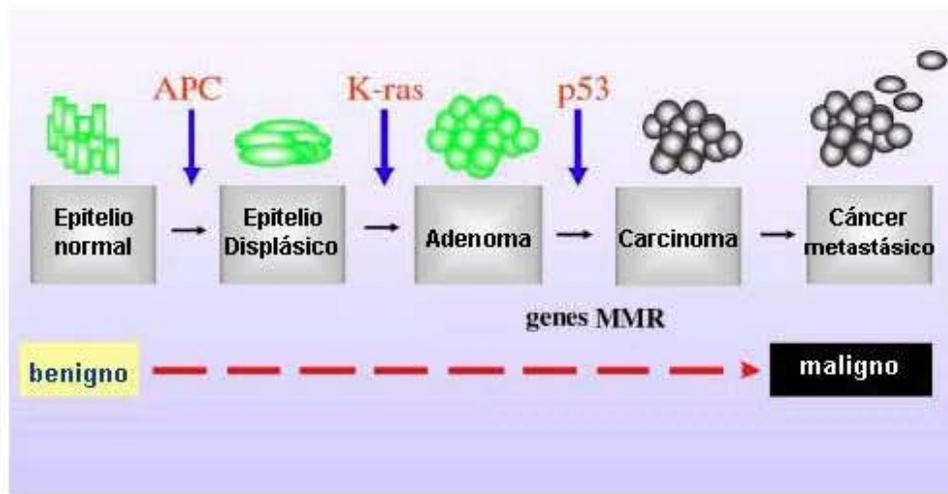
La génesis de los tumores colorrectales se ha asociado con la adquisición progresiva de una variedad de alteraciones genómicas, y se han encontrado mutaciones en ambos genes supresores de tumores *p53* y *APC*, en cerca de dos tercios de los tumores. (Olschwang et al., 1997). Adicionalmente, estos dos genes se encuentran mutados simultáneamente con una alta frecuencia (Smith et al., 2002).



**Figura 25. Localización celular de  $\beta$ -catenina en tumores y líneas celulares de cáncer cervicouterino**  
La localización de  $\beta$ -catenina se determinó por inmunohistoquímica usando un anticuerpo específico contra la misma y tiñendo con peroxidasa. Localización representativa de  $\beta$ -catenina en la membrana celular de dos muestras normales (**a** y **b**) y un tumor (**c**); en el citoplasma (**d**) y núcleo (**e**) de tumores. Control negativo (**f**).

Tomado de (Pereira-Suárez et al., 2002).

Se ha propuesto que en los cánceres colorrectales las mutaciones en p53 son eventos relativamente tardíos, siendo la pérdida de la apoptosis mediada por el mismo una determinante importante de la progresión de adenoma a tumor maligno (Smith et al., 2002). En contraste, se ha encontrado que las mutaciones en APC son suficientes para que estos tumores tempranos crezcan hasta cerca de 1 cm de diámetro, pero dado que éstas son alternativas a las de  $\beta$ -catenina, es posible que algunos de estos tumores se desarrollen a partir de mutaciones en la última (Lamlum et al., 2000) (Figura 26).



**Figura 26. Modelo de los cambios genéticos en el desarrollo de cáncer colorrectal**

Se ha propuesto que el orden de las mutaciones necesarias para progresar desde un epitelio normal hasta un cáncer metastásico son: pérdida de función de *APC*, ganancia de función de *K-ras* (un oncogen), y pérdida de función de *p53* y de los genes de reparación del DNA, *MMR* (MisMatch Repair) (Tomado y modificado de Smith et al., 2002).

*APC* es un gen portero, encargado de mantener un número constante de células probablemente mediante mecanismos apoptóticos y su mutación lleva a un desbalance permanente de la división celular sobre la muerte celular (Kinzler, 1996) a través de la acumulación de  $\beta$ -catenina y la expresión de sus protooncogenes blanco. Por otro lado, *p53* es un “guardián del genoma”, cuya pérdida de función acelera la adquisición de mutaciones (incluso en genes porteros) (Kinzler, 1997).

En vista de estos hechos, es posible pensar que estas dos alteraciones se den en orden inverso en el cáncer cervicouterino: la pérdida de función de p53 a través de su degradación promovida por las oncoproteínas virales del HPV aumentaría la tasa mutacional, con repercusión directa en varios genes, dentro de los cuales podrían contarse *APC*, o alternativamente, *β-catenina*. La alteración de esta vía conferiría a estas células una mayor ventaja selectiva hacia un fenotipo cancerígeno y explicaría la deslocalización de *β-catenina* observada en dichas muestras.

Se desconoce cuál es el estado mutacional de la vía de la *β-catenina* en estas muestras, así como su posible implicación en la patogénesis del cáncer cervicouterino, que es un importante problema de salud pública, en especial, en países en vías de desarrollo.

# Objetivos

---

“Lo conocido es finito, lo desconocido infinito; desde el punto de vista intelectual estamos en una pequeña isla en medio de un océano ilimitable de inexplicabilidad.

Nuestra tarea en cada generación es recuperar algo más de tierra.”

T. H. HUXLEY, 1887

“El hecho es, muchacho, que la materia es mucha, el tiempo de la vida humana breve, los medios de investigación escasos. ¿Comprendes por qué es difícil dar respuestas?

Hace falta humildad. Es preciso estudiar, describir, catalogar, dar un paso tras otro, alcanzar grados cada vez mayores de conocimiento.”

VALERIO MASSIMO MANFREDI “ALÉXANDROS”, 1998

## OBJETIVO GENERAL

Determinar las alteraciones genéticas en la vía de la  $\beta$ -catenina presentes en tumores del cuello uterino asociadas a las alteraciones en la localización subcelular de la proteína.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- ☞ Estudiar el estado mutacional de los exones 6 y 8 del gen supresor de tumores *p53* en las muestras seleccionadas
- ☞ Estudiar el estado mutacional de los exones 3, 4 y 6 del protooncogen  *$\beta$ -catenina* en muestras tumorales y líneas celulares
- ☞ Estudiar el estado mutacional del exón 15 del gen supresor de tumores *APC* en las muestras tumorales y líneas celulares

# Hipótesis

---

“Nuestra única gran ventaja, el secreto de nuestro éxito, es el pensamiento  
- pensamiento característicamente humano. Somos capaces de pensar las cosas,  
imaginar eventos que aún no ocurren, resolver cosas. Así es como inventamos  
la agricultura y la civilización. El pensamiento es nuestra bendición  
y nuestra maldición, y nos hace quienes somos.”

CARL SAGAN. “BILLIONS & BILLIONS” 1997

“Denme la posición y el movimiento de cada partícula  
del universo en un instante dado  
y podré predecir el futuro con certidumbre.”

PIERRE SIMON DE LAPLACE. (1749-1827)

## HIPÓTESIS DE TRABAJO

- ☉ No hay mutaciones en los exones 6 y 8 del gen supresor de tumores *p53* en las muestras estudiadas
- ☉ Las alteraciones en la localización subcelular de  $\beta$ -catenina son producto de las mutaciones en alguno de sus exones
- ☉ Las alteraciones en la localización subcelular de  $\beta$ -catenina se deben a mutaciones truncantes en el exón 15 de *APC*

# Material y métodos

---

“Empezaba el verdadero viaje. Hasta entonces las fatigas habían sido superiores a las dificultades; ahora alguna de éstas nacerá a cada paso [...]

Para allanar esta dificultad, mi tío ideó un medio muy sencillo.”

JULIO VERNE. “VIAJE AL CENTRO DE LA TIERRA”,

“[...] si anoche nos cerró la ventura la puerta de la que buscábamos, [...] ahora nos abre de par en par otra, para otra mejor y más cierta aventura, que si yo no acertare a entrar por ella, mía sería la culpa”

MIGUEL DE CERVANTES. “DON QUIJOTE DE LA MANCHA”, 1605

## Electroforesis en gel de agarosa

La concentración de agarosa básica Le (Pronadisa. Madrid, España) empleada en cada caso, dependió del tamaño de los fragmentos a separar, y se determinó de acuerdo con la siguiente tabla:

**Tabla 2. Rango de separación de fragmentos de DNA en geles con diferentes cantidades de agarosa**

Las concentraciones de agarosa más comúnmente empleadas para los experimentos aquí descritos fueron de 1.0% y 2.0%, en función del tamaño de los fragmentos de interés. (Tabla tomada de Sambrook, 1989).

Cantidad de agarosa (% peso/vol)	Rango de separación eficiente de moléculas lineales de DNA (kpbs)
0.3	5-60
0.6	1-20
0.7	0.8-10
0.9	0.5-7
1.2	0.4-6
1.5	0.2-3
2.0	0.1-2

En todos los casos se empleó buffer TBE 1X (ver Apéndice) y se incorporó bromuro de etidio a una concentración final de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Las electroforesis se corrieron con buffer TBE 1X a un voltaje constante de 90 a 100 V. (Cámara: BioRad Mini Sub CE. BioRad, Hercules, CA). En general, se adicionó 20% (vol/vol) de buffer de carga (ver Apéndice) a cada muestra.

Los geles fueron observados y fotografiados empleando transiluminación UV (254 –366 nm).

El protocolo empleado para la descontaminación de geles y material en contacto con bromuro de etidio es el siguiente (Tomado de Bloom, 1996):

Agregar agua para reducir la concentración de bromuro de etidio a menos de 0.5 mg/mL. Agregar un volumen de  $\text{KMnO}_4$  0.05 M y mezclar cuidadosamente. Agregar un volumen de HCl 0.25 N y mezclar cuidadosamente. Dejar reposar la solución a temperatura ambiente durante varias horas. Agregar un volumen de NaOH 0.25 N y mezclar cuidadosamente. Descartar la solución inactivada en la tarja, decantar los geles inactivados y eliminarlos en la basura normal.

### **SSCP del exón 6 del gen supresor de tumores *p53***

Se realizó la amplificación del exón 6 de *p53* empleando los oligonucleótidos citados en la Tabla 3. Las concentraciones de reactivos en la reacción de PCR (Termociclador: Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400) fueron: Buffer de reacción (GIBCO): 1x;  $\text{Mg}^{2+}$ : 1.5 mM; dNTPs: 200  $\mu\text{M}$ ; oligonucleótidos: 1 pmol/ $\mu\text{L}$ ; *Taq* DNA polimerasa (GIBCO Cat. No. 11615): 0.1 U/ $\mu\text{L}$ . Se usó una cantidad de DNA genómico de cada muestra a estudiar de aproximadamente 200 ng, dependiendo de su calidad. Se incluyó un control negativo de amplificación al que se agregó agua en lugar de DNA para detectar la posible presencia de material genético contaminante.

La reacción de PCR consistió en 40 ciclos de amplificación con las siguientes temperaturas: desnaturalización, 94° C por 1 minuto; alineación, 63° C por 1 minuto; extensión, 72° C por 1 minuto; con un periodo inicial de desnaturalización de 95° C por 5 minutos y uno final de extensión a 72° C por 5 minutos.

Para la reacción de SSCP se emplearon las mismas condiciones de reacción pero los dNTPs fueron sustituidos por dATP, dTTP, y dGTP: 200  $\mu$ M; dCTP: 1.25 $\mu$ M; [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP: 5x10<sup>-4</sup> mCi (Easytides Cat. No. BLU NEG/513H). Una vez amplificadas las muestras, se tomaron 2  $\mu$ L de cada una y se les agregaron 30  $\mu$ L de buffer de SSCP (ver Apéndice). Estas muestras se desnaturalizaron a 95° C durante 15 minutos y se colocaron inmediatamente en hielo para cargar aproximadamente 3  $\mu$ L/pozo (o el volumen necesario para obtener señales de intensidad óptima) en un gel de poliacrilamida (16 x 19.5 cm x 0.75 mm) 12.5% y glicerol 5% (ver Apéndice), el cual se corrió a 1.5 W durante 21 h a temperatura ambiente (Cámara PAGE: Life Technologies. Modelo V16). Se incluyó una muestra sin desnaturalizar para comparación, y un control negativo de amplificación. El gel se secó usando vacío y calor (Secadora: Drygel Sr. Hoeffer Scientific Instruments. Modelo SE1160; Vacío: Brinkmann Instruments, Inc, NY. Modelo B169) y se obtuvo una autorradiografía exponiéndolo (Kodak Film X-Omat, XK-1. Estam Kodak Company, NY) a -70° C durante 24 h.

### **SSCP del exón 8 del gen supresor de tumores *p53***

Los oligonucleótidos empleados para amplificar el exón 8 de *p53* se especifican en la Tabla 3. Se realizó una curva de magnesio y las concentraciones de los reactivos empleadas en la reacción fueron: Buffer de reacción: 1x; Mg<sup>2+</sup>: 2.0 mM; dNTPs: 200  $\mu$ M; oligonucleótidos: 1 pmol/ $\mu$ L; *Taq* DNA polimerasa: 0.1U/ $\mu$ L. Se usó una cantidad aproximada de DNA genómico de cada muestra a estudiar de 200 ng, dependiendo de su

calidad. Se incluyó un control negativo de amplificación al que se agregó agua en lugar de DNA.

La reacción de PCR consistió en 40 ciclos de amplificación con las siguientes temperaturas: desnaturalización, 95° C por 30 segundos; alineación, 58° C por 30 segundos; extensión, 72° C por 1 minuto; con un periodo inicial de desnaturalización de 95° C por 5 minutos y uno final de extensión a 72° C por 7 minutos. La técnica de SSCP se realizó bajo las mismas condiciones citadas para el exón 6.

**Tabla 3. Oligonucleótidos empleados para el análisis de *p53***

En la última columna se especifica el tamaño del fragmento amplificado correspondiente a cada exón. Nótese que este tamaño permite su análisis mediante la técnica de SSCP. La guanina se indica con letra minúscula para evitar confusiones (Secuencias tomadas de Toledo, 1994).

EXÓN	SENTIDO	OLIGONUCLEÓTIDO	FRAGMENTO (bps)
6	Sentido	5'-ACA $g$ ggCTggTTGCCCA $g$ ggT-3'	184
	Antisentido	3'-TCAACgTTTggTCTggAgTC-5'	
8	Sentido	5'-TATCCTgAgTAgTggTAATC-3'	213
	Antisentido	3'-CAATACggAgTCTAAgTggA-5'	

### **Secuenciación directa del exón 6 del gen supresor de tumores *p53***

A fin de determinar el estado mutacional del exón 6 de *p53* en dos líneas celulares, se realizó la secuenciación directa del mismo empleando una modificación del método de los dideoxinucleótidos reportada por Sanger y colaboradores (Sanger, 1977). Se amplificó el exón 6 de las líneas celulares C33A y SW480 de la forma antes descrita, ajustando las cantidades para un volumen final de reacción de 50  $\mu$ L. Las muestras fueron purificadas del gel de agarosa (2%, ver Apéndice) empleando el kit QIAEX II (Qiagen. Hilden, Alemania) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Para cada conjunto de 4 reacciones de secuenciación se emplearon 25 pmol de uno de los oligonucleótidos (en el otro conjunto se empleó el otro oligonucleótido para secuenciar ambas cadenas), 2  $\mu\text{L}$  de buffer de reacción (incluido en el kit, ver Apéndice); 8U de la enzima Thermo Sequenase (USB Corp. Cleveland, OH); 50 a 500 ng del producto de PCR;  $\text{H}_2\text{O}$  hasta completar 20  $\mu\text{L}$  totales. Esta mezcla se dividió en 4 tubos, a cada uno se le agregaron 2  $\mu\text{L}$  de la Nucleotide Master Mix (incluida en el kit) (dNTPs 7.5  $\mu\text{M}$ ), y a cada uno se agregaron 0.5  $\mu\text{L}$  de un dideoxinucleótido trifosfato diferente (terminador de la reacción de elongación) marcado radiactivamente ( $[\alpha\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ddNTP}$ ). El programa de secuenciación consistió en 30 ciclos de 95° C por 30 segundos; 55° C por 30 segundos; y 72° C por 1 minuto. Una vez terminada la reacción se agregaron 4  $\mu\text{L}$  de buffer de paro (ver Apéndice). Las muestras se calentaron a 70° C por 10 minutos y se cargaron 4  $\mu\text{L}$  en cada pozo del gel de secuenciación (41 cm x 37 cm x 0.75 mm) (ver Apéndice), el cual se corrió a 75 W durante 1.5 a 2 h (Cámara: Stratagene Mod. BaseAce Sequencer. Stratagene. La Jolla, CA). Se dejó enfriar el gel, se adhirió a papel Whatman y se cubrió con plástico para obtener una autorradiografía exponiéndolo (Película Kodak X-Omat AR) a -70° C durante 5 días.

