

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

INSTITUTO DE ECOLOGÍA

ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE
BETA-CATENINA EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER
CERVICO UTERINO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

LUIS HUMBERTO MOJICA VÁZQUEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. LETICIA GONZALEZ MAYA

MEXICO, D.F.

SEPTIEMBRE 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

AGRADECIMIENTOS

Quiero dar mis más sinceros agradecimientos al Posgrado en Ciencias Biológicas por todo el apoyo otorgado.

De igual forma tengo que agradecer al CONACYT por la beca otorgada durante mi posgrado, así como a Santander Universia por la beca de movilidad.

A la Doctora Leticia González Maya por su tan importante ayuda en asesorar, supervisar y evaluar mi trabajo.

Al Doctor Alejandro García Carranca por su apoyo durante el desarrollo del proyecto así como sus constructivos comentarios en la redacción de la tesis.

A la Doctora María Elena Calderón Segura, a la Doctora Angélica Meneses Acosta y al Doctor José Luis Montiel Hernández por apoyarme con sus útiles comentarios en la revisión del presente trabajo.

Índice General

Índice General.....	I
Índice de Tablas, Figuras y Graficas.....	II
Resumen.....	IV
Abstract.....	V
Introducción.....	1
Antecedentes.....	3
Vía Wingless.....	3
β -catenina.....	6
Familia TCF/LEF.....	8
Complejo β -cateninal/Tcf-Lef.....	10
Vía wnt y Cáncer.....	12
Justificación.....	17
Objetivos.....	18
Hipótesis.....	19
Métodos.....	20
Resultados.....	29
Discusión.....	47
Conclusiones.....	52
Referencias.....	53
Anexo.....	61

Índice de Figuras, Tablas y Gráficas

Figuras

Figura 1. Homeostasis tisular.....	2
Figura 2. Vía <i>wnt</i> activa.....	5
Figura 3. Regulación de la vía <i>wnt</i>	6
Figura 4. Proteína β - <i>catenina</i>	7
Figura 5. Miembros de la familia <i>Tcf/Lef</i>	9
Figura 6. Proteína <i>APC</i>	12
Figura 7. Mutaciones en <i>APC</i>	13
Figura 8. Niveles de expresión total de β - <i>catenina</i>	14
Figura 9. Cuantificación de la actividad luciferasa y renila.....	24
Figura 10. Western Blot.....	25
Figura 11. Extracción de RNA Totales.....	26
Figura 12. Transcriptas Reversa.....	27
Figura 13. Patrones de digestión enzimáticos de los plásmidos.....	30
Figura 14. Células transfectadas con el plásmido pGFP.....	31
Figura 15. Expresión diferencial de proteínas en extractos totales de las líneas celulares.....	37
Figura 16. Sobreexpresión de β - <i>catenina</i>	39
Figura 17. Análisis de la expresión de genes blancos del complejo β - <i>catenina</i> - <i>TCF/LEF</i>	46
Figura 18. Plásmido TOP/FOP.....	65
Figura 19. Plásmido <i>GFP</i>	65
Figura 20. Plásmido Δ 45.....	65
Figura 21. Plásmido pGL2-basic (LCR).....	66
Figura 22. Plásmido pRL-null (Renila).....	66
Figura 23. Reaccion Luciferasa.....	67

Tablas

Tabla 1. Plásmidos.....	21
Tabla 2. Líneas Celulares.....	22
Tabla 3. Patrones de Digestión.....	29
Tabla 4. Concentración de las preparaciones de DNA plasmídico.....	30
Tabla 5. Actividad Luciferasa y relación TOP/FOP para cada línea celular.....	33

Diagramas

Diagrama 1. Etapas de la Metodología.....	20
---	----

Gráficas

Gráfica 1. Actividad Luciferasa en C33.....	33
Gráfica 2. Actividad Luciferasa en CaLo.....	34
Gráfica 3. Actividad Luciferasa en HeLa.....	34
Gráfica 4. Actividad Luciferasa en SiHa.....	35
Gráfica 5. Actividad Luciferasa en Caski.....	34
Gráfica 6. Actividad Luciferasa en SW480.....	36
Gráfica 7. Actividad Transcripcional de β -catenina en Caski.....	40
Gráfica 8. Actividad Transcripcional de β -catenina en HeLa.....	41
Gráfica 9. Actividad Transcripcional de β -catenina en SiHA.....	41
Gráfica 10. Actividad Transcripcional de β -catenina en C33.....	42
Gráfica 11. Actividad Transcripcional de β -catenina en SW480.....	42
Gráfica 12. Activación de la LCR en Caski.....	43
Gráfica 13. Activación de la LCR en HeLa.....	44
Gráfica 14. Activación de la LCR en C33.....	44

Resumen

La beta-catenina interacciona con E-cadherina y alfa-catenina, formando parte de las uniones adherentes en células diferenciadas normales. También se sabe que beta-catenina es un factor de transcripción al formar un complejo con los miembros de la familia Tcf/LEF. Alteraciones en la vía de beta-catenina (o vía Wnt) se han asociado al desarrollo de varios tipos tumorales. También se ha observado la deslocalización de beta-catenina, en tumores de cuello uterino.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la actividad transcripcional de la beta-catenina endógena y sobreexpresada en líneas celulares de tumores del cuello uterino con VPH y sin VPH, además de determinar posibles genes blancos. Los resultados obtenidos por medio del sistema TOP/FOP, mostraron que la beta-catenina endógena de líneas celulares de cáncer cervico uterino, presenta actividad transcripcional. Esta actividad se ve disminuida por la acción de un TCF4 mutado que genera un TCF4 capaz de unirse a beta-catenina, pero no al DNA, corroborando la activación transcripcional por el complejo beta-catenina/Tcf. Los genes blancos estudiados fueron VEGF y MMP7, analizados por RT-PCR. Además, se determinó que el complejo beta-catenina/Tcf activa la LCR del VPH tipo 18, en las líneas celulares de CaCU Caski, HeLa y C33A que fue co-transfectada con plásmidos delta45 y pGL2LCRLuc. Del presente trabajo podemos concluir, que el complejo beta-catenina/Tcf se encuentra activo y promueve la transcripción de genes blanco en las líneas celulares de CaCU, activando de manera muy interesante la LCR del VPH tipo 18. Sin embargo, falta determinar si esta activación se debe a la unión directa del complejo beta-catenina/Tcf al LCR o a la activación de miembros del complejo AP-1. Pudiendo ser este un mecanismo, por el cual, el complejo beta-catenina/Tcf junto con el HPV promueven la carcinogénesis en cáncer cervico uterino.

Abstract

beta-catenin can interact with the cytoplasmic E-cadherin and alpha-catenin having a participation at intercellular adherens junctions in normal cells. Also beta-catenin acts as transcriptional activator of TCF/LEF factors family. Aberrant regulation of the Wnt (beta-catenina) pathway is implicated in various human cancers. In cervical carcinoma cells was find cytoplasmic and nuclear accumulation of beta-catenin.

Using the TOP/FOP system we can see that beta-catenin present in cervical cancer of cell lines has transcriptional activity. However this activity could be reduced by the TCF mutated presence. The studied target genes were VEGF y MMP7 analyzed by RT-PCR.

In conclusion our results show that beta-catenina/Tcf complex is active in cervical cancer cell lines leading activation of transcription Wnt-responsive genes. Moreover we determined that LCR of HPV is activated by beta-catenina/Tcf complex in cervical cancer cell lines (Caski, HeLa and C33) once we co transfected with plasmids as delta45 and pGL2LCRLuc. However we considered important to determine if this activation is directly response of beta-catenina/Tcf complex in LCR site or by activation of AP-1 know members. Finally we can say, probably, this is a possible way how HPV induce, in presence of beta-catenina/Tcf complex the carcinogenesis process.

Introducción

Las proteínas son el corazón de las funciones celulares, ya que están involucradas directamente en el metabolismo celular. Sin embargo, un fenómeno fundamental para la producción de las proteínas, es la transcripción (Griffiths et al., 2002).

La transcripción es el proceso mediante el cual se lleva a cabo la síntesis de RNA a partir de una cadena molde de DNA. En consecuencia es un fenómeno intermedio de vital importancia, que dirige el producto final de la expresión genética (Proteínas) y marca de forma fundamental el proceso de diferenciación, tanto metabólico como celular. En este sentido, es un proceso con distintas etapas que no solo involucra la unión de la enzima polimerasa a un sitio promotor. Por el contrario, son necesarias secuencias y estructuras localizadas a lo largo de toda la cadena de DNA así como cambios en la cromatina (acetilaciones, deacetilaciones y fosforilaciones) que permiten tener una expresión genética diferencial (Klung y Cummings, 1999).

La transcripción es un proceso importante en el contexto de la carcinogénesis, ya que una regulación incorrecta en los procesos de ciclo celular, diferenciación y muerte celular, junto con una desregulación de la expresión genética puede romper con lo que Alberts llama "homeostasis tisular", ver figura 1 (Alberts et al, 1996; King y Cidlowski, 1998).