### **SSCP de los exones 3, 4 y 6 de $\beta$ -catenina**

Se realizaron curvas de  $\text{Mg}^{2+}$  para determinar la concentración óptima de este reactivo. Los oligonucleótidos empleados para amplificar estos exones se presentan en la Tabla 4:

**Tabla 4. Oligonucleótidos empleados para amplificar exones de  $\beta$ -catenina**

En la última columna se especifica el tamaño del fragmento amplificado correspondiente a cada exón. Nótese que este tamaño permite su análisis mediante la técnica de SSCP. La guanina se indica con letra minúscula para evitar confusiones (Secuencias del exón 3 tomadas de Pereira-Suárez et al., 2002. Exones 4 y 6 tomadas de [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)).

EXÓN	SENTIDO	OLIGONUCLEÓTIDO	FRAGMENTO (bps)
3	Sentido	5'-gCTgATTTgATggAgTTggAC-3'	236
	Antisentido	3'- TCTTgTCATCgACCATTCTC -5'	
4	Sentido	5'-AACCTTTTCCAgATATTgATggAC-3'	278
	Antisentido	3'-gCTCCTggTCCATTcGTTACTg-5'	
6	Sentido	5'-TCTTCTTCCCAgTTCACCAgT-3'	219
	Antisentido	3'-CgTTggTTCTTTCgTTCCATTC-5'	

Las concentraciones de los reactivos empleadas en todas las reacciones fueron: Buffer de reacción: 1x;  $Mg^{2+}$ : 1.0 mM; dNTPs: 100  $\mu$ M; oligonucleótidos: 0.5 pmol/ $\mu$ L; *Taq* DNA polimerasa: 0.1 U/ $\mu$ L. Se usó una cantidad aproximada de DNA genómico de cada muestra a estudiar de 150 ng, dependiendo de su calidad. Se incluyó un control negativo de amplificación. El programa usado para las reacciones de PCR, en el caso de los tres exones, consistió en 40 ciclos de 94° C por 30 segundos, 55° C por 45 segundos, y 72° C por 30 segundos, con una fase inicial de desnaturalización de 94° C por 5 minutos, y una final de extensión de 72° C por 10 minutos. Los reactivos y condiciones para la técnica de SSCP son los mismos descritos para los exones 6 y 8 de *p53*.

Se hizo una prueba preliminar incluyendo muestras desnaturalizadas y sin desnaturalizar de los exones 3, 4 y 6, amplificadas a partir de dos cantidades diferentes de DNA (100 y 300 ng) de la línea celular SW480, a fin de determinar la adecuada resolución de las bandas desnaturalizadas y su discriminación con las no desnaturalizadas. Este gel se corrió durante 9 h.

### Pruebas de Truncamiento de Proteínas para el estudio de APC

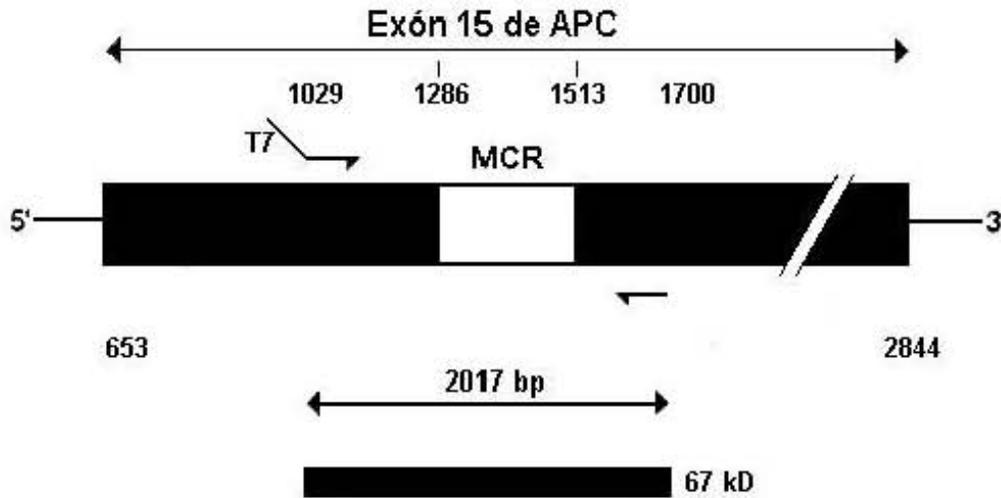
Se sintetizó el par de oligonucleótidos descritos en la Tabla 5, específicos para un fragmento del exón 15 del gen supresor de tumores APC.

**Tabla 5. Oligonucleótidos empleados para amplificar el exón 15 de APC**

El oligonucleótido sentido contiene la secuencia promotora del bacteriófago T7 incorporada al inicio del mismo, indicada en negritas (Secuencias tomadas de Van der Luijt et al., 1994).

SENTIDO	SECUENCIA	FRAGMENTO (bps)
Sentido	5'- <b>ggATCCTAATACgACTCACTATAggAACAgAC</b> <b>CACCATg</b> CTTAAATATTCAGATgAgCAGTTgAA-3'	2,017
Antisentido	3'-CgTCTTCATgTCTACTCCgAg-5'	

Los oligonucleótidos se unen a las posiciones 3103 a 3128 (sentido), y 5099 a 5119 (antisentido), de la secuencia de cDNA de APC. El producto de PCR tiene un tamaño de 2 kbps que corresponde a los codones 1028-1700, dentro de los cuales se encuentra la MCR (localizada entre los codones 1286 y 1513) y cuyo producto de traducción corresponde a un péptido de 67 kD (Figura 27) (van der Luijt et al., 1994).



**Figura 27. Oligonucleótidos y productos del análisis de APC por PTT**

El espacio blanco dentro de la caja negra representa a la MCR. Se indica la posición a la que se une cada uno de los oligonucleótidos, así como el tamaño del producto de la traducción (las líneas enmarcadas por flechas representan fragmentos de DNA y las cajas negras representan péptidos).  
(Tomado y modificado de van der Luijt et al., 1994).

Las concentraciones de reactivos usadas para las reacciones fueron: Buffer de reacción: 1x;  $MgCl_2$ : 1.0 mM; oligonucleótidos: 0.5 pmol/ $\mu$ L; dNTPs: 100  $\mu$ M; se agregaron 0.1 U/ $\mu$ L de *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen Cat. No. 11615) y aproximadamente 15 ng/ $\mu$ L de DNA genómico. La reacción de PCR consistió en 35 ciclos de 95° C por 40 segundos; 57° C por 45 segundos; y 72° C por 1 minuto; con una fase inicial de desnaturalización de 95° C por 5 minutos, y una fase final de extensión a 72° C por 10 minutos.

Una vez determinadas las condiciones óptimas para cada muestra se realizaron reacciones en un volumen final de 50  $\mu$ L, los cuales fueron cargados en su totalidad en cada pozo y resueltos en un gel de agarosa 1%, del que se cortaron las bandas correspondientes para ser purificadas empleando el kit QIAEX II (Qiagen. Hilden, Alemania) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Para la transcripción/traducción *in vitro* se tomaron 2.8  $\mu$ L de cada uno de los productos purificados y se colocaron en un tubo individual. Para preparar la reacción, a cada tubo se

agregaron 5  $\mu\text{L}$  del Lisado de Reticulocitos de Conejo (TnT® Coupled Reticulocyte Lysate Systems. Promega Corporation, WI, EUA Cat. No. L4611) o bien, 5  $\mu\text{L}$  del Lisado de Germen de Trigo (TnT® Coupled Wheat Germ Extract System. Promega Corporation, WI, EUA Cat. No. L4140); 0.4  $\mu\text{L}$  de Buffer de Reacción TnT®; 0.2  $\mu\text{L}$  de RNA polimerasa de T7; 0.2  $\mu\text{L}$  de la mezcla de aminoácidos 1 mM libres de Metionina; 1.2  $\mu\text{L}$  de L-[<sup>35</sup>S]Metionina (Amersham Pharmacia Cat. No. AG1094); y 0.2  $\mu\text{L}$  de Inhibidor de RNAsas (RNasin. Promega Cat. No. N2111). Adicionalmente, se preparó un control negativo en el que se sustituyó el producto de PCR por agua, y un control positivo de Luciferasa al que se agregaron 0.4  $\mu\text{L}$  de plásmido (suministrado con el kit TnT®) y 2.6  $\mu\text{L}$  de agua. Los tubos fueron incubados 1.5 horas a 30° C en baño María de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

Los productos proteicos obtenidos en la reacción de traducción se resolvieron en un gel vertical de poliacrilamida (Gel concentrador, 5%: 4 x 19.5 cm x 0.75 mm. Gel separador, 10%: 12 x 19.5 cm x 0.75 mm. Ver Apéndice) que se corrió a una corriente constante de 22 mAmp por 2 a 3 horas, dependiendo de la posición de los marcadores de peso molecular (BioRad Low Range. Cat. No. 161-0375EDU. Rainbow Low Range: Amersham Cat. No. RPN755. Rainbow High Range: Amersham Cat. No. RPN756.). El gel fue secado y expuesto (sin envolver en plástico) durante 24 a 48 hrs. y se ubicó la posición de las bandas de los marcadores de peso para el análisis de los resultados.

# Resultados

---

“[...] ni el más sabio conoce el fin de todos los caminos.”

JOHN RONALD REUEL TOLKIEN. “EL SEÑOR DE LOS ANILLOS”, 1954

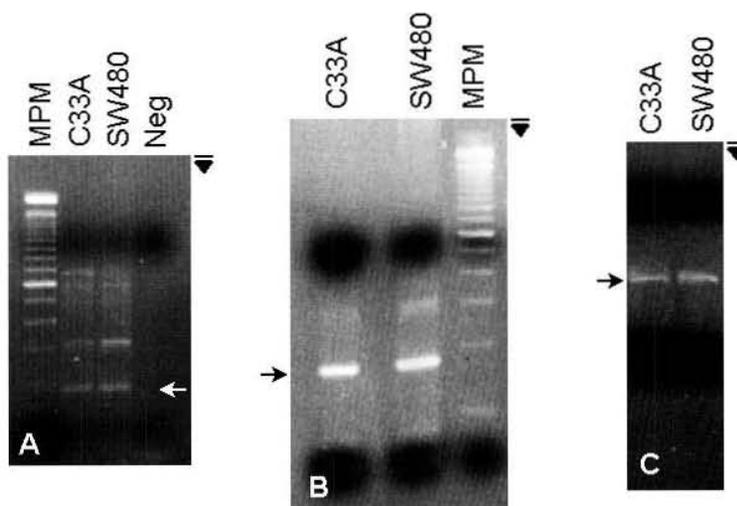
“Examinaré sus originales con espíritu de humildad. Estoy persuadido de que incluso en el texto más pobre encontraré una chispa, si no de verdad, al menos de extravagante falacia, y muchas veces los extremos se tocan. Sólo la trivialidad logrará aburrirme”

UMBERTO ECO. “EL PÉNDULO DE FOUCAULT”, 1989

## **ANÁLISIS DE POSIBLES ALTERACIONES DEL GEN SUPRESOR DE TUMORES *p53***

### **Exón 6**

Con el objeto de detectar, o en su defecto excluir, la presencia de posibles alteraciones en los puntos calientes del supresor de tumores *p53*, se sintetizaron los oligonucleótidos correspondientes al exón 6 del mismo (ver Material y métodos) y se prepararon alícuotas a las concentraciones necesarias. La reacción de amplificación se realizó como se describió con anterioridad (Toledo, 1994) para las líneas celulares C33A y SW480, en un volumen final de 10  $\mu\text{L}$  (Figura 28A). La reacción se escaló a 50  $\mu\text{L}$  (Figura 28B); las bandas fueron cortadas y purificadas usando el kit QUIAEX II (Figura 28C).



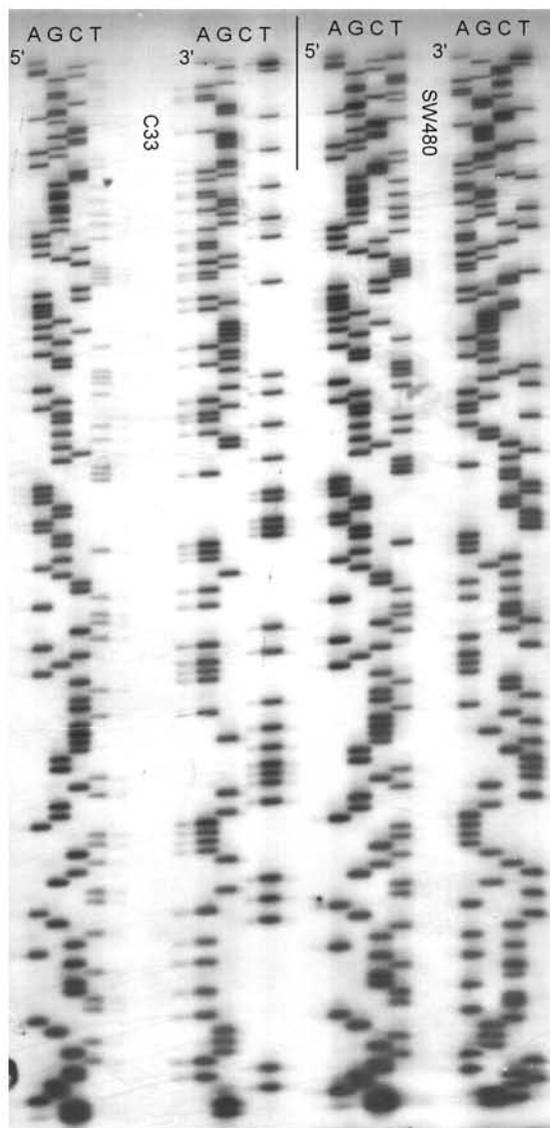
**Figura 28. Amplificación y purificación del producto de PCR del exón 6 de *p53***

Las flechas señalan la posición de los productos correspondientes al exón 6 (184 bps).

MPM: Marcador de pesos moleculares (100 bps); Neg: Control negativo de amplificación.

A: Reacción en 10 µL; B: Reacción en 50 µL; C: Productos purificados.

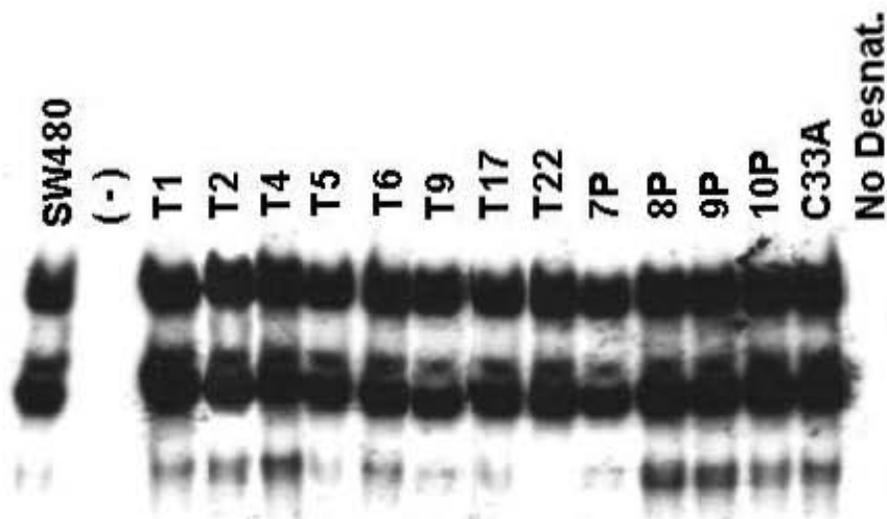
Se realizó la secuenciación directa de estas muestras (Figura 29). Los resultados fueron comparados con la secuencia nativa del gen en la base de datos BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast), Junio 2000) del NIH, observándose una identidad de 100% y demostrando la ausencia de mutaciones en el exón 6 de *p53* en estas dos líneas celulares, en virtud de lo cual, fueron empleadas como control negativo de mutación (es decir, que la secuencia de referencia es nativa) en los subsecuentes análisis por SSCP.



**Figura 29. Ausencia de alteraciones en el exón 6 de *p53* en las líneas celulares C33A y SW480**

Se presenta la secuencia de ambas cadenas para las dos muestras. Aunque se perdió la línea correspondiente a citocina en la dirección 3' de C33A, la misma puede deducirse a partir de la secuencia de la cadena complementaria.