Fundamentalmente el cáncer es una enfermedad genética que afecta a las células, propiciando que proliferen sin control. Esta enfermedad puede ser causada por la acumulación de mutaciones en el material genético, principalmente en dos grandes grupos de genes: los proto-oncogenes (*c-ras*, *c-myc*, *erbB*, *fos* y *c-jun*, entre otros) y genes supresores de tumores (*p53*, *pRb*, *APC*, *ATM*, entre otros). Estos genes actúan y afectan directamente la regulación del ciclo celular, la diferenciación y la apoptosis (King y Cidlowski, 1998; McCormick, 1999), además de algunas vías de señalización, dentro de las

que se encuentran aquellas reguladas por la proteína *Ras*, el factor *TGFβ* o las proteínas *Wnt*, por citar algunas.

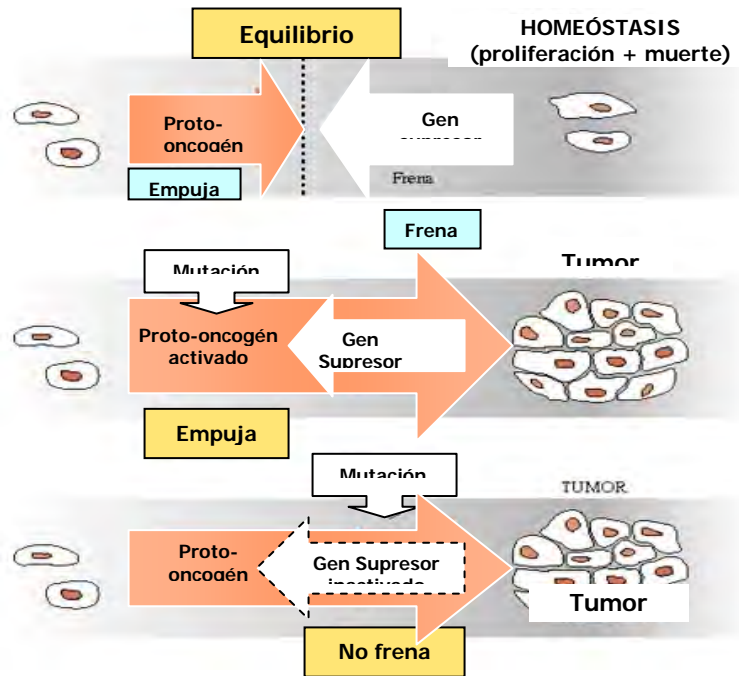


Figura 1. Homeostasis tisular. Participación de genes supresores de tumores y proto-oncogenes tanto en la homeostasis tisular como en la transformación celular (Alberts et al 1996).

Para el caso particular del cáncer de colon, la alteración de la vía *wnt* conduce a la estabilización de la β -catenina (proteína central de la vía Wingless), quién a través de su actividad como factor de transcripción favorece la transformación celular.

Estas alteraciones están asociadas principalmente a mutaciones en tres genes de las proteínas reguladoras de esta vía (*APC*, β -catenina y *Axina*), que ocurren en las primeras fases de la carcinogénesis en cáncer de colon. Por otra parte, debido al papel importante que tiene la vía *wnt* durante el desarrollo embrionario, ésta ha sido ampliamente estudiada en organismos como *Drosophila melanogaster*, *C. elegans*, *Xenopus* y ratones, durante este proceso. Por lo cual, mucha de la información sobre la vía *Wnt* esta enfocada a su papel en el desarrollo embrionario (Polakis, 2000).

Antecedentes

VÍA WINGLESS

La vía de señalización *wingless* en *Drosophila* (o vía de la β -catenina) es una de las más estudiadas en desarrollo embrionario y resulta interesante que presente muchas similitudes en todos los animales, desde nematodos a mamíferos (Povelones y Nusse, 2002).

En *Drosophila melanogaster* esta vía está involucrada en la inducción del endodermo, el desarrollo de ojos, patas, alas, músculos (intestino medio) así como en el establecimiento de la polaridad en los segmentos de las futuras estructuras adultas (Barrer et al, 2000). Esta vía también está implicada en la embriogénesis del nemátodo *C. elegans*, específicamente en la formación del endodermo y la orientación del eje corporal. En el caso de los mamíferos y más específicamente en ratones, se sabe que la vía *wnt* está involucrada en el desarrollo del cerebro medio, el cerebelo, el caudal de somitas, el brote de la cola y en la formación de la placenta (Wodarz, 1998).

Como otras rutas de señalización, la vía de señalización Wingless es activada por la acción de ligandos extracelulares (proteínas *Wnt*). Es esta una familia de glicoproteínas ricas en cisterna y que tienen papeles importantes como moléculas de señalización (ligandos) durante el desarrollo embrionario (Wodarz y Nusse, 1998; Penton et al., 2002). Los ligandos *Wnt* activan receptores transmembranales de la familia *Frizzled*. La familia de estos receptores se caracteriza por poseer en el extremo N-terminal una secuencia de 120 aminoácidos con 10 residuos altamente conservados de cisteína (CRDs) que son necesarios para la unión de las proteínas *Wnt*. Además, las proteínas *Frz* cuentan con siete regiones transmembranales y una pequeña cola citoplasmática. Estas siete regiones transmembranales tienen parecido a los receptores

acoplados a proteínas G y el extremo carboxilo de algunas de las proteínas de la familia *Frz* presentan secuencias *S/TXV*, que son sitios potenciales de unión para los dominios PDZ de la proteína *Dsh* (Wodarz y Nusse, 1998). Una vez activada la vía wnt los receptores *Frizzled* propagan la señal al modificar su extremo C-terminal y fosforilar a la proteína citoplasmática *Dishevelled* (*dsh*). La proteína *Dsh* en *Drosophila* (*Dvl* en vertebrados), está conformada por distintos dominios, de los cuales podemos destacar tres: el dominio PDZ, DEP y DIX. Aunque la estructura del dominio PDZ se ha estudiado bastante se desconoce aún por completo su función. El dominio DEP interactúa con cinasas como la PKC, la cinasa de caseína 2 (*CK2*) y *GSK3-β* en vertebrados. En este sentido se ha propuesto a la *CK2* como un buen candidato para la fosforilación de *Dsh* (Polakis, 2000; Povelones y Nusse, 2002).

Al estar *Dishevelled* fosforilada inhibe la actividad de la cinasa *GSK3β*, evitando así la fosforilación de la proteína *β-catenina* en su dominio N-terminal y en consecuencia su ubiquitinación. *GSK3β/ZW3*, es una proteína cinasa de serin/treonin, que tiene un papel fundamental como represor constitutivo de la estabilización de *β-catenina* o *Arm* en *Drosophila*. La presencia de moléculas *Wnt*, da como consecuencia la activación de la vía y la inhibición de *GSK3β* por la acción de *Dishevelled*, permitiendo la activación de la proteína *β-catenina* (Povelones y Nusse, 2002). *GSK3β* fosforila múltiples residuos del extremo N-terminal de *β-catenina* cuando la vía no está encendida (Polakis, 2000). Sin embargo, a pesar de que *GSK3β* tiene la capacidad de fosforilar sitios consenso presentes en *β-catenina*, la presencia de proteínas como *axina* permiten aumentar de una manera considerable este fenómeno, pero solo en unión a moléculas como *APC*, *CKII* y *PP2A*, ver figura 2 (Kikuchi, 2000).

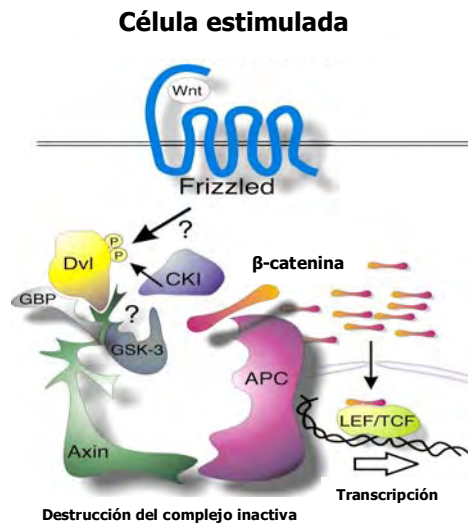


Figura 2. Vía *wnt* activa. La interacción de la proteína *Wnt* con el receptor *Frz* provoca la fosforilación de la proteína *Dvl*. Esto induce la inhibición de la *GSK-3 β* , permitiendo la estabilización de *β -catenina* y su translocación al núcleo para unirse a factores como *Tcf/Lef*. Tomada de Doble y Woodgett, 2003.

Adenomatous polyposis coli (APC) es un gen supresor de tumores, que tiene la capacidad de unirse a *Axina* para la formación del complejo *Axina/APC/ β -catenina/CK2* que permite fosforilar a *β -catenina* (Rubinfeld et al., 1996; Orsulic et al., 1999) en residuos de serin/treonin, lo cual implica un marcaje molecular específico para la degradación de esta molécula. Este marcaje se da mediante la adición covalente de moléculas de ubiquitina y su posterior degradación en los proteosomas, regulando así, los cambios en las concentraciones de *β -catenina* citoplasmática y nuclear (Alberts et al., 1996; Aberle et al., 1997). Sin embargo, cuando la vía *wnt* esta activa no se forma este complejo, no se puede fosforilar a *β -catenina* y por tanto, no se promueve la degradación de la misma a través de la vía de ubiquitinación, dando como resultado la acumulación de *β -catenina* en citoplasma y permitiendo su translocación al núcleo (Barolo y Posakony, 2002; Dennis, 1999; Morin, 1999).