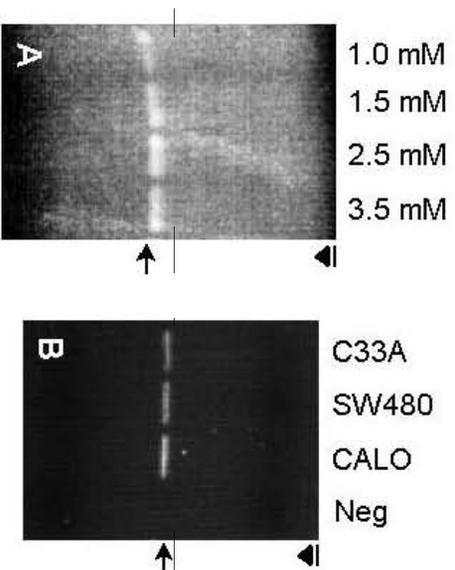
El análisis por SSCP de las muestras de tumores de cáncer cervicouterino en las que se demostró localización citoplasmática y/o nuclear de  $\beta$ -catenina reveló, mediante la comparación con las secuencias nativas de las líneas celulares C33A y SW480, la ausencia de mutaciones en el exón 6 del gen supresor de tumores *p53* (Figura 30).



**Figura 30. Ausencia de alteraciones en el exón 6 de *p53* en muestras tumorales y en líneas celulares**  
 Los nombres de las muestras corresponden a la nomenclatura interna del laboratorio. (-) es el control negativo de amplificación. SW480 y C33A son los controles normales.

### Exón 8

Se sintetizaron los oligonucleótidos correspondientes (ver Material y métodos) y se prepararon alícuotas a las concentraciones necesarias. Se realizó una curva de magnesio con las condiciones descritas previamente (Toledo, 1994) a fin de determinar la concentración óptima de este reactivo (Figura 31A). Se realizaron amplificaciones para determinar la especificidad de la reacción y al ser resueltas las muestras en un gel de agarosa no se observaron bandas inespecíficas (Figura 31B).

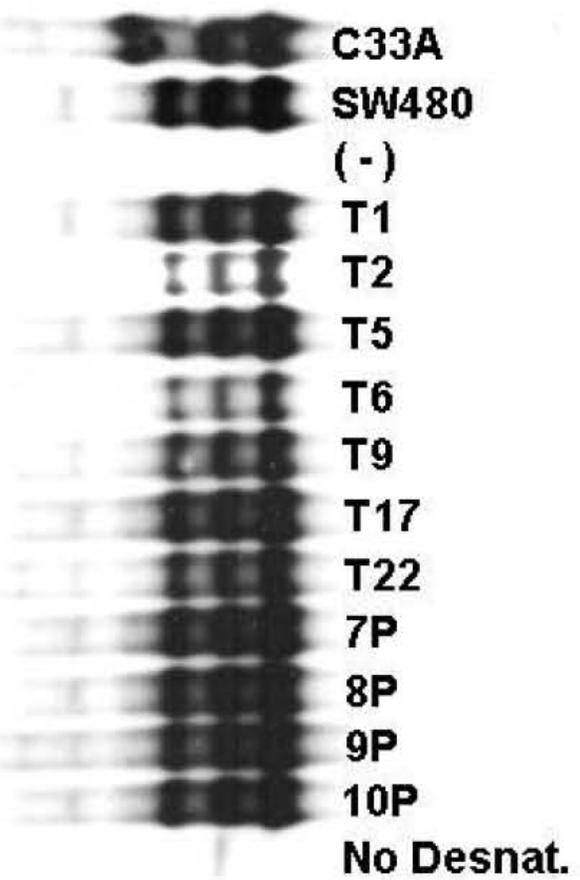


**Figura 31. Amplificación del exón 8 de  $p53$  con diferentes concentraciones de  $Mg^{2+}$**

Las flechas señalan la posición de los productos correspondientes al exón 8.

En la parte superior de A se expresan las concentraciones de  $MgCl_2$  usadas en cada reacción. En la parte superior de B se indican las muestras analizadas.

El análisis mediante SSCP permitió determinar la ausencia de mutaciones en el exón 8 del supresor de tumores  $p53$  en las muestras analizadas (Figura 32).



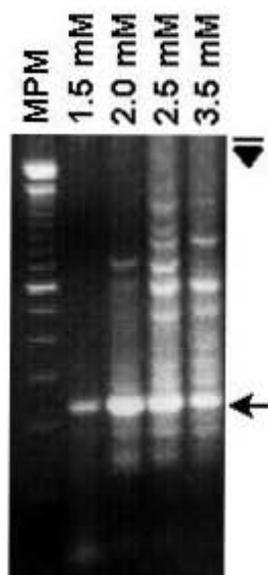
**Figura 32. SSCP del exón 8 de  $p53$  en muestras tumorales y en líneas celulares**

Los nombres de las muestras corresponden a la nomenclatura interna del laboratorio. (-) es el control negativo de amplificación y en el último carril se colocó una muestra que no fue sometida a desnaturalización. C33A es el control positivo de mutación (Scheffner et al., 1991) y SW480 es el control normal.

## ANÁLISIS DE POSIBLES ALTERACIONES DEL GEN $\beta$ -CATENINA

### Exón 3

Con el objeto de establecer una relación de causalidad entre la posible presencia de mutaciones en el extremo N-terminal de  $\beta$ -catenina y su localización celular anormal, se sintetizaron los oligonucleótidos correspondientes y se prepararon alícuotas a las concentraciones necesarias. Se hizo una curva de magnesio (Figura 33) que permitió determinar la concentración de este reactivo a emplear en experimentos subsecuentes.

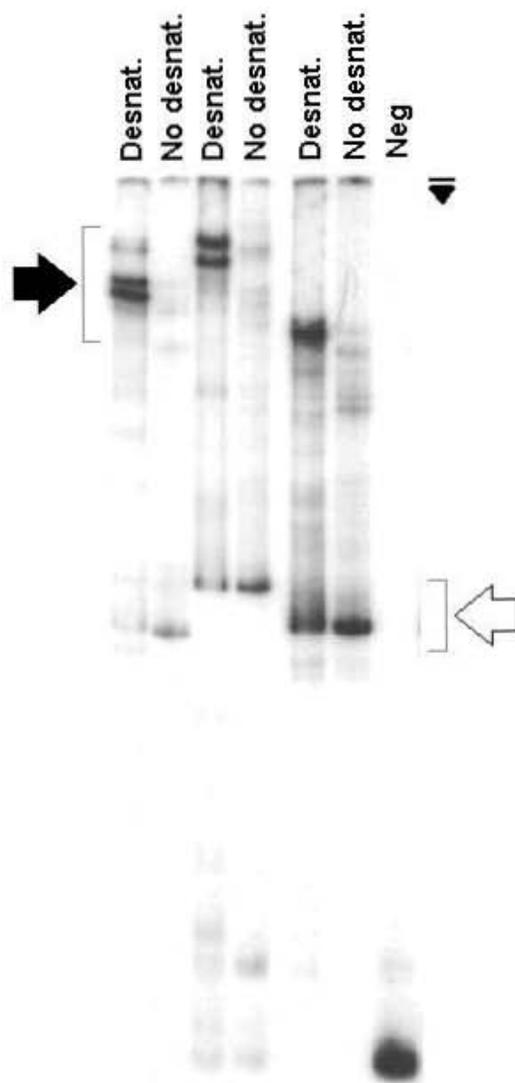


**Figura 33. Amplificación del exón 3 de  $\beta$ -catenina con diferentes concentraciones de  $Mg^{2+}$**

La flecha señala la posición del producto de interés. Nótese que a concentraciones superiores a 2.0 mM se da una fuerte amplificación inespecífica. MPM: Marcador de pesos moleculares.

Una vez estandarizadas las condiciones de la reacción de amplificación se realizó la reacción de SSCP para los exones 3, 4 y 6 y se corrieron durante 9 h en un gel preliminar para determinar la adecuada resolución de las bandas de interés, así como su posición en relación con los controles no desnaturalizados (productos de la reacción de SSCP a los que no se agrega buffer de SSCP ni se desnaturaliza con calor) (Figura 34).

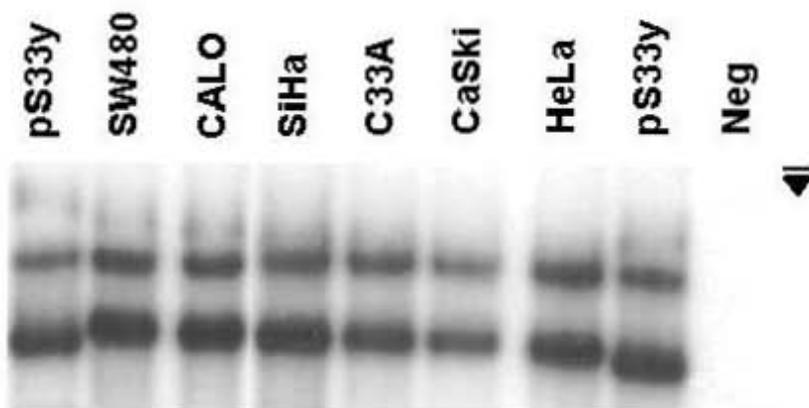
Este gel preliminar permitió asegurar que las muestras están suficientemente desnaturalizadas y que este procedimiento disminuye su movilidad electroforética de tal forma que pueden ser distinguidas de las no desnaturalizadas. Adicionalmente, se confirmó que el tiempo de corrimiento del gel se puede extender a 24 h aumentando con ello la resolución de las diferentes bandas y asegurando que éstas no se pierdan.



**Figura 34. Adecuada resolución de bandas a las condiciones establecidas para el SSCP de  $\beta$ -catenina**

Los primeros dos carriles corresponden al exón 3; los siguientes dos, al 4; los últimos dos, al 6. Neg es un control negativo de amplificación. La flecha negra señala la zona en donde se encuentran las bandas de interés para el análisis (cadenas sencillas). La flecha blanca señala la zona en donde aparecen los productos de la reacción no desnaturalizados. Nótese que a pesar de que la desnaturalización puede no ser completa, permite una adecuada resolución de las cadenas sencillas.

Se realizó un análisis por SSCP del estado mutacional del exón 3 del gen de *β-catenina* en diferentes líneas celulares empleando a la línea de cáncer colorrectal SW480 como secuencia nativa de referencia, pues en ella no se han encontrado mutaciones en este gen (Ilyas et al., 1997). Como control positivo de mutación se empleó un plásmido en el que está clonado el exón 3 de *β-catenina* con una mutación en el codón 33 (S a Y). Aunque no se consiguieron controles positivos para las otras mutaciones reportadas en este exón, este análisis permite validar la técnica, demostrando la diferencia en la movilidad electroforética entre la secuencia de referencia y una mutada (Figura 35).

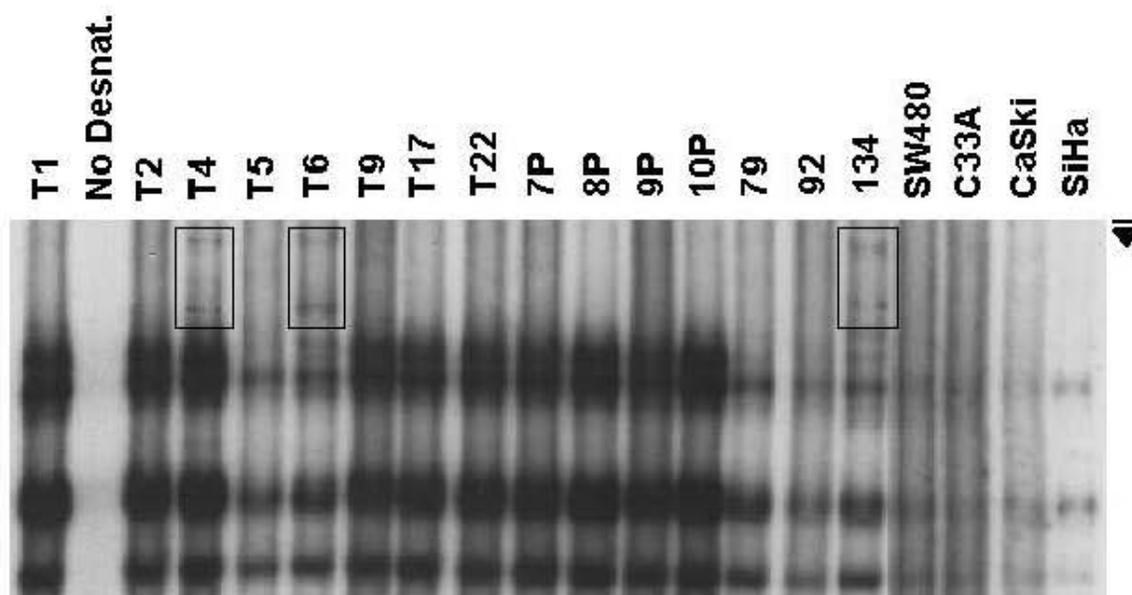


**Figura 35. Análisis por SSCP del exón 3 de *β-catenina* en diferentes líneas celulares**

La secuencia clonada en el plásmido pS33y (colocado en los carriles primero y último, para compensar defectos de corrimiento del gel) contiene una mutación puntual en el codón 33 que es detectable mediante esta técnica. Nótese el aumento en la movilidad electroforética de la banda inferior en relación con el DNA de las líneas celulares. No se debe confundir la menor intensidad de las bandas de CaSki con un cambio de posición de las mismas. Neg: control negativo de amplificación.

En vista de que no hay cambios en la movilidad electroforética de las bandas obtenidas a partir de la amplificación de líneas celulares, en comparación con las de SW480, se demuestra que no existen mutaciones en el exón 3 del gen de *β-catenina* en las líneas analizadas.

Por su parte, el análisis por SSCP de las muestras de tumores cervicouterinos demostró la ausencia de mutaciones en esta importante región reguladora de  $\beta$ -catenina (Figura 36).

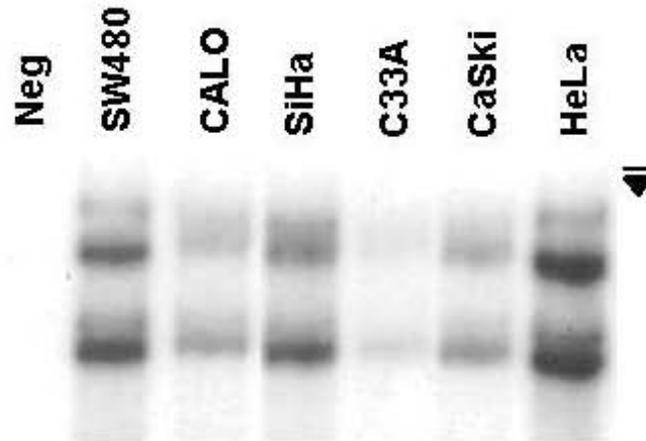


**Figura 36. Ausencia de alteraciones en el exón 3 de  $\beta$ -catenina en muestras tumorales**

Los nombres de las muestras corresponden a la nomenclatura interna del laboratorio. Las muestras T4, T6 y 134 mostraron bandas adicionales (encerradas en los recuadros) que son artefactos de la técnica.

#### Exón 4

Se realizó un análisis del estado mutacional del exón 4 del gen de  $\beta$ -catenina en líneas celulares (Figura 37) y en las muestras tumorales (Figura 38). Este estudio reveló la ausencia de mutaciones en este exón en todos los especímenes analizados.



**Figura 37. Análisis por SSCP del exón 4 de  $\beta$ -catenina en diferentes líneas celulares**

Aunque parece haber una diferente movilidad electroforética entre los productos analizados, este artefacto se debe a las diferencias en intensidad de las bandas. Neg: control negativo de amplificación.

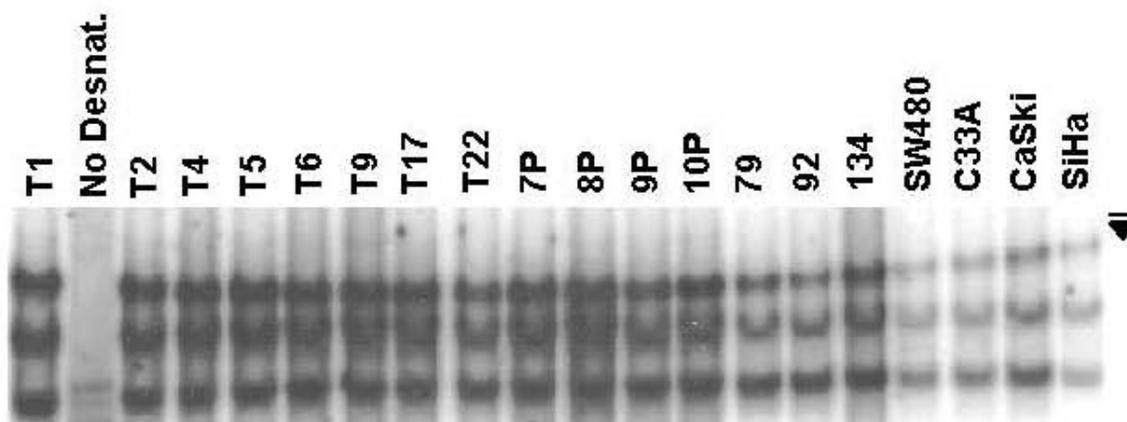


**Figura 38. Ausencia de alteraciones en el exón 4 de  $\beta$ -catenina en muestras tumorales**

La línea celular SW480 no presenta mutaciones en el gen de  $\beta$ -catenina y por lo tanto puede emplearse como secuencia nativa de referencia. Nótese que los tumores no presentan alteraciones en este exón.

### Exón 6

El análisis por SSCP del exón 6 del gen de  $\beta$ -catenina demostró la ausencia de mutaciones en las líneas celulares y las muestras tumorales (Figura 38).



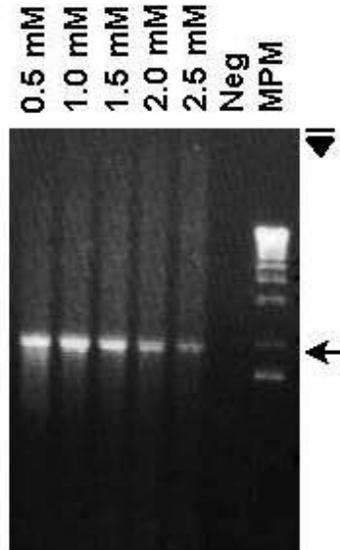
**Figura 39. Ausencia de alteraciones en el exón 6 de  $\beta$ -catenina en muestras tumorales**

Aunque podría pensarse que hay diferencias en la movilidad electroforética de las líneas celulares, estas alteraciones en la posición de las bandas se deben a un artefacto del corrimiento del gel.

### ESTADO MUTACIONAL DEL GEN SUPRESOR DE TUMORES APC

En vista de la ausencia de mutaciones en los exones de  $\beta$ -catenina estudiados, se buscó la presencia de mutaciones truncantes en APC, para lo cual se realizó la amplificación por PCR de un fragmento del exón 15, empleando un par de oligonucleótidos con los que se generó un producto de 2 kbps dentro del cual se encuentra la MCR (van der Luijt et al., 1994). El oligonucleótido sentido está precedido por la secuencia del promotor del bacteriófago T7.

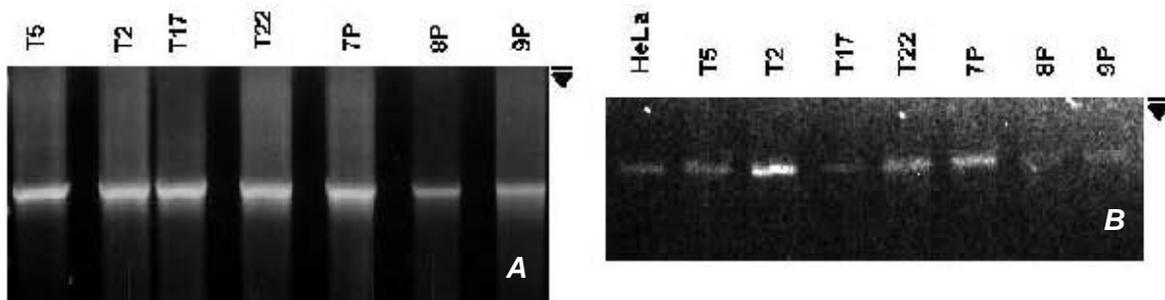
Mediante una curva de magnesio (Figura 40) se determinó la concentración óptima de este reactivo para emplear en las reacciones subsecuentes.



**Figura 40. Amplificación del exón 15 de APC con diferentes concentraciones de  $Mg^{2+}$**

La flecha señala la posición del producto de la reacción (2 kbps). En la parte superior se expresan las concentraciones de  $MgCl_2$  empleadas en cada reacción. El marcador de pesos moleculares utilizado en estos experimentos es la escalera de 1 kbps.

Se obtuvo el producto de PCR de diferentes muestras (Figura 41A), las cuales fueron posteriormente purificadas (Figura 41B).

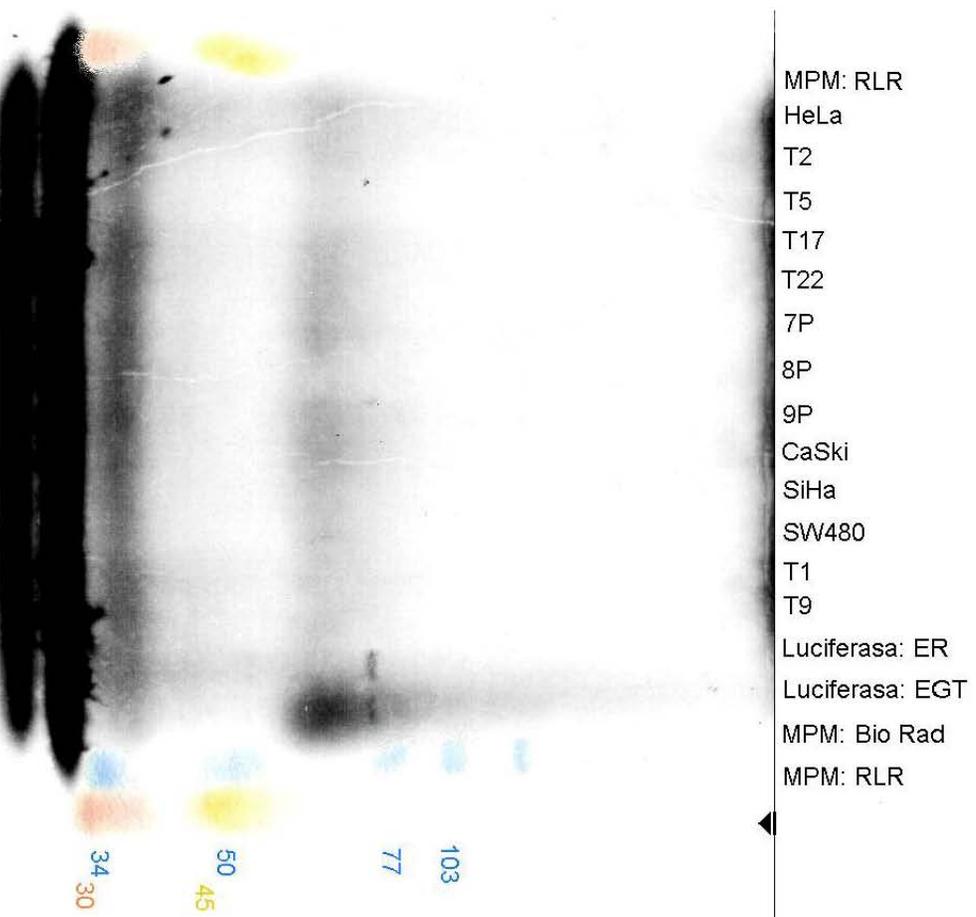


**Figura 41. Amplificación y purificación del exón 15 de APC de muestras tumorales y líneas celulares**

Las muestras aquí presentadas son representativas, éstas y otras fueron incluidas en el análisis por PTT.

Estos especímenes fueron sometidos a una reacción de transcripción/traducción acopladas *in vitro* y los péptidos generados fueron resueltos mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (Figura 42). Se empleó la línea celular SW480 como control positivo

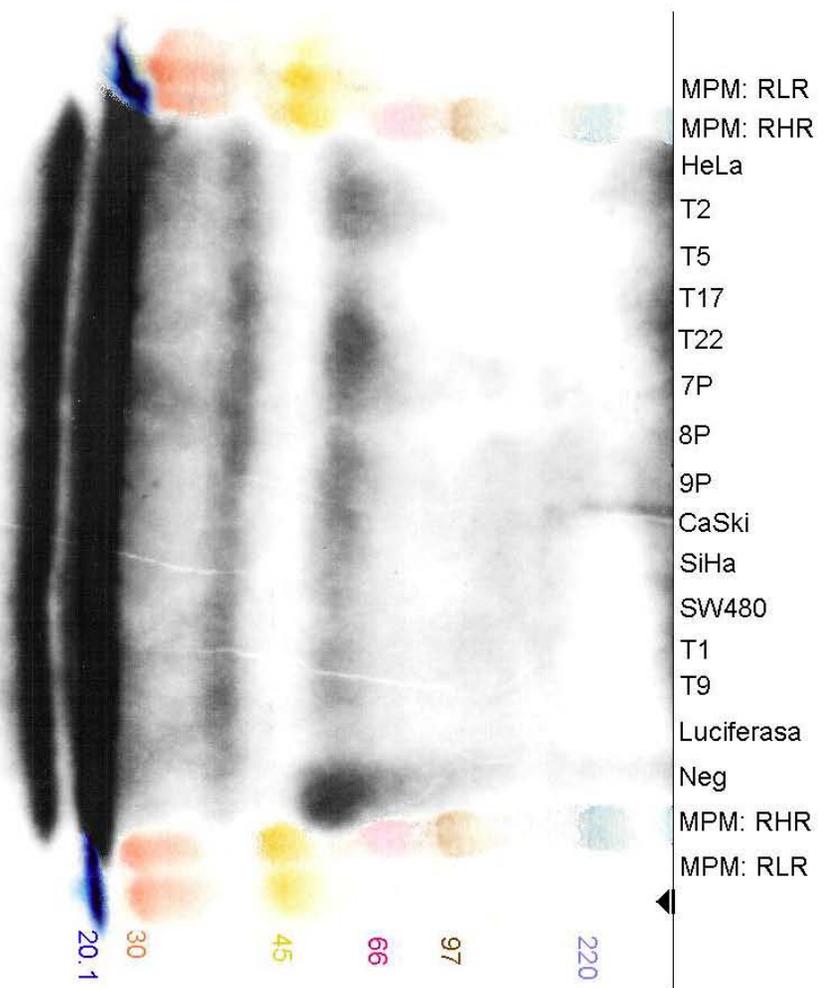
de mutación dado que se ha reportado que APC se encuentra truncado en esta línea (Ilyas et al., 1997).



**Figura 42. Prueba de Truncamiento de Proteínas (PTT) de APC en diferentes muestras**

MPM: Marcador de pesos moleculares. RLR: Rainbow Low Range. Como control se tradujo la proteína Luciferasa (61 kDa). ER: Extracto de Reticulocitos. EGT: Extracto de Germen de Trigo. Las reacciones fueron hechas con un kit preparado a base de extracto de reticulocitos, salvo el control de Luciferasa que así lo indica. El péptido no truncado pesa 67 kDa.

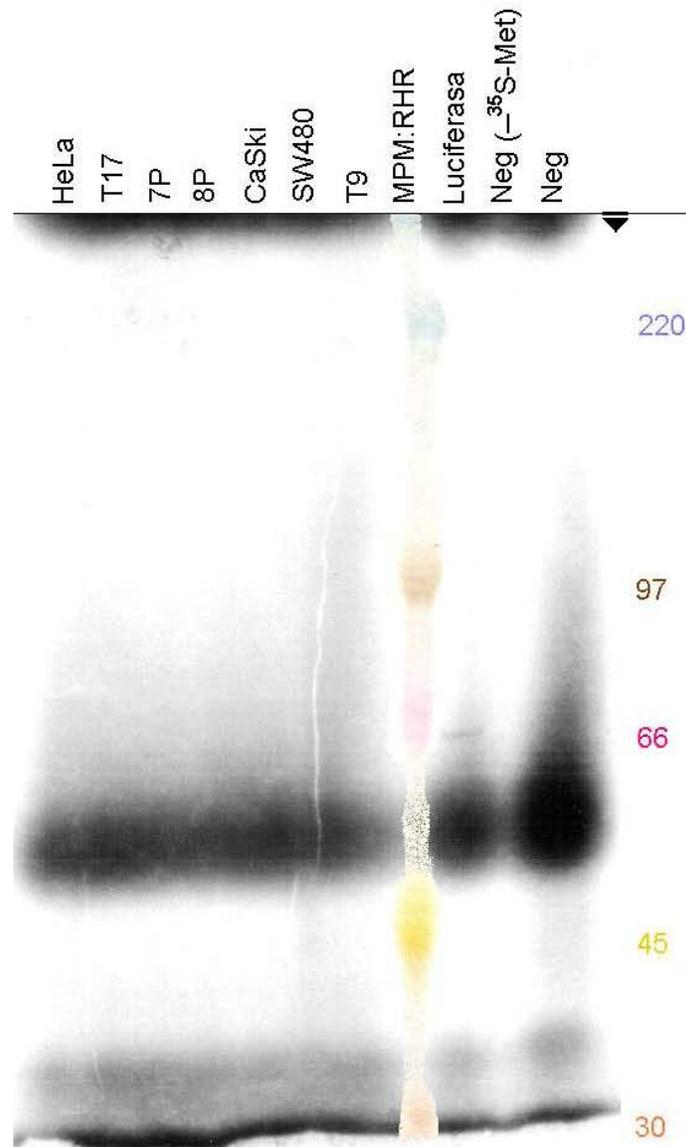
Se llevó a cabo una segunda reacción cuyo gel se expuso durante más tiempo (48 h) a fin de poner de manifiesto cualquier posible banda del péptido sintetizado (Figura 43).



**Figura 43. Prueba de Truncamiento de Proteínas (PTT) de APC de Diferentes muestras (2)**

MPM: Marcador de Pesos Moleculares. RLR: Rainbow Low Range. RHR: Rainbow High Range. Neg: Control negativo de traducción. Todas las reacciones fueron hechas con un kit preparado a base de extracto de reticulocitos.

Dado que también se tradujo la proteína luciferasa empleando el extracto de germen de trigo (Figura 42), se repitió el ensayo bajo las mismas condiciones pero sustituyendo el extracto de reticulocitos por el de germen de trigo (Figura 44).



**Figura 44. Prueba de Truncamiento de Proteínas (PTT) de APC de Diferentes muestras (3)**

MPM: Marcador de Pesos Moleculares. RHR: Rainbow High Range. Neg: Control negativo de traducción.

Neg( $^{-35}\text{S-Met}$ ): Control donde la metionina radiactiva fue sustituida por metionina no marcada. Todas las reacciones fueron hechas con un kit preparado a base de extracto de germen de trigo.

Aunque se logró detectar el producto de la transcripción y traducción del control de Luciferasa en dos de tres ensayos (con ambos kits), no fue posible detectar los productos de las muestras estudiadas a pesar de un mayor tiempo de exposición.



Mediante secuenciación directa del exón 6 (Figura 29) se demostró la ausencia de mutaciones en las líneas celulares C33A y SW480, por lo que éstas se emplearon como control negativo de mutación en el análisis por SSCP de dicho exón (Figura 30).

La proteína p53 está encargada de guardar la estabilidad genómica deteniendo el ciclo celular para permitir que se hagan reparaciones al DNA antes de su duplicación (Aranda-Anzaldo et al., 1999; Friend, 1994), por lo que la pérdida de su función puede resultar en una mayor tasa de daño al DNA (Anderson, 2001), siendo así responsable por la tumorigénesis a través de la acumulación de mutaciones oncogénicas (Cordón-Cardo, 1999). De hecho, está bien establecido que los blancos moleculares de las oncoproteínas virales suelen ser proteínas supresoras de tumores; tal es el caso de las proteínas E6 y E7 de los HPV de alto riesgo, que inactivan a p53 y pRb, respectivamente (Scheffner et al., 1991), y de las proteínas E1B y E1A de los adenovirus oncogénicos, con los mismos objetivos (S. Lee et al, 1997).