Una vez en el núcleo *β -catenina* se asocia a los factores *Tcfs* para activar la transcripción de genes involucrados con en el ciclo celular, diferenciación y proliferación celular, ver figura 3 (Schwartz R. Donal et al., 2003; Takahashi et al., 2002)

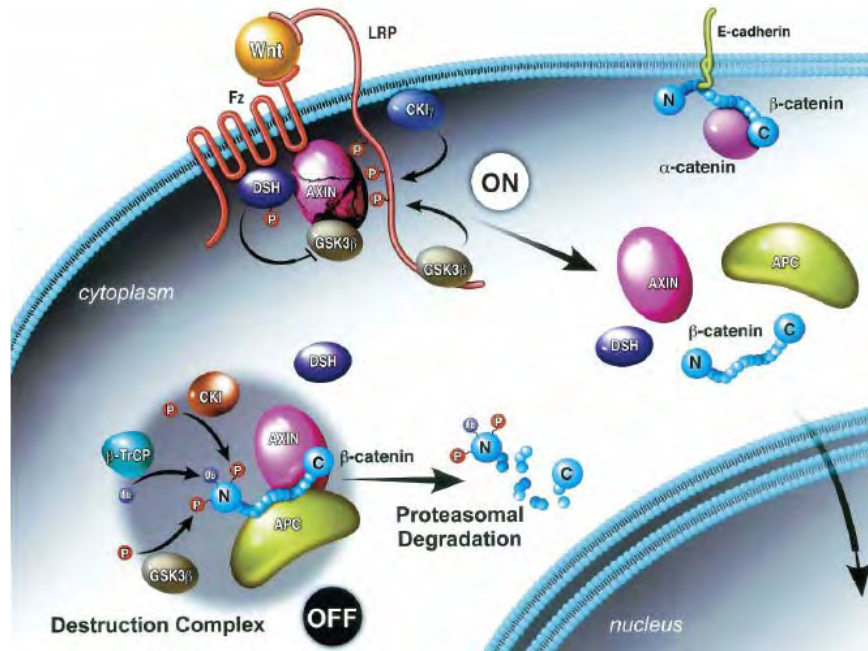


Figura 3. Regulación de la vía *wnt*. En esta figura se resume la vía canónica *wnt*. Tanto en su forma activa (ON) como reprimida (OFF).

β-catenina

El gen de la *β-catenina* en mamíferos (*CTNNB1*) se encuentra en el cromosoma 3p21 y su producto es una proteína con un peso molecular de 92 kDa (Figura 4). La *β-catenina* muestra aproximadamente el 80% de identidad con la proteína *Armadillo* (*Arm*) de *Drosophila*, conteniendo una secuencia central de 13 secuencias conocidas como repeticiones *armadillo* (*arm*), que son secuencias en tandem altamente conservadas de 42 aminoácidos (Hirohashi, 1998).

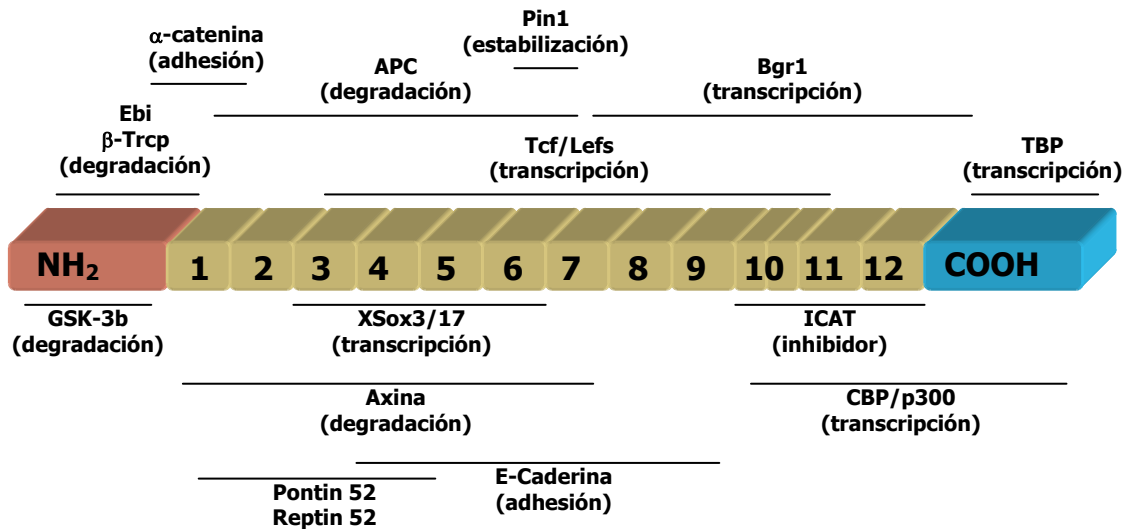


Figura 4. Proteína β -catenina. Dominios de unión con moléculas como α -catenina, APC, Axina, Tcf/Lef, GSK-3 β y los sitios de unión a las diferentes moléculas que la regulan en la transcripción. Modificada de Hurlstone y Clevers, 2002.

A las cateninas originalmente se les identificó como proteínas citoplasmáticas de adhesión celular. Es el caso de β -catenina, la cual tiene la capacidad de unión, por un lado a la cola citoplasmática (extremo carboxilo) de la E-caderina, y por el otro con α -catenina. Esto permite un puente de unión entre la E-caderina y los filamentos de Actina del citoesqueleto, confiriéndole estabilidad a las uniones adherentes célula-célula (Alberts, 1996; Dennis, 1999).

Actualmente se sabe que β -catenina es un factor de transcripción al formar un complejo con los miembros de la familia Tcf/LEF. Sin embargo se ha demostrado que el complejo β -catenina/Tcf no se une a todos sus sitios potenciales, ya que aproximadamente solo el 84% de los sitios son funcionales. Esto abre la posibilidad de que β -catenina pueda unirse a otras moléculas que no sean los factores Tcfs para que lleve a cabo funciones de transcripción. (Yochum S. Gregory et al., 2006).

En fibroblastos embrionarios de pollo se ha observado que β -catenina solo puede sobreexpresar su capacidad como factor de transcripción si se cumple con tres requisitos básicos; que exista una delección o pérdida de los sitios que fosforila GSK3 β en el extremo N-terminal. Conservar el dominio N-terminal indispensable para que no

afecte su función dependiente de la estructura y que estén presentes las repeticiones armadillo (Auki Masahiro et al., 2002).

Como se mencionó, la β -catenina tienen la capacidad de unirse y formar complejos con α -catenina, APC y E-caderina, sin embargo, las uniones APC-E-caderina son mutuamente excluyentes (Ilyas y Tomlinson, 1997).

Familia TCF/LEF

Los miembros de la familia de Factores de Células T (*TCF*) y el Factor Estimulador Linfoide (*LEF*), fueron identificados durante investigaciones en linfocitos de ratones, específicamente al estudiar factores de transcripción. La clonación del gen *Tcf-1* en células T, permitió determinar que la proteína codificada tenía la capacidad de unirse específicamente a una secuencia particular del DNA. De manera semejante, en células B se identificó al factor de transcripción *Lef-1*. Hasta el momento se sabe que ambos factores se expresan en varios tipos celulares, siendo durante el desarrollo embrionario cuando más se expresan (Hurlstone y Clevers, 2002).

En la actualidad son varias las moléculas de la familia *TCF/LEF* identificadas en mamíferos y todas ellas tienen en común el poseer la región HMG (del inglés high movility group). Esta estructura es un dominio que regula la unión al DNA específicamente al unirse al surco menor (Figura 5). El dominio HMG es una secuencia constante de 80 aminoácidos presentes en proteínas que no son histonas pero que se encuentran asociadas estrechamente a la cromatina (Hurlstone y Clevers, 2002).

Los *Tcf_s* son moléculas que se encuentran conservadas a través de la evolución y ejemplo de ello es su presencia en nemátodos, anfibios, ratones, peces, hidras y humanos. Los *Tcf_s* tienen un papel importante en la embriogénesis para el establecimiento del plan corporal, el destino celular y la regulación celular. En células diferenciadas los *Tcfs* regulan la proliferación, específicamente en tejidos como el de la dermis que es continuamente renovado (Barrer et al., 2000).

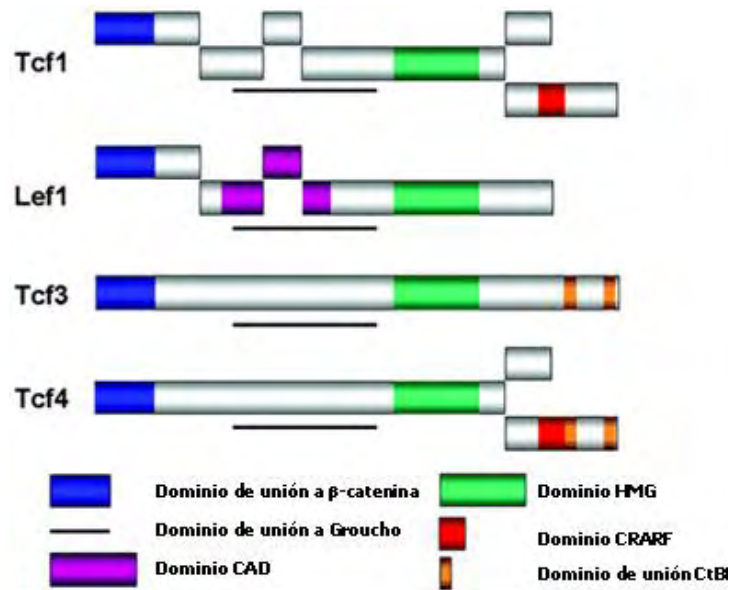


Figura 5. Miembros de la familia *Tcf/Lef*. Dominios de unión más característicos. Tomada de Hurlstone y Clevers, 2002.

Los *Tcfs* participan en las células de forma bimodal: como activadores en un grupo particular de células y como represores en un grupo diferente de células (Hurlstone y Clevers, 2002).

Las diferentes isoformas de los *Tcf_s* presentan en general, varios dominios conservados como el llamado *CAD*, que en el caso de *Lef-1* es requerido para que se lleve a cabo la activación del estimulador (enhancer) de los receptores de las células T (*TCRa*). En el extremo amino de los *Tcf_s* se encuentra el sitio de unión para *β-catenina* y en algunas otras isoformas el extremo carboxilo presenta un dominio llamado *CRARF* que hasta el momento no se conoce totalmente su función. En este sentido muchas variantes presentan también sitios de unión para moléculas con actividad de acetilasa como *CBP* (Hurlstone y Clevers, 2002).

A pesar de que los *Tcfs* son moléculas capaces de unirse específicamente al surco menor del DNA, a manera de monómero y presentar actividad de factor de transcripción, se sabe que es necesaria su unión con otras proteínas, ya que por sí mismas son incapaces de modular la transcripción. Una de esas proteínas, es *β-catenina*,

molécula que se asocia a los factores *Tcfs* para activar la expresión de genes blanco (Takahashi et al., 2002; Rui-Hong C. y McCormick, 2001).

Complejo β -catenina/*Tcf-Lef*

Como se mencionó, β -catenina es un factor de transcripción al formar un complejo con los miembros de la familia *Tcf/LEF*. Sin embargo aunque se piensa que la unión en el citoplasma de β -catenina con los factores de transcripción *TCF/LEF* facilita su translocación al núcleo, se ha podido observar que los factores *TCF/LEF* no son esenciales para tal función (Yolota et al., 1999). De igual forma β -catenina puede unirse a otros elementos transactivadores y la proteína de unión a cajas TATA (TBP) es un ejemplo de ello. La β -catenina se une a TBP con la ayuda de la proteína TIP49 (también conocida como Point 52). La TIP49 es una proteína nuclear altamente conservada con una secuencia muy similar a helicasas de tipo bacteriano. La unión de moléculas como TBP y TIP49 en el complejo β -catenina/*Tcf*, tiene la función de formar un "puente" con la maquinaria de transcripción, específicamente con la RNA polimerasa tipo II (Andreas y Kemler, 2000).

Como muchos otros factores de transcripción que son regulados por señales extracelulares, β -catenina coopera igualmente con coactivadores bimodales que por un lado, se unen a proteínas activadoras de la maquinaria de transcripción, y por el otro, alteran la estructura de la cromatina ya sea por sí mismas o asociadas a acetilasas de histonas (Hurlstone y Clevers Hans, 2002).

En todos los organismos, la ausencia de la señal *wnt* mantiene a los genes blanco en un constante estado de represión. Bajo estas circunstancias, los *Tcfs* se encuentran unidos a co-represores como CtBP, o en el caso de *Drosophila*, a la proteína conocida como *Groucho* (TLE "transducin-like enhancer" en vertebrados). Estas moléculas tienen la capacidad de interactuar con desacetilasas de histonas (por ejemplo *Rpd3*) y mantener la cromatina compacta. Por el contrario, una vez activada la vía *wnt* y estabilizada β -

catenina se puede desplazar a los co-represores de los *Tcfs* y promover así la transcripción (Laurence et al., 2002).

Por otro lado, la inapropiada activación de los *Tcfs* unidos a β -*catenina* da como resultado la expresión de genes blanco como ciclina *D1*, *WAF1*, *IP6K2*, *MMP-7*, *VEGF*, *c-JUN*, *COX-2*, *c-Myc* y *AP-1* (que se explicara más adelante) siendo presumiblemente los responsables del desarrollo de algunos tipos de cáncer al participar en el ciclo celular, diferenciación y proliferación celular. Por ejemplo la sobreexpresión de *IP6K2* (gen blanco del complejo β -*catenina/Tcfs*) reduce los niveles de *IP6* que a su vez provoca la disminución de moléculas como *p53* y *p21* (Auki Masahiro et al., 2002). De igual forma, existen referencias de que, los mismos genes de los *Tcf-1/Lef-1* son genes blanco de la familia *TCF/LEF* (Schwartz R. Donal et al., 2003; Roth et al., 2005).

Como se puede ver, la actividad nuclear de β -*catenina* y los *Tcfs* no es únicamente controlada por la activación de la vía *wnt*, sino también por la participación de coactivadores, corepresores y la colaboración de otras vías de señalización como la de *Ras*. Es el caso de células como SW480, HuH7 (hígado) y HeLa. En las primeras se ha demostrado que *COX-2* y *VEGF* pueden ser regulados por la vía *Wnt* y *Ras* (Araki Yuzuru et al., 2003; Zhang Xiaobo et al., 2001). En líneas celulares HeLa se ha logrado inhibir la vía *Wingless* mediante la utilización de RNAi contra β -*catenina* y estimular de esta forma la apoptosis a través la activación de vías involucradas con *p53*, *NF- κ B* y *Bcl-2* (Huang Moli et al., 2006)

Para estudiar la transcripción de este complejo se han utilizado construcciones plasmídicas que presentan el sitio promotor del complejo β -*catenina/Tcf* unido al gen de luciferasa, lo cual se tratará en el presente trabajo (Korinek et al., 1997; Lévy et al., 2001).

Vía wnt y Cáncer

La participación de la vía *wnt* en cáncer es indiscutible. Ejemplo de ello son las mutaciones que se pueden presentar en el gen supresor de tumores, *adenomatus poliposis coli* (*APC*) que se relacionan directamente con el desarrollo del cáncer colon-rectal conocido como poliposis adenomatosa familiar (*FAP*). (Rubinfeld et al., 1996; Orsulic et al., 1999).

En cáncer de colon más del 60% de todas las mutaciones somáticas del gen de *APC* ocurren en una secuencia que representa el 10% del total del gen. Específicamente entre los codones 1286 y 1513, cerca del sitio de unión a β -catenina, en la región nombrada como MCR, del inglés *mutation cluster region*, ver Figura 6 (Fernhead, 2001).

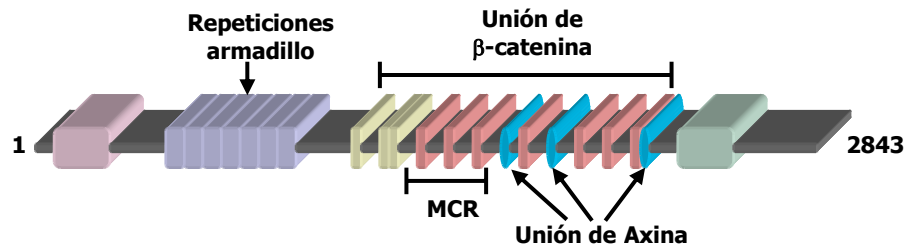


Figura 6. Proteína APC. Regiones más importantes de *APC* con los dominios de unión con Axina y β -catenina.

Modificada de Polakis, 1999.

También se ha observado una relación entre la pérdida de un alelo silvestre de *APC* y la presencia de algunos cánceres colorectales esporádicos, así como la inactivación de ambos alelos y el cáncer de colon heredado, ver Figura 7 (Fernhead et al, 2001).

Por otra parte, en cáncer de colon no sólo se han detectado mutaciones en el gen de *APC*, también se ha visto que en aproximadamente el 30% de los casos, el gen de la β -catenina presenta alteraciones en su dominio N-terminal. Estas mutaciones en *APC* y β -catenina son mutuamente excluyentes, pero en ambas circunstancias la pérdida en la función de *APC* da como resultado una alta actividad transcripcional del complejo β -catenina/*TCF*. (Morin, 1999; Cho et al, 2006)

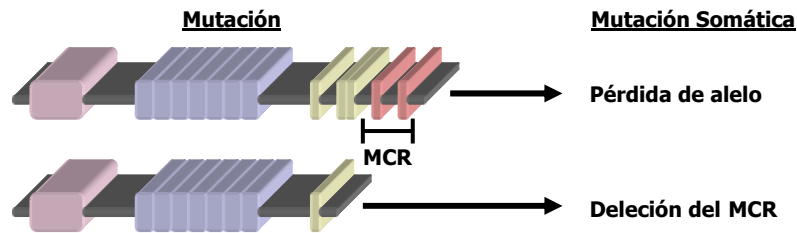


Figura 7. Mutaciones en APC. Se esquematizan los cambios en la estructura de APC debidos a mutaciones y pérdida de heterocidad. Modificada de Polakis, 1999.