Se ha sugerido que son necesarias hasta siete alteraciones distintas para que una célula progrese desde un adenoma hasta un carcinoma y que la acumulación, más que la naturaleza y temporalidad específica de éstas, es lo verdaderamente relevante (Smith et al., 2002), en contraposición con la teoría que defiende su necesaria ocurrencia en un orden específico (Kinzler, 1996). En el cáncer colorrectal se han caracterizado como eventos importantes la inactivación de los supresores de tumores *p53* y *APC*. Se ha propuesto que las mutaciones en el primero son eventos más bien tardíos, y éstas pueden demostrarse en 70% a 80% de estos cánceres, mientras que las de *APC* se encuentran en aproximadamente 60% de los casos (Smith et al., 2002) y es frecuente su coexistencia (Polakis, 2001), sugiriendo que las cascadas de eventos relacionados con ambas alteraciones son importantes para la tumorigénesis del cáncer colorrectal. A partir de este modelo pueden establecerse algunas analogías con el cáncer cervicouterino. En éste, prácticamente la totalidad de los casos involucran la inactivación de p53 mediada por E6,

y por otro lado la deslocalización de  $\beta$ -catenina (posiblemente atribuible a mutaciones en APC), observada en aproximadamente 50% de los tumores estudiados en el laboratorio (Pereira-Suárez et al., 2002).

En la vía canónica de Wnt, para que  $\beta$ -catenina sea ubiquitinada y destruida, es necesaria la fosforilación de residuos específicos de serina y treonina localizados en el extremo amino terminal de ésta. El análisis realizado en los exones 3, 4 y 6 de  $\beta$ -catenina no reveló la presencia de mutaciones en este gen en las muestras tumorales y líneas celulares estudiadas (Figuras 35 a 39). Con base en estudios previos que reportan una frecuencia de mutaciones en  $\beta$ -catenina cercana a 25% en el cáncer colorrectal (Fearon, 1997), podría suponerse una cifra similar en el caso del cervicouterino. No obstante, los resultados obtenidos en este trabajo no apoyan tal suposición, aunque es necesario mencionar que debido al pequeño tamaño de la muestra estudiada no es posible extraer conclusiones firmes con respecto a la frecuencia de mutaciones en  $\beta$ -catenina en este tipo de cáncer. Adicionalmente, es necesario subrayar que la técnica de SSCP tiene la capacidad potencial para detectar 80 a 90% de los cambios en una sola base, por lo que sólo se emplea como metodología de monitorización (Nollau, 1997).

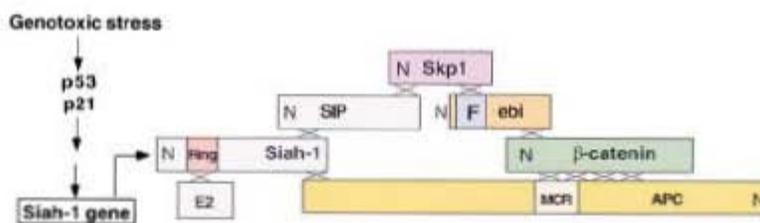
Aunque se han encontrado mutaciones en el exón 3 de  $\beta$ -catenina en tumores humanos de diferentes orígenes tisulares, al parecer a cada uno corresponde una tasa de mutación distinta (Polakis, 1999). En un estudio en especímenes malignos de melanoma se encontró que las mutaciones en el exón 3 de  $\beta$ -catenina son raras, a pesar de una frecuente localización nuclear y/o citoplasmática de ésta, con lo que los autores sugieren que podría deberse a la inactivación de APC, pero que dicha deslocalización no necesariamente proporciona evidencia definitiva de una desregulación constitutiva de la vía de Wnt (Rimm et al., 1999). De hecho, recientemente se realizó un análisis de APC en melanomas primarios y metastásicos, y se concluyó que las alteraciones en la expresión

de APC son importantes para la progresión de este tipo de cáncer (Korabiowska et al., 2004). De forma similar, las mutaciones en el exón 3 de *β-catenina* en muestras de carcinoma del endometrio del útero se presentan en una baja proporción de los casos (alrededor de 13%) pero se correlacionan fuertemente con un patrón citoplasmático y nuclear (Fukuchi, 1998).

En el caso del cáncer colorrectal las mutaciones en *β-catenina* son estrictamente exclusivas con las de APC (Polakis, 1999), y por extrapolación, el último es un blanco razonable para un análisis mutacional que explique la deslocalización de la primera. Se ha propuesto que la activación oncogénica de *β-catenina* se da mediante mutación directa de ésta, por inactivación de APC, o por activación de la vía de Wnt (Polakis, 1999), mecanismos todos que aumentan su  $t_{1/2}$  (se estima que pasa de 30 minutos, que es la normal, a más de 4.5 horas) (Rubinfeld et al., 1997) y condicionan su acumulación citoplasmática y nuclear, con la subsecuente transcripción incontrolada de los genes blanco de TCF (Korinek et al., 1997; Mann et al., 1999) que están involucrados en la transformación celular (Sadot et al., 1998).

No obstante lo anterior, se ha demostrado que existe un mecanismo alternativo de ubiquitinación de *β-catenina* dependiente de la proteína Siah-1, el producto de un gen de arresto del crecimiento que es inducido por p53. Esta ubiquitinación es independiente de la fosforilación del extremo amino terminal pero también requiere la presencia de APC intacto (Polakis, 2001) (Figura 45), por lo que, aunque esta vía de señalización establece un vínculo entre la degradación de *β-catenina* y la función de p53, no explica los resultados observados, ya que este sistema parece encargarse de la destrucción de las formas oncogénicas que escapan al reconocimiento por la vía tradicional de ubiquitinación dependiente de la fosforilación, y en los estudios por SSCP no se encontraron alteraciones que indiquen la presencia de mutaciones puntuales en el extremo amino

terminal de  $\beta$ -catenina en las muestras analizadas. Por otro lado, se sugiere que la vía canónica de Wnt tiene por sí misma la capacidad de prevenir la acumulación de  $\beta$ -catenina, pero que este segundo sistema dependiente de Siah-1 es necesario para detenerla completamente en caso de estrés genotóxico. Independientemente del papel que este sistema juegue en el balance intracelular de las reservas de  $\beta$ -catenina, esta vía alternativa también depende de la integridad de APC (Polakis, 2001).



**Figura 45. Vía alternativa de ubiquitinación de  $\beta$ -catenina mediada por Siah-1**

Aunque esta vía es dependiente de p53 (inactivado en cáncer cervicouterino) y de APC (cuya integridad no fue posible establecer), es alternativa a la de Wnt (es decir, independiente de la fosforilación por GSK-3 $\beta$ ) y en principio no explica la acumulación de  $\beta$ -catenina en función de la inactivación de p53.

(Tomada de Polakis, 2001).

Debido a la naturaleza variada de las mutaciones en *APC*, que se encuentran distribuidas con relativa homogeneidad a lo largo de una gran porción de este gen que contiene más de 8500 pares de bases de marco abierto de lectura (Powell et al., 1993), un análisis previo de éste mediante SSCP requirió de la amplificación de 38 fragmentos superpuestos, en virtud de que ésta técnica permite la identificación de cambios puntuales en fragmentos de hasta 400 pares de bases (Grodén y cols., 1991). Sin embargo, más de 98% de las mutaciones de *APC* conducen a la síntesis de una proteína truncada a través de cambios en el marco de lectura (68%) o mutaciones sin sentido (30%), y la mayoría (60 a 65%) de las mutaciones somáticas se concentran en la región central del gen conocida como MCR, localizada en el exón 15 (Bérout, 1996; van der Luijt et al., 1994).

El exón 15 de APC constituye la mayor parte del gen (~6500 pares de bases) y gracias a que la MCR se encuentra dentro de esta zona es posible realizar una amplificación de DNA genómico que la incluya en su totalidad. Diseñando oligonucleótidos que contengan el promotor del bacteriófago T7 se ha implementado la transcripción *in vitro* de este fragmento, con su subsecuente traducción (Powell et al., 1993; van der Luijt et al., 1994), haciendo posible detectar mutaciones truncantes. Se estima que la técnica de PTT empleada en este estudio (van der Luijt et al., 1994) permite detectar alrededor de 75% de las mutaciones somáticas. No obstante, tras repetidos intentos de optimización y a pesar de haber realizado la técnica de acuerdo con reportes previos y las instrucciones del proveedor, no fue posible obtener fragmentos proteicos adecuados para ser analizados.

La amplificación del fragmento de 2 kbps tiene de por sí un bajo rendimiento, muy probablemente debido a que el oligonucleótido sentido tiene incorporado el promotor de T7; dicho cebador consiste en un total de 65 bases, de las cuales sólo 26 (40%) son complementarias a la secuencia blanco de APC, y con base en las características de la reacción de amplificación, normalmente se obtienen fragmentos inespecíficos que deben ser retirados mediante purificación con QUIAEX antes de realizar la técnica de PTT, lo que disminuye aún más el rendimiento de la reacción, como puede apreciarse en la Figura 41B.

En el primer ensayo de PTT (Figura 42) se incluyeron dos controles positivos de transcripción/traducción (Luciferasa), el primero de ellos se hizo con un extracto de reticulocitos, al igual que las reacciones de las muestras, mientras que el segundo control se llevó a cabo con un extracto de germen de trigo. En ambos casos se obtuvo el producto deseado (61 kDa) indicando el correcto funcionamiento de ambos kits. A pesar de ello, no fue posible observar los productos de APC tras la reacción de PTT (67 kDa en ausencia de mutaciones), muy probablemente debido a la baja concentración de los fragmentos amplificados. Por lo tanto, se realizó una segunda reacción cuyo gel se dejó

exponer durante un mayor tiempo (Figura 43) con la finalidad de poner de manifiesto cualquier producto de PTT por pequeña que fuese su cantidad, aunque en este ensayo tampoco fue posible detectarlos. En virtud de estos resultados, se realizó un tercer ensayo empleando el kit fabricado a base de extracto de germen de trigo, y aunque aquí también se obtuvo el producto de la luciferasa, no se observaron aquellos correspondientes a las muestras estudiadas (Figura 44).

Debido al gran tamaño de *APC* no existen métodos de estudio que permitan un análisis rápido del mismo. Otras opciones para el análisis de *APC* incluyen: 1) SSCP de fragmentos superpuestos (Grodén et al., 1991). 2) Secuenciación directa de fragmentos superpuestos. 3) Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (Olschwang et al., 1997); 4) Análisis por PTT de todo el exón 15 con 5 fragmentos superpuestos (Powell et al., 1993). 5) Análisis por PTT de un fragmento del exón 15 que abarca la MCR (van der Luijt et al., 1994). De todos ellos, el que ofrece un mejor costo/confiabilidad es el último y por ello fue elegido como método de monitorización, ya que esta es una prueba desarrollada para detectar mutaciones que producen truncamiento (Roest et al., 1993), como es el caso de *APC*.

Las mutaciones que ocurren en *APC* son relevantes debido a que esta es una proteína que cubre una variedad de funciones. La mejor conocida es la regulación negativa de la vía de Wnt a través de la formación del complejo citosólico encargado de fosforilar a  $\beta$ -catenina. No obstante, se ha demostrado que *APC* contiene señales de exportación nuclear (NES) funcionales (Bienz, 2002) cuya actividad parece estar regulada por su grado de fosforilación (Zhang et al., 2000). Se ha demostrado que es necesario que *APC* salga del núcleo para reducir el nivel nuclear de  $\beta$ -catenina y la transcripción mediada por TCF, indicando que *APC* podría regular la actividad de la primera en dos pasos, primero contribuyendo con la exportación nuclear de la misma hacia el citoplasma, en donde en segundo término promueve su degradación mediada por el complejo citoplasmático

(Bienz, 2002). Estas señales se encuentran en posición 3' adyacentes a la MCR (Rosin-Arbesfeld et al., 2000) y por lo tanto son eliminadas en una significativa proporción de las proteínas truncadas (Figura 46) y aunque se ha demostrado la presencia de otras NES en el extremo amino terminal (Neufeld et al., 2000), parece que éstas no contribuyen importantemente con la función exportadora de la proteína mutante (Rosin-Arbesfeld et al., 2000). Dado que las mutaciones en la MCR no eliminan todos los sitios de unión a  $\beta$ -catenina (Figura 46), es posible que algunas de las formas truncadas de APC, incapaces de salir del núcleo, participen, a través de su retención, en la acumulación nuclear de  $\beta$ -catenina y por lo tanto con el aumento de la transcripción mediada por TCF.



**Figura 46. La proteína APC, la MCR, y las NES**

Las barras verdes representan el dominio de repeticiones Armadillo; las barras amarillas las repeticiones de 15 aminoácidos (motivos de unión de  $\beta$ -catenina); las barras rojas, motivos de unión a Axina; las barras azules, las repeticiones de 20 aminoácidos (motivos de unión a  $\beta$ -catenina, con sitios de fosforilación para GSK-3 $\beta$ ). Las flechas rojas indican señales de exportación nuclear (NES). Se señala la extensión de la MCR. (Tomado y modificado de Bienz, 2002).

En caso de haber mutaciones en la MCR de APC en las muestras analizadas, la acumulación nuclear y citoplasmática de  $\beta$ -catenina podría explicarse en términos de la incapacidad de la célula para degradarla y probablemente también para exportarla del núcleo celular.

Otra de las actividades aún no completamente entendidas de APC es una dinámica asociación con la membrana celular, principalmente en las uniones adherentes apicolaterales celulares, la que también es abrogada por los truncamientos y que parece desempeñar un importante papel en la unión celular durante el desarrollo normal ya que esto también causa el desprendimiento de  $\beta$ -catenina de la membrana y posiblemente un

aumento en las reservas citoplasmáticas de ésta (Bienz, 2002). De hecho, se ha demostrado que esta unión de APC a las uniones apicolaterales es crítica para la desestabilización de  $\beta$ -catenina, esto debido a que el complejo citoplasmático parece situarse justo por debajo de la membrana celular (Rosin-Arbesfeld et al., 2001).

Finalmente, también se ha demostrado que APC se une a las puntas distales de los microtúbulos en las protrusiones celulares de células en migración, indicando que probablemente afecte la función migratoria de las células, aunque es posible que también participe en la segregación cromosómica, o bien que contribuya con las duplicaciones centrosómicas dado que APC también se une a los centrómeros. Es decir, que APC podría desempeñar un papel indirecto en la conservación de la estabilidad cromosómica (Bienz, 2002), aunque esta función de orientación de los husos mitóticos más bien es necesaria para asegurar la división asimétrica de las células germinales, de forma que una de las células hijas permanezca en el nicho y la otra sea desplazada para iniciar la diferenciación (Yamashita et al., 2003). Se ha demostrado que la mitad amino terminal de APC es incapaz de localizarse en las puntas de los microtúbulos (Rosin-Arbesfeld et al., 2001).

El hecho de que APC posea tal versatilidad, con al menos cuatro destinos subcelulares y funciones distintas, puede explicar porqué es un supresor de tumores tan potente (Bienz, 2002), de hecho, esta suposición podría estar respaldada por el hecho de que las mutaciones en  *$\beta$ -catenina* se asocian con tumores menos agresivos que aquellos que se caracterizan por la pérdida de APC (Bienz, 2000).

Debido a que en el presente estudio no pudo realizarse el análisis del estado mutacional de APC, no es posible descartar la presencia de mutaciones terminadoras de la traducción. No obstante, es posible que la localización nuclear y/o citoplasmática de  $\beta$ -catenina que se observó en algunas de las muestras estudiadas, se deba a mecanismos que no involucren mutaciones en APC.

Se ha demostrado que los 72 residuos carboxilo terminales de APC tienen la capacidad de unirse al análogo humano del supresor de tumores de *Drosophila*, discs large (dlg; y hdlg en el caso del análogo humano) (Figura 22) (Kinzler, 1996). La región amino terminal de hdlg contiene tres copias del dominio PDZ/DHR, que es una secuencia repetida de 90 aminoácidos y el sitio de unión de APC (Polakis, 1997; Polakis, 1999). Las proteínas que contienen el dominio PDZ normalmente se localizan en sitios especializados de contacto celular en los epitelios y se piensa que participan en la transducción de señales ya que normalmente poseen dominios enzimáticos. De forma interesante, se ha observado que hdlg puede unirse a diferentes oncoproteínas virales que contienen el motivo de unión PDZ carboxiterminal, que es el caso de las proteínas E6 de los HPV de alto riesgo (16, 18, 30, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58), a diferencia de la codificada por aquellos de bajo riesgo, que no contienen este dominio PDZ (S. Lee et al., 1997). Se ha especulado que la interacción de E6 con hdlg podría impedir la unión de éste con APC (Kiyono et al., 1997) y es posible que los complejos hdlg:APC participen en el bloqueo de la progresión del ciclo celular en virtud de que hdlg transmite señales inhibitorias del crecimiento desde sitios de contacto célula-célula (S. Lee et al., 1997), donde también se ha observado que APC se localiza (Bienz, 2002).