En melanomas al igual que en cáncer de colon, se ha observado a la β -catenina mutada en su extremo amino terminal, así como una acumulación anormal de esta proteína en este tipo de cáncer. En líneas celulares derivadas de melanomas y cáncer de colon, la acumulación de la β -catenina puede ser disminuida mediante la sobreexpresión de APC (Haeri, 2001). Además, en cáncer de próstata se han encontrado cinco mutaciones en el sitio de regulación de la β -catenina. Cuatro de esas mutaciones afectan sitios importantes de la β -catenina para que se pueda fosforilar y se lleve a cabo su degradación. Más aún, en carcinomas endoteliales se ha reportado la presencia de mutaciones en el gen de la β -catenina en un 13% de las muestras analizadas. También se han encontrado altos niveles de la β -catenina y deslocalización de la misma en estos tumores. A diferencia del cáncer de colon, en carcinomas de endometrio no se ha encontrado mutado a APC. Esto sugiere dos cosas: que en este tipo de cáncer hay otras alteraciones mediante las cuales se produce la estabilidad de la β -catenina, y que la activación de esta vía es crucial para el desarrollo de cáncer de endometrio (Morin, 1999).

Actualmente la mayoría de los trabajos en tumores del cuello uterino se refieren a la deslocalización de β -catenina y a la ausencia de mutaciones sobre el gen de esta proteína (Shinohara et al., 2001; Pereira-Suárez et al., 2001; Ueda et al., 2001). Así mismo, Pereira y colaboradores, mostraron por Western blot los diferentes niveles de expresión de β -catenina en líneas celulares de cáncer cervico uterino, figura 8 (Pereira-Suárez et al., 2001). Además Rodríguez-Sastre y colaboradores (2005), mostraron que

β-catenina se encuentra deslocalizada en más del 75% de los tumores del cuello uterino analizados por inmunohistoquímica.

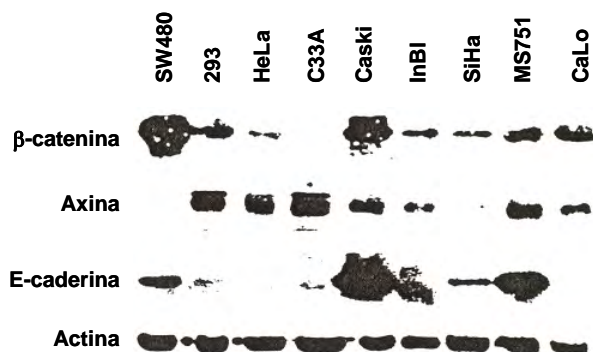


Figura 8. Niveles de expresión total de β -catenina, axina y E-caderina en líneas celulares por Western blot. (Pereira-Suárez et al., 2001).

Por otro lado, en cáncer cervico-uterino (CaCU) se han realizado diversos estudios epidemiológicos que involucran la presencia de un factor viral, el virus de papiloma humano (VPH). El VPH es transmitido sexualmente y actualmente se conocen más de 200 tipos, destacando los VPH de tipo 16 y 18, llamados de alto riesgo por presentarse en la mayoría de los tumores analizados (Berumen et al, 1997; Zur Hausen, 2000). Se ha propuesto que la integración viral en el genoma celular puede ser un paso importante en el desarrollo de la enfermedad, y que dos genes tempranos de los VPHs (*E6* y *E7*) están involucrados en la inmortalización celular, ya que interaccionan fuertemente con proteínas que regulan el ciclo celular y la transcripción de genes celulares. Se sabe que la proteína *E6* forma un complejo con la proteína *p53* supresora de tumores, lo que promueve su degradación (Munger et al, 1998); además *E7* se une a la proteína *pRb* provocando la inactivación de esta última. Esto promueve la progresión del ciclo celular así como un crecimiento celular incontrolado (Berumen et al, 1997; Zur Hausen, 2002).

Si bien en tumores de CaCU se ha mostrado que las infecciones persistentes por algunos Virus del Papiloma Humano (VPH), considerados de "alta riesgo", son una causa necesaria para su desarrollo (Walbooners et al., 1999), también resulta claro que se

requieren de otras alteraciones en genes de proliferación celular para que finalmente se desarrollen tumores (zur Hausen, et al., 1996; Hanh et al., 1999).

En este sentido se ha visto que la transformación de queratinocitos por HPV requieren de un segundo estímulo, como es la activación de la vía *Wnt*. La activación de esta vía es necesaria y suficiente para realizar la transformación de queratinocitos inmortalizados por HPV18. De igual forma se encontró que la transformación de queratinocitos por HPV18 en presencia de la región de *smt* del virus SV40 se correlaciona con el incremento citoplasmático en los niveles de β -catenina así como alta actividad transcripcional del complejo β -catenina/TCF. En consecuencia se sugiere que la vía *Wnt* contribuye a la patogénesis de cáncer cervico-uterino.

Tomando en cuenta lo anterior se puede sugerir que el HPV promueva el inicio de otros procesos en la carcinogénesis, sin embargo el mecanismo molecular por medio del cual el HPV progresa hasta cáncer cervical no es ni único ni claro. Por tanto, la activación de la vía *Wnt* puede jugar un papel importante en la transformación maligna de células epiteliales cervicales infectadas por HPV. De igual forma, en queratinocitos hay evidencias de que los altos niveles de β -catenina en carcinomas cervicales son independientes de las mutaciones que pueda presentar la molécula, sugiriendo que la activación de la vía *Wnt* pueda presentarse en otra molécula que participe en la misma (Üren et al., 2005).

Por otro lado, la proteína activadora-1 (AP-1) es un factor de transcripción formado por complejos dimericos de tres miembros de familias con proteínas de unión a DNA. Estas familias son Jun (c-Jun, JunB, v-Jun y JunD), Fos (Fra-1, Fra-2, c-Fos y FosB) y ATF/CREB. AP-1 tiene la versatilidad de activar o reprimir la transcripción dependiendo de los componentes específicos que formen el complejo dimérico y su entorno molecular en la célula (Hernandez J.M. et al., 2008). En la línea celular HeLa se observó que el complejo AP-1 (JunB/Fra-2) y la proteína HMG-I(Y) interactúan con el LCR del VPH tipo 18, formando de esta manera parte del enhanceosoma que activa la transcripción del LCR del HPV18 (Bouallaga Isabelle et al., 2000). Aunado a esto, los

factores TCF/LEF pertenecen a la misma familia que HMG-I(Y) y poseen dominios HMG (Arce et al., 2006). Finalmente, hay varios reportes que sugieren y muestran una cooperación sinérgica entre miembros del complejo AP-1 (c-Jun) y los Factores TCF/LEF (Rivat et al., 2003), y el mismo complejo β -catenina-Tcf/LEF (Abdolrahman et al., 2005; Xiao-ying et al., 2008; Hasselblatt et al., 2008).

Justificación

En la actualidad el cáncer cervico uterino (CaCU) es una de las enfermedades con más alto índice de mortalidad en mujeres, en países en vías de desarrollo. En México de las enfermedades neoplásicas el CaCU es el más común y es la primera en mortalidad en el país. Los casos de defunciones por tumores malignos del cuello del útero reportados en el 2005, fue de 4270, presentando una tasa de mortalidad de 8.0 (casos/100,000 mujeres), según lo reporta el Sistema Nacional de información de Salud. En el caso del Cáncer cervico-uterino, se sabe que el *VPH* es un agente etiológico importante para su desarrollo. Sin embargo, son necesarias otras alteraciones genéticas para promover la transformación celular. Por otro lado, en diversos tipos tumorales se han encontrado alteraciones de la vía *wnt*, principalmente, en la estabilización de la proteína central de éste vía, la *β -catenina*. Como se menciono anteriormente, la acumulación anormal de la *β -catenina* en núcleo y citoplasma constituye un evento importante en la carcinogénesis de cáncer de colon. Además, la incidente deslocalización de *β -catenina* en otras neoplasias, como carcinomas endoteliales, cáncer de próstata, melanomas, entre otras, permite sugerir una papel importante de la *β -catenina* y de las alteraciones de la vía *wnt*, en el proceso de transformación celular y desarrollo del cáncer. En CaCU estudios inmunohistoquímicos realizados en biopsias de tumores determinaron la presencia de la *β -catenina* deslocalizada en citoplasma y núcleo (Pereira-Suárez et al., 2001; Rodríguez-Sastre et al., 2005). También se sabe que la activación de esta vía es necesaria y suficiente para realizar la transformación de queratinocitos inmortalizados por HPV18 (Üren et al., 2005). Hasta la fecha, pocos han sido los estudios dirigidos en la caracterización de las alteraciones de la vía *Wnt* y de la *β -catenina* en CaCU. Razón por la cual, nos dimos a la tarea de estudiar la posible actividad transcripcional de la *β -catenina* en líneas celulares provenientes de tumores del cuello uterino, y su posible implicación en el desarrollo del CaCU.

Objetivos

Objetivo General

- Analizar la actividad transcripcional del complejo *β-catenina-Tcf/LEF* en líneas celulares derivadas de CaCU.

Objetivos Particulares

- Determinar el nivel de actividad transcripcional del complejo *β-catenina-Tcf/LEF* empleando el sistema TOP/FOP en las diferentes líneas celulares.
- Analizar los niveles de expresión de *β-catenina*, TCF-4 y c-Jun endógenos en las las diferentes líneas celulares.
- Evaluar la actividad transcripcional del complejo *β-catenina-Tcf/LEF* por la sobreexpresión de *β-catenina* y/o de un TCF-4 mutante negativo, empleando el sistema TOP/FOP en las diferentes líneas celulares
- Analizar la activación de la LCR del VPH tipo 18 por la acción del complejo *β-catenina-Tcf/LEF*, en las líneas celulares Caski, HeLa y C33A.
- Estudiar la activación de genes blancos por la acción del complejo *β-catenina-Tcf/LEF*, por RT-PCR en las diferentes líneas celulares.

Hipótesis

El complejo β -catenina-TCF/LEF es activo y funcional en las líneas celulares de cáncer cervico uterino. Promoviendo la activación transcripcional de genes blancos implicados en la carcinogénesis.

Métodos

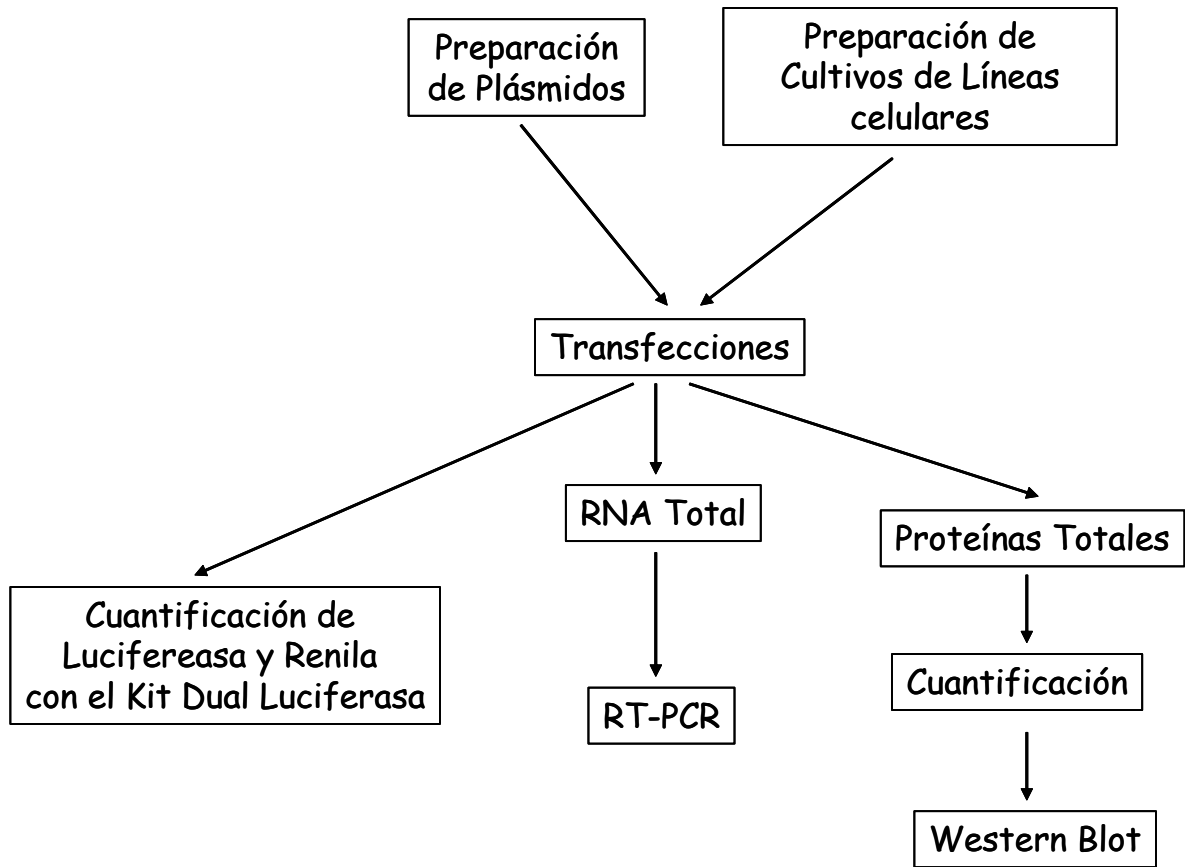


Diagrama 1. Etapas de la Metodología. En este diagrama se describen de forma general las diferentes etapas de la metodología.

PLASMIDOS

A continuación se listan y muestran los diferentes plásmidos utilizados.

Tabla 1. Plásmidos. En esta tabla se muestran los plásmidos utilizados para los diferentes experimentos (ver anexo).

Plásmidos	Peso Molecular	Características	
pTOP*	4.5 Kb	Resistencia a ampicilina, promotor mínimo de timidina cinasa (TK) acoplado al gen de la luciferasa	<p>Secuencia del sitio promotor silvestre</p> <p>AAGATCAAAGGCGGTAAGATCAAAGGGGGTAAGATCAAAGGG</p> <p>En color azul se indican los sitios de unión para el complejo β-catenina-TCF/LEF.</p>
pFOP*	4.5 Kb	Resistencia a ampicilina, promotor mínimo de timidina cinasa (TK) acoplado al gen de la luciferasa	<p>Secuencia del sitio promotor mutado</p> <p>AAGGCCAAAGGGGGTAAGGCCAAAGGGGGTAAGGCCAAAGGG</p> <p>En color rojo se indican los sitios donde se realizaron las mutaciones que no permiten la unión del complejo β-catenina-TCF/LEF.</p>
pGFP	4.2 Kb	Posee el gen de la proteína GFP (Green Fluorescent Protein). Es una proteína de 27 kDa aislada de la medusa <i>Aequorea victoria</i> . Tiene la propiedad de emitir luz verde cuando se excita con luz ultravioleta o luz azul. El elemento emisor de luz o cromóforo es una estructura de tripéptido cíclico codificado en la secuencia primaria de la proteína. Esta proteína presenta una longitud de onda de excitación de 488 nm y de emisión de 507 nm.	
$\Delta 45$	7.9 Kb	Plásmido derivado del vector pcDNA3. Presenta el gen de la β -catenina con la sustitución de una serina por una treonina (S45T). Evita que la proteína de este gen sea degradada, al afectarse el sitio de fosforilación.	
Δ TCF	7.2 Kb	Plásmido derivado del vector pCDNA1. Contiene el gen TCF-4 mutado en el extremo N-Terminal perdiendo el sitio de unión al DNA y mantiene su sitio de unión a β -catenina	
pRL	3.32 Kb	Plasmido obtenido de <i>Promega</i> que contiene el gen de renila utilizado como control interno en la transfección.	
pLCR**	12.6 Kb	La región del LCR fue amplificada del nucleótido 7201 a la 124 por PCR. De igual forma se realizó clonación del gen de luciferasa en el plásmido pGL2-basic (Promega Corp.).	

*Estos plásmidos fueron donados por el Dr. H. Clevers.

**Plásmido amablemente donados por Alejandro López Saavedra

CEPA BACTERIANA

Solo se utilizó la cepa DH5 α para llevar a cabo las transformaciones y propagaciones plasmídicas. El mantenimiento y crecimiento de las bacterias se realizó con medio LB y se incubaron a 37°C (ver anexo).

LÍNEAS CELULARES

El mantenimiento y crecimiento de todas las líneas celulares se realizó con medio DMEM-12 (GIBCO), salvo Caski que creció en RPMI, en ambos casos el medio fue enriquecido con suero fetal bovino - SFB- (Invitrogen) al 10%, incubadas a 37°C con 85% de humedad y 5% de CO₂.

Tabla 2. Líneas Celulares. En esta tabla se muestran las diferentes líneas celulares con las que se trabajó, así como sus características principales.

Línea Celular	Características	Tipo de VPH presente	Origen
SiHa	Carcinoma de células escamosas de cervix.	16	Algunas de las células provienen del American Tissue Culture Collections (ATCC), y otras fueron donadas
Caski	Tumor de cervix; procedentes de metástasis. Carcinoma epidermoide del intestino delgado.	16 y 18	
C33	Carcinoma de cervix	Ninguno	
CaLo	Derivan de tumores del cuello uterino	18	
HeLa	Adenocarcinoma epitelial de cerviz.	18	
SW480	Deriva de cáncer de colon y tiene altas cantidades de β -catenina en núcleo y citoplasma.	Ninguno	

TRANSFECCIONES DE LAS LÍNEAS CELULARES

Las diferentes líneas celulares con las que se trabajó fueron Caski, Siha, HeLa, Calo, C33 y SW480. La confluencia al momento de realizar la transfección fue entre 50%-60%. La transfección se realizó en medio libre de antibióticos y sin SFB.

Se realizaron transfecciones en volúmenes distintos; para la obtención de proteínas totales en cajas de 60 mm con una concentración total de DNA plasmídico de 4 μ g y 20 μ l de lipofectin Reagent (Invitrogen), para RNA total en cajas de 6 pozos (35 mm) con una concentración total de DNA plasmídico de 2 μ g y 10 μ l de lipofectin Reagent. Finalmente, para medir actividad Luciferasa/Renilla en cajas de 24 pozos con una concentración total de DNA plasmídico de 0.5 μ g y 3 μ l de lipofectin Reagent. En relación a la concentración de DNA plasmídico, como se realizaron co-transfecciones hasta con tres de los plásmidos (mas pRL como control interno), se mantuvo una relación de 1/3 de la concentración total para los plásmidos, como p Δ 45, p Δ TCF, pTOP, pFOP y pLCR, y de 1/10 del total para pRL. Con respecto a pGFP, pcDNA3.1 y pGL2, se emplearon como controles negativos, además para ajustar la concentración de DNA total indicada cuando fue necesario. El tiempo de incubación fue de 12 hrs con el complejo DNA/lipofectin en medio con 2% SFB, sin antibióticos, posteriormente se sustituyó por medio fresco con 10% SFB e incubó por 36 hrs más, para cubrir en total 48 hrs de incubación. Las diferentes transfecciones y combinaciones de plásmidos, se retoman más específicamente en resultados.