No obstante, si el complejo hdlg:APC participa en el bloqueo de la progresión del ciclo celular mediante algún mecanismo que no involucre a  $\beta$ -catenina, la posible interrupción de esta interacción mediada por E6 no explica la localización citoplasmática y/o nuclear de aquélla.

En el año 2000 se publicó un estudio en el que demostró que la sobreexpresión de NE-dlg (dlg neuronal y endocrino) es capaz de regular a la baja la expresión de  $\beta$ -catenina en células SW480, las cuales producen APC truncado, carente del dominio de unión a hdlg. Estos resultados sugieren que NE-dlg podría controlar el crecimiento celular y la habilidad adhesiva a través de la regulación de los niveles de  $\beta$ -catenina en forma independiente de

APC. De hecho, se ha observado que NE-dlg no se expresa en las células proliferativas, indicando que probablemente es estabilizado en células no proliferativas, y que la presencia de los dominios PDZ son cruciales para su efecto supresor y para la reducción de los niveles de  $\beta$ -catenina, lo que ha llevado a sugerir que una inactivación genética o postranscripcional de NE-dlg podría jugar un papel en la génesis y progresión de los tumores malignos (Hanada et al., 2000). Es posible que la interacción de E6 con el dominio PDZ de hdlg sea funcionalmente equivalente a su inactivación postranscripcional, y podría explicar en parte la falta de desestabilización de  $\beta$ -catenina, reflejada en su acumulación citoplasmática y/o nuclear, aunque sería necesario llevar a cabo más experimentos a fin de corroborar esta posibilidad.

La proteína E6 de los HPVs de alto riesgo converge en  $\beta$ -catenina al menos en dos posibles vías: aquella en la que p53 induce la expresión de Siah-1, y ésta a su vez, la ubiquitinación de  $\beta$ -catenina independiente de GSK-3 $\beta$  pero dependiente de APC; y mediante la unión al dominio PDZ de hdlg, la cual, a través de mecanismos aún no comprendidos del todo, regula a la baja a  $\beta$ -catenina, de forma independiente de APC.

Cabe aún otra posibilidad que puede explicar la deslocalización de  $\beta$ -catenina. La pérdida de APC afecta la degradación de ésta al menos a través de dos vías, la dependiente de fosforilación por GSK-3 $\beta$  y la mediada por Siah-1. Aunque se ha demostrado la pérdida de heterocigocidad de *APC* en muchos tipos de cáncer, los cambios genéticos no son los únicos capaces de eliminar a un supresor de tumores del panorama tumorigénico. Hasta ahora, los cambios cualitativos en la secuencia han recibido la mayor atención porque son conservados en el DNA genómico de los tumores y por tanto han sido más fáciles de detectar. No obstante, existen cambios cuantitativos en la expresión genética que pueden ser heredables a través de la transmisión de patrones de metilación del DNA. Esta herencia de información con base en los niveles de expresión recibe el nombre de

epigenética. La metilación enzimática del carbono 5 de los residuos de citosina es un poderoso mecanismo para suprimir la actividad genética cuando ésta se da en las regiones promotoras, debido a que los grupos metilo de las islas CpG se orientan hacia el surco mayor del DNA y pueden interferir con la interacción entre la maquinaria transcripcional y el DNA, aunque esta represión también puede estar mediada por un proceso independiente de la secuencia que involucra cambios en la estructura de la cromatina y los niveles de acetilación de las histonas (Jones, 1999).

Numerosos estudios han sugerido aberraciones en la actividad de la DNA metiltransferasa en células tumorales y se ha observado que las células transformadas frecuentemente tienen una mayor actividad metiladora (en células tumorigénicas 4 a 3,000 veces superior a la de células no tumorigénicas), con más regiones de DNA hipermetilado, y con pérdida de la metilación en ciertas regiones normalmente metiladas (como ciertos oncogenes cuya expresión se ve acrecentada, como *k-ras*) (Singal, 1999).

Varios estudios han establecido firmemente que la metilación de los promotores de ciertos supresores de tumores puede considerarse un evento potencial dentro del modelo de los dos eventos de Knudson que contribuya con la pérdida de la heterocigocidad (Jones, 1999). De hecho, se ha observado que la región promotora de *APC* se encuentra significativamente más metilada en especímenes de carcinoma colorrectal que en la mucosa normal y en el adenoma, lo que sugiere que este podría ser un evento relativamente tardío en la progresión hacia la malignidad (Hiltunen et al., 1997). No obstante, un reporte reciente sugiere que, a pesar de que la metilación del promotor de *APC* es una alteración epigenética frecuente en las metástasis del cáncer colorrectal, no hay correlación entre ésta o las mutaciones en *APC* y la expresión de la proteína, sugiriendo que probablemente la metilación del promotor sea independiente de la expresión (Rocken et al., 2005). A pesar de estos resultados, en otro estudio se observó metilación del promotor de *APC* en 6 de 10 melanomas primarios y en 9 de 10 metástasis

linfáticas de melanoma donde no se detectó expresión de la proteína mediante inmunohistoquímica (Korabiowska et al., 2004).

Diferentes publicaciones han reportado que la hipermetilación de genes supresores de tumores es un evento frecuente en el cáncer cervical y mediante PCR cuantitativa específica para hipermetilación (QMSP) se encontró un coeficiente de correlación de Spearman de 0.80 para el promotor de *APC*, en relación con las muestras control, lo que fue estadísticamente significativo, sugiriendo que la técnica de QMSP (en *APC* y otros genes específicamente metilados en este tipo de cáncer) puede emplearse como herramienta diagnóstica para el cáncer cervical (Reesink-Peters et al., 2004). De hecho, en un estudio se encontró hipermetilación del promotor de *APC* en 60% de los casos de adenocarcinoma estudiados (aunque sólo en 13% de los carcinomas de células escamosas), mientras que no hubo metilación aberrante en tejido cervical normal, y se ha demostrado que la metilación de islas CpG en regiones promotoras de supresores de tumores se asocia con pérdida de expresión de la proteína (Dong et al., 2001).

También se ha encontrado que la exposición viral es un posible factor que produce cambios epigenéticos en el cáncer humano, y resultados experimentales sugieren que la infección por HPV 16 o 18 se correlaciona con una mayor expresión de distintos subtipos de DNA metiltransferasas (Lin et al., 2005), cuya cooperación es necesaria para mantener la metilación del DNA y el silenciamiento de genes supresores de tumores, evento que parece ser esencial para la óptima progresión neoplásica (Rhee et al., 2002).

Finalmente, no es posible descartar del todo que existan otras mutaciones en diferentes componentes de la vía de señalización Wnt que sean responsables por el incremento en la  $t_{1/2}$  de  $\beta$ -catenina. Por ejemplo, se han reportado mutaciones en Axina en carcinomas adenoides císticos (Daa et al., 2004), en carcinomas hepatocelulares (Clevers, 2000), y en algunos otros tejidos, aunque su frecuencia parece ser más bien baja.

Con base en los resultados obtenidos puede afirmarse con bastante seguridad que la deslocalización de  $\beta$ -catenina observada en nuestro laboratorio no se debe a mutaciones en la región regulatoria de ésta. No obstante, éste podría ser el caso en una baja proporción de estos tumores. De esta forma, pueden citarse al menos seis mecanismos que podrían ser responsables por la alteración en cuestión: 1) Mutaciones en el extremo amino terminal de  *$\beta$ -catenina*. 2) Disrupción de la degradación de  $\beta$ -catenina dependiente de Siah-1 (mediada por p53) y APC. 3) Mutaciones truncantes en la secuencia codificante de APC. 4) Alteración de los mecanismos de degradación de  $\beta$ -catenina dependientes de hdlg (mediados o no por APC), por interacción de E6 con ésta. 5) Hipermetilación del promotor de APC con la subsecuente inhibición de su expresión. 6) Mutaciones en otros componentes de la vía de señalización Wnt.

Existe evidencia experimental que permite suponer que alguno de los primeros cinco mecanismos propuestos podría subyacer a la acumulación de  $\beta$ -catenina en el cáncer cervicouterino. Cabe la posibilidad de que algunos de ellos coexistan y contribuyan de manera sinérgica, y en ocasiones independiente, con la deslocalización de este efector clave de Wnt. Tal podría ser el caso de la interacción de E6 con sus proteínas blanco.

Futuros experimentos permitirán aclarar el panorama y probablemente revelen la participación que  $\beta$ -catenina juega en el desarrollo y progresión del cáncer cervicouterino.

$\beta$ -catenina interactúa con toda una multitud de proteínas (cadherinas;  $\alpha$ -catenina; Axina; APC; los factores de transcripción de la familia TCF/LEF; la proteína asociada con el Alzheimer, presenilina; proteín fosfatasas; regulador de GTPasas, etc.) y es posible que su función no sólo esté relacionada con el crecimiento celular, sino que orqueste todo un programa para la transformación celular (Polakis, 1999). El descubrimiento de la vía alterna de degradación de  $\beta$ -catenina mediada por Siah-1 parece indicar que las células normales realizan un enorme esfuerzo para asegurar el estricto control de los niveles de

esta multifuncional proteína (Polakis, 2001). El hecho de que la proteína E6 de los HPVs de alto riesgo interfiera indirectamente con la degradación de la misma mediante dos mecanismos aparentemente independientes sugiere que el papel de  $\beta$ -catenina podría ser importante para la replicación viral.

## Conclusiones

---

“Yahvé se dirigió a Job desde la tormenta: [...]

¿Has entrado hasta las fuentes del mar?, ¿has paseado por el fondo del Abismo?

¿Te ha enseñado las puertas de la Muerte?, ¿has visto las puertas del país de las Sombras?

¿Tienes idea de las dimensiones de la tierra? Dilo, si todo lo sabes.”

LIBRO DE JOB 38, 1. 16-18

“Vivimos en un mundo de historias que empiezan y no acaban”

ITALO CALVINO (1923-1985).

Mediante el análisis por SSCP se confirmó que las muestras analizadas no contienen mutaciones en los exones 6 y 8 del supresor de tumores *p53*. Este mismo tipo de análisis no reveló mutaciones en los exones 3, 4 y 6 de *β-catenina* en dichos especímenes, lo que sugiere que la deslocalización de *β-catenina* observada en nuestro laboratorio no es consecuencia de mutaciones en la región regulatoria de ésta. No obstante, debido al pequeño tamaño de la muestra estudiada, no pueden establecerse conclusiones generales al respecto y cabe la posibilidad de que éste sea el caso en una baja proporción de los casos.

El análisis del exón de 15 de *APC*, hasta donde fue posible conducirlo, no permite afirmar o negar que haya mutaciones truncantes que expliquen la localización citoplasmática y nuclear de *β-catenina*.

Con base en los resultados obtenidos y diversas investigaciones reportadas en la bibliografía, puede concluirse la existencia de al menos seis mecanismos moleculares que

podrían ser responsables por la alteración en cuestión: 1) Mutaciones en el extremo amino terminal de *β-catenina*. 2) Disrupción de la degradación de *β-catenina* dependiente de Siah-1 (mediada por p53) y APC. 3) Mutaciones truncantes en la secuencia codificante de APC. 4) Alteración de los mecanismos de degradación de *β-catenina* dependientes de hdlg (mediados o no por APC), por interacción de E6 con ésta. 5) Hipermetilación del promotor de APC con la subsecuente inhibición de su expresión. 6) Mutaciones en otros componentes de la vía de señalización Wnt.

Existe evidencia experimental que permite suponer que alguno de los primeros cinco mecanismos propuestos podría subyacer a la acumulación citoplasmática y nuclear de *β-catenina* en el cáncer cervicouterino, e incluso cabe la posibilidad de que algunos de ellos coexistan y contribuyan de manera sinérgica, y en ocasiones independiente, con la deslocalización de este efector clave de Wnt.

Futuros experimentos permitirán aclarar el panorama y probablemente revelen la participación que juega *β-catenina* en el desarrollo y progresión del cáncer cervicouterino.

Debido a la multitud de proteínas con las que interactúa *β-catenina* (cadherinas; *α-catenina*; Axina; APC; los factores de transcripción de la familia TCF/LEF; la proteína asociada con el Alzheimer, presenilina; proteín fosfatasas; regulador de GTPasas, etc.) es posible que su función no sólo esté relacionada con el crecimiento celular, sino que orqueste todo un programa para la transformación celular. El descubrimiento de la vía alterna de degradación de *β-catenina* mediada por Siah-1 parece indicar que las células normales realizan un enorme esfuerzo para asegurar el estricto control de los niveles de esta multifuncional proteína. El hecho de que la proteína E6 de los HPVs de alto riesgo interfiera indirectamente con la degradación de la misma mediante dos mecanismos aparentemente independientes, sugiere que el papel de *β-catenina* podría ser importante para la replicación viral.

Por otro lado, el hecho de que tantas alteraciones converjan sobre los componentes de la vía de Wnt en diferentes tipos de cáncer, indica que la desregulación que resulta de dichos cambios genéticos y/o epigenéticos tiene una fuerte presión selectiva a favor en diversas etapas de la progresión hacia la malignidad y metástasis. La comprensión de las varias alteraciones que pueden presentarse y los mecanismos desencadenados, ayudará a tener un panorama más completo de la patogénesis molecular que subyace a esta importante enfermedad. De particular relevancia será dilucidar las interacciones que existen entre las oncoproteínas de los HPVs y las alteraciones observadas, en virtud de la alta prevalencia que el cáncer cervicouterino tiene en nuestro medio.

## Referencias

---

“[...] se me ocurrió leer por entretenimiento el ensayo de Malthus sobre la población [...] descubrí enseguida que bajo estas condiciones las variaciones favorables tenderían a preservarse, y las desfavorables a ser destruidas [...] Aquí había conseguido por fin una teoría sobre la que trabajar.”

CHARLES DARWIN. “AUTOBIOGRAFÍA”, 1876

“Cualquier ajedrecista al perfeccionar su habilidad transita el camino de las generaciones anteriores. Nuestros antepasados ajedrecistas no lo sabían, pero fueron aprendiendo con el método de pruebas y errores, y acumularon – para nuestro provecho – el ingenio ajedrecístico de sus tiempos en sus partidas y libros.”

GARRI KASPÁROV. “KASPÁROV ENSEÑA AJEDREZ”, 1986

1. Aitken, R. J., Krausz, C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction* 2001; 122: 497-506.
2. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D. *Molecular Biology of the Cell*. 3ª ed. Nueva York: Garland Publishing, Inc., 1994: Capítulo 24.
3. Anderson, G. R., Stoler, D. L., Brenner, B. M. Cancer: the evolved consequence of a destabilized genome. *BioEssays* 2001; 23: 1037-1046.
4. Aranda-Anzaldo, A., Orozco-Velasco, S., García-Villa, E., Gariglio, P. p53 is a rate-limiting factor in the repair of higher-order DNA structure. *Biochimica et Biophysica Acta* 1999; 1446: 181-192.
5. Baird, D. C. Experimentación. Una introducción a la teoría de mediciones y al diseño de experimentos. 2ª ed. Naucalpan de Juárez: Prentice-Hall Hispanoamericana, S. A., 1991: Capítulo 7.
6. Béroud, C., Soussi, T. APC gene: database of germline and somatic mutations in human tumors end cell lines. *Nucleic Acids Research* 1996; 24: 121-124.
7. Bianchini, A., Vainio, H. *Allium* vegetables and organosulfur compounds: do they help prevent cancer? *Environmental Health Perspectives* 2001; 109: 893-902.
8. Bienz, M. APC: the plot thickens. *Current Opinion in Genetics & Development* 1999; 9: 595-603.
9. Bienz, M. The subcellular destinations of APC proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2002; 3:328-338.
10. Bienz, M., Clevers, H. Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* 2000; 103: 311-320.
11. Blackburn, G. M., Gait, M. J. *Nucleic acids in chemistry and biology*. 2ª ed. Nueva York: Oxford University Press, 1996.
12. Bloom, M., Freyer, G., Micklos, D. *Laboratory DNA Science*. Menlo Park: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., 1996.
13. Borek, C. Antioxidants and Cancer. *Science & Medicine* 1997; Nov/Dec: 52-61.
14. Bykov, V. J. N., Issaeva, N., Shilov, A., Hultcrantz, M., Pugacheva, E., Chumakov, P., Bergman, J., Wiman, K. G., Selivanova, G. Restoration of the tumor suppressor function to mutant p53 by a low-molecular-weight compound. *Nature Medicine* 2002; 8: 282-288.