ACTIVIDAD DE LUCIFERASA

La actividad luciferasa se realizo 48 horas después de iniciada la transfección de la siguiente forma:

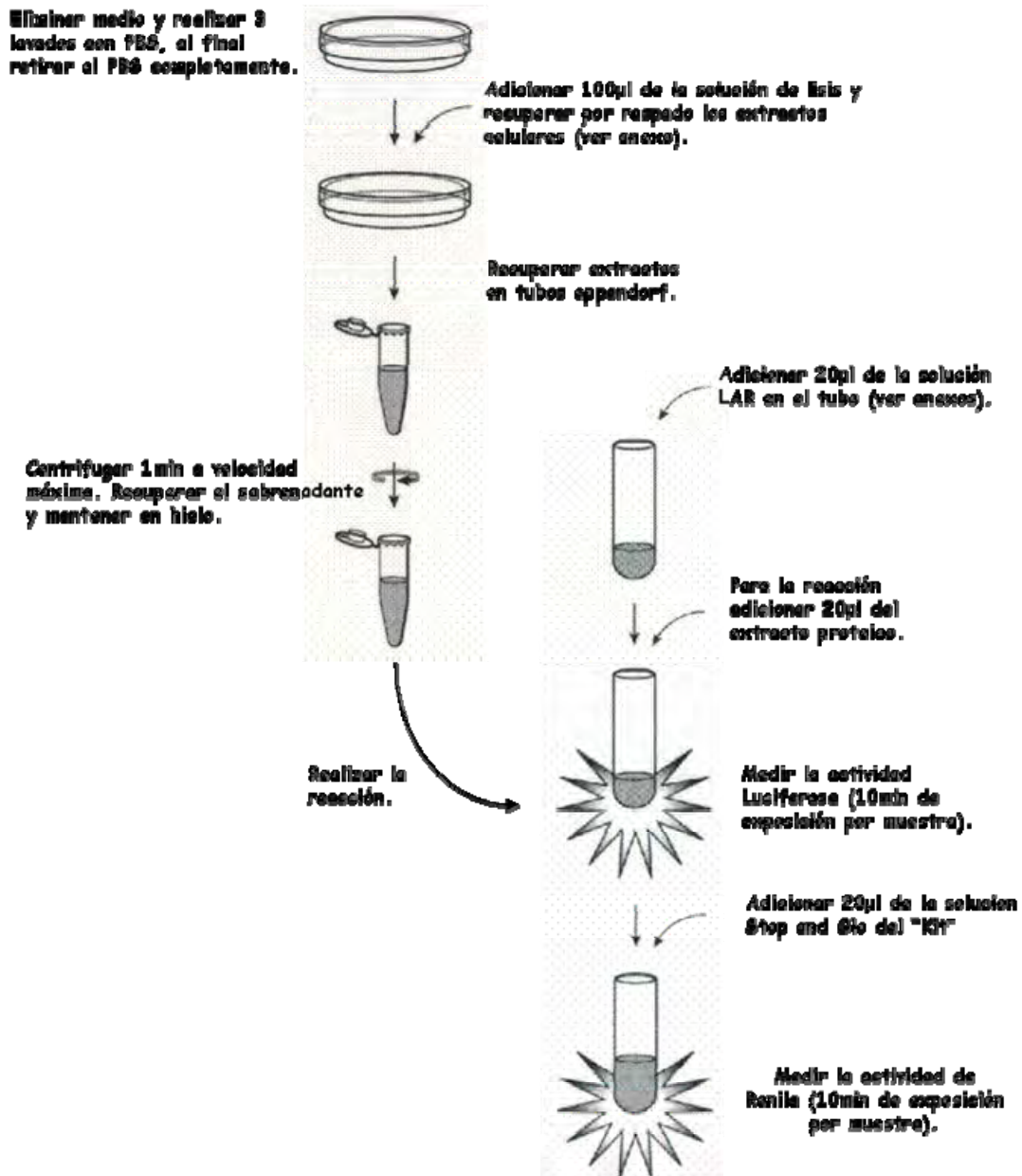


Figura 9. Cuantificación de la actividad luciferasa y renila. En esta figura se esquematiza la forma mediante la cual se realizó la cuantificación luciferasa y renila.

WESTERN BLOT

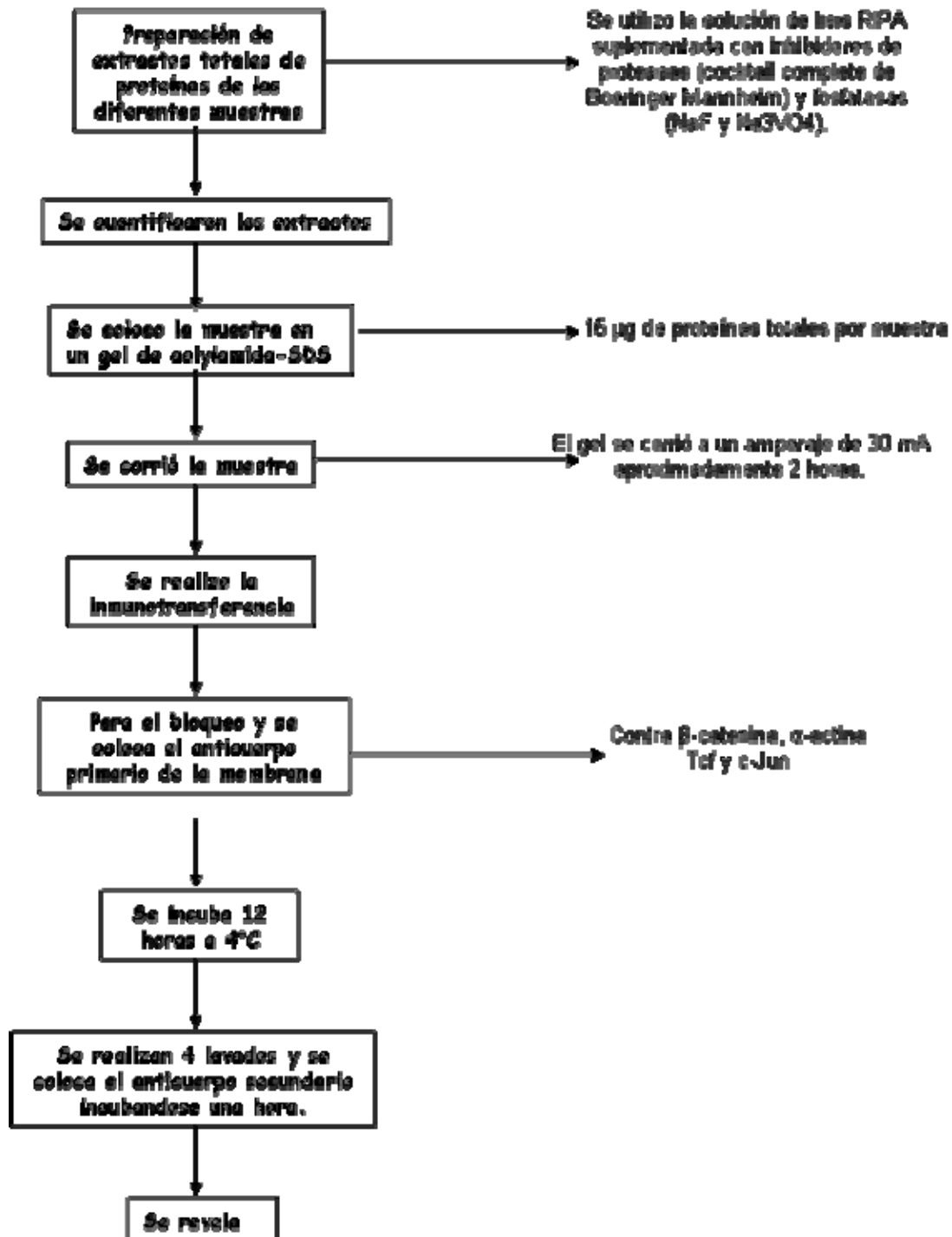


Figura 10. Western Blot. En esta figura se muestran los pasos que se realizaron para llevar a cabo el Western Blot (ver anexo).