15. Chen, J., Rocken, C., Lofton-Day, C., Schultz, H. U., Muller, O., Kutzner, N., Malfertheiner, P., Ebert, M. P. Molecular analysis of APC promoter methylation and protein expression in colorectal cancer metastasis. *Carcinogenesis* 2005; 26: 37-43.
16. Cho, Y., Gorina, S., Jeffrey, P. D., Pavletich, N. K. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* 1994; 265: 346-355.
17. Clevers, H. Axin and hepatocellular carcinomas. *Nature Genetics* 2000; 24: 206-208.
18. Cordon-Cardo, C., Prives, C. At the crossroads of Inflammation and tumorigenesis. *J. Exp. Med.* 1999; 190: 1367-1370.
19. Corn, P. G., El-Deiry, W. S. Derangement of growth and differentiation control in oncogenesis. *BioEssays* 2002; 24: 83-90.
20. Daa, T., Kashima, K., Kaku, N., Suzuki, M., Yokoyama, S. Mutations in components of the Wnt signaling pathway in adenoid cystic carcinoma. *Modern Pathology* 2004; 17: 1475-1482.
21. Dale, T. Signal transduction by the Wnt family of ligands. *Biochem J* 1998; 329: 209-223.
22. Davis, R. H., Weller, S. G. *The Gist of Genetics*. Sudbury: Jones and Barlett Publishers, 1998: Capitulo 6.
23. DePinho, R. A. The age of cancer. *Nature* 2000; 408: 248-254.
24. Doll, R., Peto, R., The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *Journal of the National Cancer Institute* 1981; 66: 1192-1308.
25. Donehower, L. A., Bradley, A. The tumor suppressor p53. *Biochimica et Biophysica Acta* 1993; 1155: 181-205.
26. Dong, S. M., Kim, H.-S., Rha, S.-H., Sidransky, D. Promoter Hypermethylation of Multiple Genes in Carcinoma of the Uterine Cervix. *Clinical Cancer Research* 2001; 7: 1982-1986.
27. Duke, R. C., Ojcius, D. M., Young, J. D.-E. Cell Suicide in Health and Disease. *Scientific American* 1996; Dec: 80-87.
28. Editorial board. Twelve major cancers. *Scientific American* 1996; September: 126-132.
29. Eklof, K., Polakis, P., Weis, W. Structural basis of the axin-adenomatous polyposis coli interaction. *EMBO J* 2000; 19: 2270-2279.
30. Fearon, E. R. Human cancer syndromes: clues to the origin and nature of cancer. *Science* 1997; 278: 1043-1050.
31. Folkman, J. Fighting cancer by attacking its blood supply. *Scientific American* 1996; September: 150-154.
32. Franco, E. L., Rohan, T. E., Villa, L. L. Epidemiologic evidence and human papillomavirus infection as a necessary cause of cervical cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 1999; 91: 506-511.
33. Fraumeni, J. F., Jr, Lloyd, J. W., Smith, E. M., Wagoner, J. K. Cancer mortality among nuns: Role of marital status in etiology of neoplastic disease in women. *J Natl Cancer Inst* 1969; 42: 455-468.
34. Friend, S. p53: A glimpse at the puppet behind the shadow play. *Science* 1994; 265: 334-335.
35. Fukuchi, T., Sakamoto, M., Tsuda, H., Maruyama, K., Nozawa, S., Hirohashi, S.  $\beta$ -catenin mutation in carcinoma of the uterine endometrium. *Cancer Res* 1998; 58: 3526-3528.
36. Futreal, P. A., Kasprzyk, A., Mullikin, J. C., Wooster, R., Stratton, M. R. Cancer and genomics. *Nature* 2001; 409: 850-852.
37. Gaidano, G., Ballerini, P., Gong, J. Z., Inghirami, G., Neri, A., Newcomb, E. W., Magrath, I. T., Knowles, D. M., Dalla-Favera, R. p53 mutations in human lymphoid malignancies: Association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *PNAS* 1991; 88: 5413-5417.
38. Giardiello, F. M., Bresinger, J. D., Petersen, G. M., Luce, M. C., Hylind, L. M., Bacon, J. A., Booker, S. V., Parker, R. D., Hamilton, S. R. The Use and Interpretation of Commercial APC Gene Testing for Familial Adenomatous Polyposis. *N Engl J Med* 1997; 336: 823-827.
39. Goldfarb, M., Shimizu, K., Perucho, M., Wigler, M. Isolation and preliminary characterization of a human transforming gene from T24 bladder carcinoma cells. *Nature* 1982; 296: 404-409.
40. Groden, J., Thlivers, A., Samowitz, W., et al. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* 1991; 66: 589-600.
41. Haber, D., Harlow, E. Tumor-suppressor genes: evolving definitions in the genomic age. *Nature Genetics* 1997; 16: 320-322.

42. Hanada, N., Makino, K., Koga, H., Morisaki, T., Kuwahara, H., Masuko, N., Tabira, Y., Hiraoka, T., Kitamura, N., Kikuchi, A., Saya, H. NE-dlg, a mammalian homolog of *Drosophila* dlg tumor suppressor, induces growth suppression and impairment of cell adhesion: possible involvement of down-regulation of  $\beta$ -catenin by NE-dlg expression. *Int J Cancer* 2000; 86: 480-488.
43. Harris, C. C. p53: At the crossroads of molecular carcinogenesis and risk assessment. *Science* 1993; 262: 1980-1981.
44. Hartl, D. L. *Essential Genetics*. Sudbury: Jones and Bartlett Publishers, Inc., 1996: 346.
45. He, T., Sparks, A., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L., Morin, P., Vogelstein, B., Kinzler, K. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 1998; 281: 1509-1512.
46. Helmbrecht, K., Kispert, A., van Wasielewski, R., Brabant, G. Identification of a Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in human thyroid cells. *Endocrinology*, 2001; 142: 5261-5266.
47. Hemminki, K., Mutanen, P. Genetic epidemiology of multistage carcinogenesis. *Mutation Research* 2001; 473: 11-21.
48. Henderson, B. R. Nuclear-cytoplasmic shuttling of APC regulates  $\beta$ -catenin subcellular localization and turnover. *Nature cell biology* 2000; 2: 653-660.
49. Henderson, M. A., Danks, J. A., Moseley, J. M., Slavin, J. L., Harris, T. L., McKinlay, M. R., Hopper, J. L., Martin, T. J. Parathyroid hormone-related protein production by breast cancers, improved survival, and reduced bone metastases. *Journal of the National Cancer Institute* 2001; 93: 234-237.
50. Hildesheim, A., Schiffman, M. H., Gravitt, P. E., Glass, A. G., Greer, C. E., Zhang, T., Scott, D. R., Rush, B. B., Lawler, P., Sherman, M. E., Kurman, R. J., Manos, M. M. Persistence of type-specific human papilloma virus infection among cytologically normal women. *The Journal of Infectious Diseases* 1994; 169: 235-240.
51. Hiltunen, M. O., Alhonen, L., Koistinaho, J., Myöhänen, S., Pääkkönen, M., Marin, S., Kosma, V. M., Jänne, J. Hypermethylation of the APC (adenomatous polyposis coli) gene promoter region in human colorectal carcinoma. *Int J Cancer* 1997; 70: 644-648.
52. Hinck, L., Nelson, W. J., Papkoff, J. Wnt-1 modulates cell-cell adhesion in mammalian cells by stabilizing  $\beta$ -catenin binding to the cell adhesion protein cadherin. *The Journal of Cell Biology* 1994; 124: 729-741.
53. Ho, G. Y. F., Bierman, R., Beardsley, L., Chang, C. J., Burk, R. D. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *The New England Journal of Medicine* 1998; 338: 423-428.
54. Ho, G. Y. F., Burk, R. D., Klein, S., Kadish, A. S., Chang, C. J., Palan, P., Basu, J., Tachezy, R., Lewis, R., Romney, S. Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. *Journal of the National Cancer Institute* 1995; 87: 1365-1371.
55. Howley, P.M., Lowy, D. R. *Fields Virology*. 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001: Vol. 2: Capítulo 65.
56. Huber, A. H., Nelson, W. J., Weis, W. I. Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of  $\beta$ -catenin. *Cell* 1997; 90: 871-882.
57. Huelsken, J., Birchmeier, W. New aspects of Wnt signaling pathways in higher vertebrates. *Current Opinion in Genetics & Development* 2001; 11: 547-553.
58. Hülsken, J., Birchmeier, W., Behrens, J. E-cadherin and APC compete for the interaction with  $\beta$ -catenin and the cytoskeleton. *J Cell Biol* 1994; 127: 2061-2069.
59. Ikeda, S., Kishida, M., Matsuura, Y., Usui, H., Kikuchi, A. GSK-3 $\beta$ -dependent phosphorylation of adenomatous polyposis coli gene product can be modulated by  $\beta$ -catenin and protein phosphatase 2A complexed with Axin. *Oncogene* 2000; 19: 537-545.
60. Ikeda, T., Yoshinaga, K., Semba, S., Kondo, E., Ohmori, H., Horii, A. Mutational analysis of the CTNNB1 (beta-catenin) gene in human endometrial cancer: frequent mutations at codon 34 that cause nuclear accumulation. *Oncol Rep* 2000; 7: 323-326.
61. Ilyas, M., Tomlinson, I., Rowan, A., Pignatelli, M., Bodmer, W.  $\beta$ -catenin mutations in cell lines established from human colorectal cancers. *PNAS* 1997; 94: 10330-10334.
62. Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J., White, T. *PCR protocols. A Guide to methods and applications*.

- San Diego: Academic Press, Inc., 1990: Capítulos 1 y 2.
63. Jones, P. A., Laird, P. W. Cancer epigenetics comes of age. *Nature genetics* 1999; 21: 163-167.
  64. Kessis, T. D., Slebos, R. J., Nelson, W. G., Kastan, M. B., Plunkett, B. S., Han, S. M., Lorincz, A. T., Hodrick, L., Cho, K. L. Human papillomavirus 16 E6 expression disrupts the p53-mediated cellular response to DNA damage. *PNAS* 1993; 90: 3988-3992.
  65. Kinzler, K. W., Vogelstein, B. Gatekeepers and caretakers. *Nature* 1997; 386: 761-762.
  66. Kinzler, K. W., Vogelstein, B. Lessons from Hereditary Colorectal Cancer. *Cell* 1996; 87: 159-170.
  67. Kiyono, T., Hiraiwa, A., Fujita, M., Hayashi, Y., Akiyama, T., Ishibashi, M. Binding of high-risk human papillomavirus E6 oncoproteins to the human homologue of the *Drosophila* discs large tumor suppressor protein. *PNAS* 1997; 94: 11612-11616.
  68. Korabiowska, M., Schlott, T., Siems, N., Müller, A., Cordon-Cardo, C., Fischer, C., Brinck, U. Analysis of Adenomatous polyposis coli gene expression, APC locus-micosatellite instability and APC promoter methylation in the progression of melanocytic tumours. *Modern Pathology* 2004; 17: 1539-1544.
  69. Korinek, V., Barker, N., Morin, P., et al. Constitutive Transcriptional Activation by a  $\beta$ -catenin-Tcf Complex in APC<sup>-/-</sup> Colon Carcinoma. *Science* 1997; 275: 1784-1787.
  70. Kuebritz, S. J., Plunkett, B. S., Walsh, W. V., Kastan, M. B. Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *PNAS* 1992; 89: 7491-7495.
  71. Lamlum, H., Papadopoulou, A., Ilyas, M., Rowan, A., Gillet, C., Hanby, A., Talbot, I., Bodmer, W., Tomlinson, I. APC mutations are sufficient for the growth of early colorectal adenomas. *PNAS* 2000; 97: 2225-2228.
  72. Land, H., Parada, L. F., Weinberg, R. A. Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* 1983; 304: 596-602.
  73. Leffell, D. J., Brash, D. E. Sunlight and skin cancer. *Scientific American* 1996; July: 52-59.
  74. Lengauer, C. How do tumors make ends meet?. *PNAS* 2001; 98: 12331-12333.
  75. Liaw, K. L., Glass, A. G., Manos, M. M., Greer, C. E., Scott, D. R., Sherman, M., Burk, R. D., Kurman, R. J., Wacholder, S., Rush, B. B., Cadell, D. M., Lawler, P., Tabor, D., Schiffman, M. Detection of human papillomavirus DNA in cytologically normal women and subsequent cervical squamous intraepithelial lesions. *Journal of the National Cancer Institute* 1999; 91: 954-960.
  76. Lin, T.-S., Lee, H., Chen, R.-A., Ho, M.-L., Lin, C.-Y., Chen, Y.-H., Tsai, Y. Y., Chou, M.-C., Cheng, Y.-W. An association of DNMT3b protein expression with P16INK4a promoter hypermethylation in non-smoking female lung cancer with human papillomavirus infection. *Cancer Letters* 2005; 226: 77-84.
  77. Liotta, L. A. Cancer cell invasion and metastasis. *Scientific American* 1992; February: 34-41.
  78. Lisovsky, M., Itoh, K., Sokol, S. Y. Frizzled receptors activate a novel JNK-dependent pathway that may lead to apoptosis. *Current Biology* 2002; 12: 53-58.
  79. Liu, T., DeConstanzo, A. J., Liu, X., Wang, H., Hallagan, H., Moon, R. T., Malbon, C.C. G protein signaling from activated rat frizzled-1 to the  $\beta$ -catenin-Lef-Tcf pathway. *Science* 2001; 292: 1718-1722.
  80. Lowy, D. R., Howley, P. M. *Fields Virology*. 4<sup>a</sup> ed. Filadelfia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001: Vol. 2: Capítulo 66.
  81. Mann, B., Gelos, M., Siedow, A., Hanski, M. L., Gratchev, A., Ilyas, M., Bodmer, W. F., Moyer, M. P., Riecken, E. O., Buhr, H. J., Hanski, C. Target genes of  $\beta$ -catenin-T cell factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *PNAS* 1999; 96: 1603-1608.
  82. Moore, M. A. S. The role of chemoattraction in cancer metastases. *BioEssays* 2001; 23: 674-676.
  83. Morin, P. J.  $\beta$ -catenin signaling and cancer. *BioEssays* 1999; 21: 1021-1030.
  84. Morin, P. J., Sparks, A. B., Korinek, V., Barker, N., Clevers, H., Vogelstein, B., Kinzler, K. W. Activation of  $\beta$ -catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in  $\beta$ -catenin or APC. *Science* 1997; 275:1787-1790.

85. Navarrete, M., Cabrera, L. Introducción al estudio de los radioisótopos. 2ª ed. México, D. F.: Facultad de Química, UNAM, 1993.
86. Neufeld, K. L., Nix, D. A., Bogerd, H., Kang, Y., Beckerle, M. C., Cullen B. R., White, R. L. Adenomatous polyposis coli protein contains two export signals and shuttles between the nucleus and cytoplasm. PNAS 2000; 97: 12085-12090.
87. Nishimura, N., Yu, G., Levesque, G., et al. Presenilin mutations associated with Alzheimer disease cause defective intracellular trafficking of  $\beta$ -catenin, a component of the presenilin protein complex. Nature Medicine 1999; 5: 164-169.
88. Nollau, P., Wagener, C. Methods for detection of point mutations: performance and quality assessment. Clinical Chemistry 1997; 43: 1114-1128.
89. Olschwang, S., Hamelin, R., Laurent-Puig, P., Thuille, B., De Rycke, Y., Li, Y. J., Muzeau, F., Girodet, J., Salmon, R. J., Thomas, G. Alternative genetic pathways in colorectal carcinogenesis. PNAS 1997; 94: 12122-12127.
90. Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., Sekiya, T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. PNAS 1989; 86: 2766-2770.
91. Pawlak, G., Helfman, D. M., Cytoskeletal changes in cell transformation and tumorigenesis. Current Opinion in Genetics & Development 2001; 11: 41-47.
92. Peifer, M., Berg, S., Reynolds, A. B. A repeating Amino Acid Motif Shared by Proteins with Diverse Cellular Roles. Cell 1994; 76: 789-791.
93. Perira-Suárez, A. L., Meraz, M. A., Lizano, M., Estrada-Chávez, C., Hernández, F., Olivera, P., Pérez, E., Padilla, P., Yaniv, M., Thierry, F., García-Carrancá, A. Frequent Alterations of the  $\beta$ -catenin gene Protein in Cancer of the Uterine Cervix. Tumor Biology 2002; 23: 45-53.
94. Peto, J. Cancer epidemiology in the last century and the next decade. Nature 2001; 411: 390-395.
95. Pleasure, S. J. An arrow hits the Wnt signaling pathway. Trends in Neurosciences 2001; 24: 69-70.
96. Polakis, P. More than one way to skin a catenin. Cell 2001; 105: 563-566.
97. Polakis, P. The adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor. Biochimica et Biophysica Acta 1997; 1332: F127-F147.
98. Polakis, P. The oncogenic activation of  $\beta$ -catenin. Current Opinion in Genetics & Development. 1999; 9:15-21.
99. Ponder, B. A. J. Cancer Genetics. Nature 2001; 411: 336-341.
100. Porfiri, E., Rubinfeld, E., Albert, I., Hovanes, K., Waterman, M., Polakis, P. Induction of a  $\beta$ -catenin-LEF-1 complex by wnt-1 and transforming mutants of  $\beta$ -catenin. Oncogene 1997; 15: 2833-2839.
101. Powell, S. M., Petersen, G. M., Krush, A. J., Booker, S., Jen, J., Giardiello, F. M., Hamilton, S. R., Vogelstein, B., Kinzler, K. W. Molecular Diagnosis of Familial Adenomatous Polyposis. N Engl J Med 1993; 329:1982-1987.
102. Prives, C., Manfredi, J. The p53 tumor suppressor protein: meeting review. Genes & Development 1993; 7: 529-534.
103. Rawn, J. D. Bioquímica. Madrid: Interamericana-McGraw-Hill, 1989: Vol. 2: Capítulo 26.
104. Reesink-Peters, N., Wisman, G. B. A., Jerónimo, C., Tokumaru, C. Y., Cohen, Y., Dong, S. M., Klip, H. G., Buikema, H. J., Suurmeijer, A. J. H., Hollema, H., Boezen, H. M., Sidransky, D., van der Zee, A. G. J. Detecting cervical cancer by quantitative promoter hypermethylation assay on cervical scrapings: a feasibility study. Molecular Cancer Research 2004; 2: 289-295.
105. Rennie, J., Rusting, R. Making headway against cancer. Scientific American 1996; September: 56-59.
106. Rhee, I., Bachman, K. E., Park, B. H., Jair, K. W., Chiu Yen, R.-W., Schuebel, K. E., Cui, H., Feinberg, A. P., Lengauer, C., Kinzler, K. W., Baylin, S. B., Vogelstein, B. DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. Nature 2002; 416: 552-556.
107. Rice-Evans, C., Burdon, R. Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. Prog Lipid Res 1993; 32: 71-110.
108. Ridley, M. Genoma, la autobiografía de una especie en 23 capítulos. México, D. F.: Ed. Taurus, 2001: Capítulo 17.
109. Rimm, D. L., Caca, K., Hu, G., Harrison, F. B., Fearon, E. R. Frequent nuclear/cytoplasmic

- localization of  $\beta$ -catenin without exon 3 mutations in malignant carcinoma. *American Journal of Pathology* 1999; 154: 325-329.
110. Ritter, P. *Biochemistry, a foundation*. Pacific Grove: Brookes/Cole Publishing Company, 1996: 715.
  111. Roest, P. A., Roberts, R. G., Sugino, S., van Ommen, G. J., den Dunnen. J. T. Protein truncation test (PTT) for rapid detection of translation-terminating mutations. *Human Molecular Genetics* 1993; 2: 1719-1721.
  112. Rosin-Arbersfeld, R., Townsley, F., Bienz, M. The APC tumor suppressor has a nuclear export function. *Nature* 2000; 406: 1009-1012.
  113. Rosin-Arbersfeld, R., Ihrke, G., Bienz, M. Actin-dependent membrane association of the APC tumor suppressor in polarized mammalian epithelial cells. *The EMBO Journal* 2001; 21: 5929-5939.
  114. Rubinfeld, B., Robbins, P., El-Gamil, M., Albert, I., Porfiri, E., Polakis, P. Stabilization of  $\beta$ -catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science* 1997; 275: 1790-1792.
  115. Ruoslahti, E. *How Cancer Spreads*. Scientific American 1996; September: 72-77.
  116. S. Lee, S., Weiss, R. S., Javier, R. T. Binding of human virus oncoproteins to hDlg/SAP97, a mammalian homolog of the *Drosophila* discs large tumor suppressor protein. *PNAS* 1997; 94: 6670-6675.
  117. Sadot, E., Simcha, I., Shtutman, M., Ben-Ze'ev, A., Geiger, B. Inhibition of  $\beta$ -catenin-mediated transactivation by cadherin derivatives. *PNAS* 1998; 95: 15339-15344.
  118. Sagan, C. *Billions & Billions*. Nueva York: Ballantine Books, 1998: 17.
  119. Salvemini, D., Botting, R. Modulation of platelet function by free radicals and free-radical scavengers. *TIPS* 1994; 14: 36-41.
  120. Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. 2<sup>a</sup> ed. Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
  121. Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS* 1977; 74: 5463-5467.
  122. Sasaki, Y., Morimoto, I., Kusano, M., Hosokawa, M., Itoh, F., Yanagihara, K., Imai, K., Tokino, T. Mutational analysis of the beta-catenin gene in gastric carcinomas. *Tumor Biol* 2001; 22: 123-130.
  123. Satoh, S., Daigo, Y., Furukawa, Y., Kato, T., Miwa, N., Nishiwaki, T., Kawasoe, T., Ishiguro, H., Fujita, M., Tokino, T., Sasaki, Y., Imaoka, S., Murata, M., Shimano, T., Yamaoka, Y., Nakamura, Y. AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1. *Nature Genetics* 2000; 24: 245-250.
  124. Scheffner, M., Münger, K., Byrne, J. C., Howley, P. M. The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *PNAS* 1991; 5523-5527.
  125. Schlecht, N. F., Kulaga, S., Robitaille, J., Ferreira, S., Santos, M., Miyamura, R. A., Duarte-Franco, E., Rohan, T., Ferenczy, A., Villa, L. L., Franco, E. L. Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. *JAMA* 2001; 286: 3106-3114.
  126. Schlosshauer, P. W., Brown, S. A., Eisinger, K., Yan, Q., Guglielminetti, E. R., Parsons, R., Ellenson, L. H., Kitajewski, J. APC truncation and increased  $\beta$ -catenin levels in a human breast cancer cell line. *Carcinogenesis* 2000; 21: 1453-1456.
  127. Seidensticker, M. J., Behrens, J. Biochemical Interactions in the wnt pathway. *Biochimia et Biophysica Acta* 2000; 1495: 168-182.
  128. Shapiro, L.  $\beta$ -catenin and its multiple partners: promiscuity explained. *Nature Structural Biology* 2001; 8: 484-487.
  129. Singal, R., Ginder, G. D. DNA methylation. *Blood* 1999; 93: 4059-4070.
  130. Sinn, E., Muller, W., Pattengale, P., Tepler, I., Wallace, R., Leder, P. Coexpression of MMTV/*v-Ha-ras* and MMTV/*c-myc* genes in transgenic mice: synergistic action of oncogenes in vivo. *Cell* 1987; 49: 465-475.
  131. Smith, G., Carey, F. A., Beattie, J., Wilkie, M., Lightfoot, T. J., Coxhead, J., Garner, R. C., Steele, R., Wolf, C. R. Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53 – alternative genetic pathways to colorectal cancer. *PNAS* 2002; 99: 9433-9438.
  132. Soberón, F. X. *La ingeniería genética y la nueva biotecnología*. México, D. F.: Fondo de Cultura económica, 1996: 81, 82.
  133. Solakoglu, O., Maierhofer, C., Lahr, G., Breit, E., Scheunemann, P., Heumos, I., Piclmeier, U., Schlimok, G., Oberneder, R., Köllermann, M. W.,

- Köllermann, J., Speicher, M. R., Pantel, K. Heterogeneous proliferative potential of occult metastatic cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumors. *PNAS* 2002; 99: 2246-2251.
134. Sparks, A. B., Morin, P. J., Vogelstein, V., Kinzler, K. W. Mutational analysis of the APC/ $\beta$ -catenin/Tcf Pathway in Colorectal Cancer. *Cancer Research* 1998; 58: 1130-1134.
135. Strathdee, C. A., Gavish, H., Shannon, W. R., Buchwald, M. Cloning of cDNAs for Fanconi's anaemia by functional complementation. *Nature* 1992; 356: 763-767.
136. Taipale, J., Beachy, P. A. The Hedgehog and Wnt signaling pathways in cancer. *Nature* 2001; 411: 349-354.
137. Takahashi, M., Nakatsugi, S., Sugimura, T., Wakabayashi, K. Frequent mutations of the  $\beta$ -catenin gene in mouse colon tumors induced by azoxymethane. *Carcinogenesis* 2000; 21: 1117-1120.
138. Tanaka, Y., Kato, K., Notohara, K., Hojo, H., Ijiri, R., Miyake, T., Nagahara, N., Sasaki, F., Kitagawa, N., Nakatani, Y., Kobayashi, Y. Frequent  $\beta$ -Catenin Mutation and Cytoplasmic/Nuclear Accumulation in Pancreatic Soli-Pseudopapillary Neoplasm. *Cancer Research* 2001; 61: 8401-8404.
139. Thompson, B., Townsley, F., Rosin-Abersfeld, R., Musisi, H., Bienz, M. A new nuclear component of the Wnt signaling pathway. *Nature cell biology* 2002; 4: 367-373.
140. Toledo Cuevas, E. M. Detección de Mutaciones Puntuales en los Genes RAS y p53, en Líneas Celulares Derivadas de Cáncer Humano. Tesis de Maestría. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Agosto, 1994.
141. Trichopoulos, D., Li, F. P., Hunter, D. J. What causes cancer? *Scientific American* 1996; September: 80-87.
142. van der Luijt, R., Khan, M., Vasen, H., van Leeuwen, C., Tops, C., Roest, P., den Dunnen, J., Foie, R. Rapid detection of translation-terminating mutations at the adenomatous polyposis coli (APC) gene by direct protein truncation test. *Genomics* 1994; 20: 1-4.
143. Villa, L. L., Sichero, L., Rahal, P., Cabalero, O., Ferenczy, A., Rohan, T., Franco, E. L. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *Journal of General Virology* 2000; 81: 2959-2968.
144. Wallin, K., L., Wiklund, F., Ångström, T., Bergman, F., Stendhal, U., Wadell, G., Hallmans, G., Dillner, J. Type-specific persistence of human papillomavirus DNA before the development of invasive cervical cancer. *The New England Journal of Medicine* 1999; 341: 1633-1638.
145. Watson, J. D., Crick, F. H. C. Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature* 1953; 171: 964-967.
146. Watson, J. D., Crick, F. H. C. Molecular structure of nucleic acids. *Nature* 1953; No. 4356 April 25: 737.
147. Wei, Y., Fabre, M., Branchereau, S., Gauthier, F., Perilongo, G., Buendia, M-A. Activation of  $\beta$ -catenin in epithelial and mesenchymal hepatoblastomas. *Oncogene* 2000; 19: 498-504.
148. Weinberg, R. A. How Cancer Arises. *Scientific American* 1996; September: 62-70.
149. Weinberg, R. A. Tumor suppressor genes. *Science* 1991; 254: 1138-1146.
150. White, D. O., Fenner, F. J. *Medical Virology*. 4<sup>a</sup> ed. San Diego: Academic Press, 1994: Capítulo 18.
151. Whyte, P., Buchkovich, K. J., Horowitz, J. M., Friend, S. H., Raybuck, M., Weinberg, R. A., Harlow, E. Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature* 1988; 334: 124-129.
152. Wijnhoven, B., Pignatelli, M. E-cadherin-catenin: more than a "sticky" molecular complex. *The Lancet* 1999; 354: 356-357.
153. Wijnhoven, B., Nollet, F., De Both, N., Tilanus, H., Dinjens, W. Genetic alterations involving exon 3 of the  $\beta$ -catenin gene do not play a role in adenocarcinomas of the esophagus. *Int J Cancer* 2000; 86: 533-537.
154. Woodman, C. B. J., Collins, S., Winter, H., Bailey, A., Ellis, J., Prior, P., Yates, M., Rollason, T. P., Young, L. S. Natural History of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. *The Lancet* 2001; 357: 1831-1836.
155. Wright, K., Wilson, P., Morland, S., Campbell, I., Walsh, M., Hurst, T., Ward, B., Cummings, M., Chevenix-Trench, G.  $\beta$ -catenin mutation and expression analysis in ovarian cancer: exon 3

- mutations and nuclear translocation in 16% of endometroid tumours. *Int J Cancer* 1999; 82: 625-629.
156. Xu, X., Wagner, K. U., Larson, D., Weaver, Z., Li, C., Ried, T., Hennighausen, L., Wynshaw-Boris, A., Deng, C. X. Conditional mutation of *Brca1* in mammary epithelial cells results in blunted ductal morphogenesis and tumor formation. *Nature Genetics* 1999; 22: 37-43.
157. Yamashita, Y. M., Jones, D. L., Fuller, M. T. Orientation of asymmetric stem cell division by the APC tumor suppressor and centrosome. *Science* 2003; 301: 1547-1550.
158. Ylitalo, N., Sørensen, P., Josefsson, A., Magnusson, P. K. E., Andersen, P. K., Pontén, J., Adami, H. O., Gyllensten, U. B., Melbye, M. Consistent high viral load of human papillomavirus 16 and risk of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *The Lancet* 2000; 355: 2194-2198.
159. Yonish-Rouach, E., Resnitzky, D., Lotem, J., Sachs, L., Kimchi, A., Oren, M. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 1991; 352: 345-347.
160. Zhang, F., White, R. L., Neufeld, K. L. Phosphorylation near nuclear localization signal regulates nuclear import of adenomatous polyposis coli protein. *PNAS* 2000; 97: 12577-12582.
161. Zur Hausen, H. Viruses in human cancers. *Science* 1991; 254: 1167-1173.



# Apéndice: Sustancias y reactivos

---

## General

- ☞ TBE 5x:
  - Tris: 27 g
  - Ácido bórico: 13.75 g
  - EDTA 0.5 M: 10 mL
  - H<sub>2</sub>O: c.b.p. 500 mL
- ☞ Gel agarosa 2%:
  - Agarosa Básica Le: 1.0 g
  - TBE 1x: 50 mL
  - Bromuro de Etidio (10 mg/mL): 5 μL
- ☞ Gel agarosa 1%:
  - Agarosa Básica Le: 0.5 g
  - TBE 1x: 50 mL
  - Bromuro de Etidio: 5 μL
- ☞ Buffer de carga:
  - Azul de bromofenol 0.25%
  - Xilencianol FF 0.25%
  - Glicerol en agua 30%

## PCR

- ☞ Buffer para PCR 10x (GIBCO):
  - Tris-HCl 200 mM (pH 8.4)
  - KCl 500 mM
- ☞ MgCl<sub>2</sub>: 50 mM (GIBCO)

## SSCP

- ☞ Gel poliacrilamida:
  - Acrilamida 29:1, 12.5 mL
  - Glicerol 20%: 7.5 mL
  - TBE 5x: 6 mL
  - H<sub>2</sub>O: 4 mL

APS 10%: 200 μL

TEMED: 50 μL

- ☞ Buffer SSCP (10 mL):
  - Formamida: 9.5 mL
  - EDTA 0.5 M (pH 8.0): 400 μL
  - Buffer de carga: 100 μL
  - SDS: 10 mg

## Secuenciación

- ☞ Buffer de reacción:
  - Tris-HCl 260 mM (pH 8.0)
  - MgCl<sub>2</sub> 65 mM
- ☞ Buffer de paro:
  - Formamida 95%
  - EDTA 20 mM (pH 8.0)
  - Azul de bromofenol 0.05%
  - Xilencianol 0.05%
- ☞ Gel poliacrilamida (65 mL):
  - Acrilamida 29:1, 8%
  - Urea 7 M
  - TBE 1X
  - APS 10%: 300 μL
  - TEMED: 60 μL

## PTT

### ☞ Gel concentrador (5%):

Acrilamida 29:1, 1.7 mL

Tris 1.5 M (pH 6.8): 833  $\mu$ L

SDS 10%: 100  $\mu$ L

H<sub>2</sub>O: 5.9 mL

APS 10%: 100  $\mu$ L

TEMED: 10  $\mu$ L

### ☞ Gel separador (10%):

Acrilamida 29:1, 10 mL

Tris 1.5 M (pH 8.8): 7.5 mL

SDS 10%: 300  $\mu$ L

H<sub>2</sub>O: 11.9 mL

APS 10%: 300  $\mu$ L

TEMED: 15  $\mu$ L

### ☞ Buffer de corrida. Tris-Glicina

Glicina: 14.48 g

Tris base 3.0 g

SDS: 1.0 g

H<sub>2</sub>O: c.b.p. 1L