EXTRACCION DE RNA TOTAL

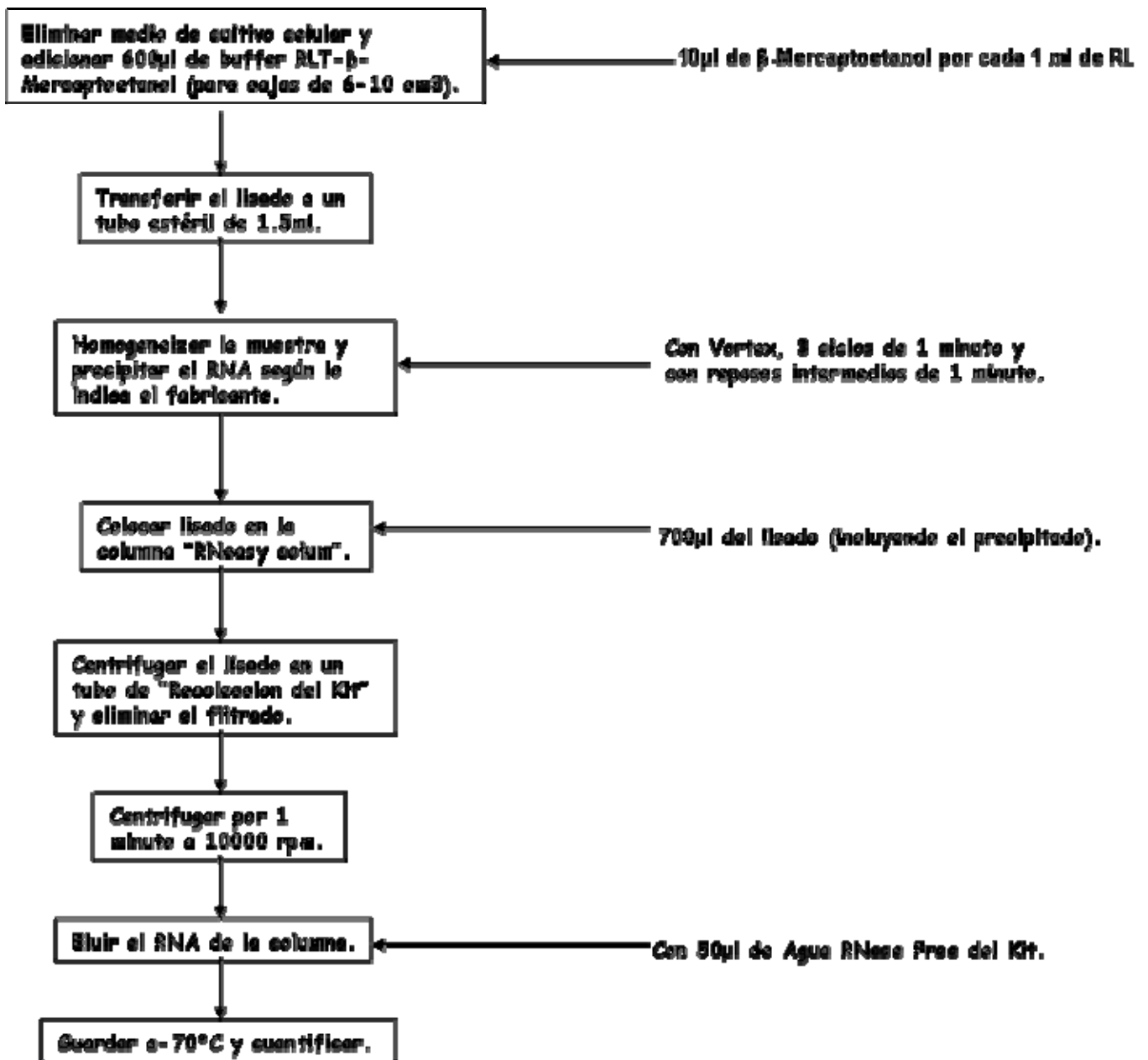


Figura 11. Extracción de RNA Totales. En esta figura se muestran los pasos que se realizaron para llevar a cabo la extracción de RNA (ver anexo).

TRANSCRIPTASA REVERSA (RT)

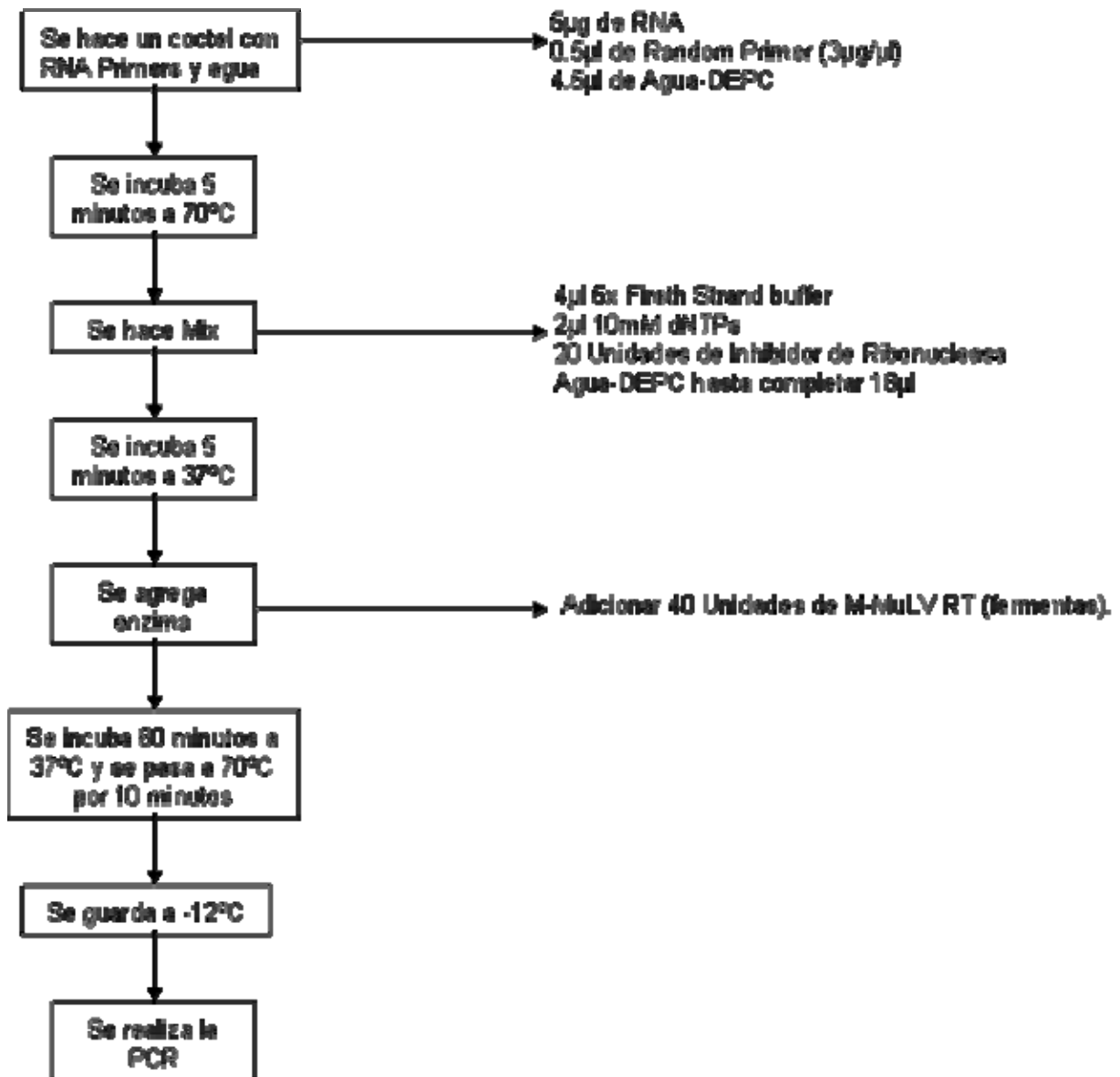


Figura 12. Transcriptasa Reversa. En esta figura se muestran los pasos que se realizaron para llevar a cabo la producción de cDNA (ver anexo).

PCR

La amplificación de segmentos de los genes VEGF y MMP7, se realizó a partir del cDNA amplificado por RT y el empleo de los siguientes oligonucleótidos, que fueron verificados con las secuencias de GeneBank VEGF (NM_001025366) y MMP7 (GeneID: 4316).

Para MMP7:

Sentido: 5' -GAATGTTAAACTCCCGCGTCATAGA-3'

Anti-sentido: 5' -CAGCGTTCATCCTCATCGAAGTGA-3'

Para VEGF A1:

Sentido: 5' -GAGGGCAGAATCATCACGAA -3'

Anti-sentido: 5' -CACGCTCCAGGACTTATACC -3

Para encontrar las condiciones optimas de PCR, se modifíco la temperatura de hibridación de 50°C a 60°C, y la concentración de MgCl₂ entre 25mM y 75mM. Las concentraciones para la PCR se describen en detalle en el anexo.

Resultados

1. **Caracterización de Plásmidos.** Con el objeto de llevar a cabo las diferentes transfecciones se realizaron purificaciones de DNA plasmidico.

1.1. **Preparación de los plásmidos** pTOP, pFOP, pGFP, pΔ45, pΔNTCF4, pRL, pGL2, y pLCRr empleando columnas de QIAGEN (ver anexo). La verificación de los plásmidos purificados se realizó mediante el uso de endonucleasas de restricción, para comprobar los patrones de digestión (tabla 3).

Tabla 3. Patrones de digestión.

PLASMIDO	ENZIMAS	FRAGMENTOS
pTOP y pFOP	EcoRI	2.8 Kb, 1.2 Kb y 0.5 Kb
pΔ45	Xba I y Xho I	5.5 Kb y 2.4 Kb
pΔNTCF4	BamHI y XhoI	4.8 Kb y 2.4 Kb
pGFP	Xho I	4.2 Kb

Durante la preparación de los plásmidos pΔ45 (expresa una *β-catenina* mutada) y el plásmido pΔNTCF4 (expresa un TCF-4 mutado negativamente), se presentaron varios problemas en el sentido de que nunca se logró obtener concentraciones superiores a los 300 y 150 [ng/μl], independientemente de usar columnas maxi, midi o minipreps de QIAGEN. Esto implicó que en las repeticiones de las transfecciones donde se empleaban estos plásmidos, se emplearan distintas preparaciones. Consideramos que esto pudo influir en las variaciones de las actividades luciferasa encontradas entre las repeticiones independientes. En la Figura 13 se muestra los patrones de digestión obtenidos y separados por electroforesis en geles de agarosa al 0.8%.

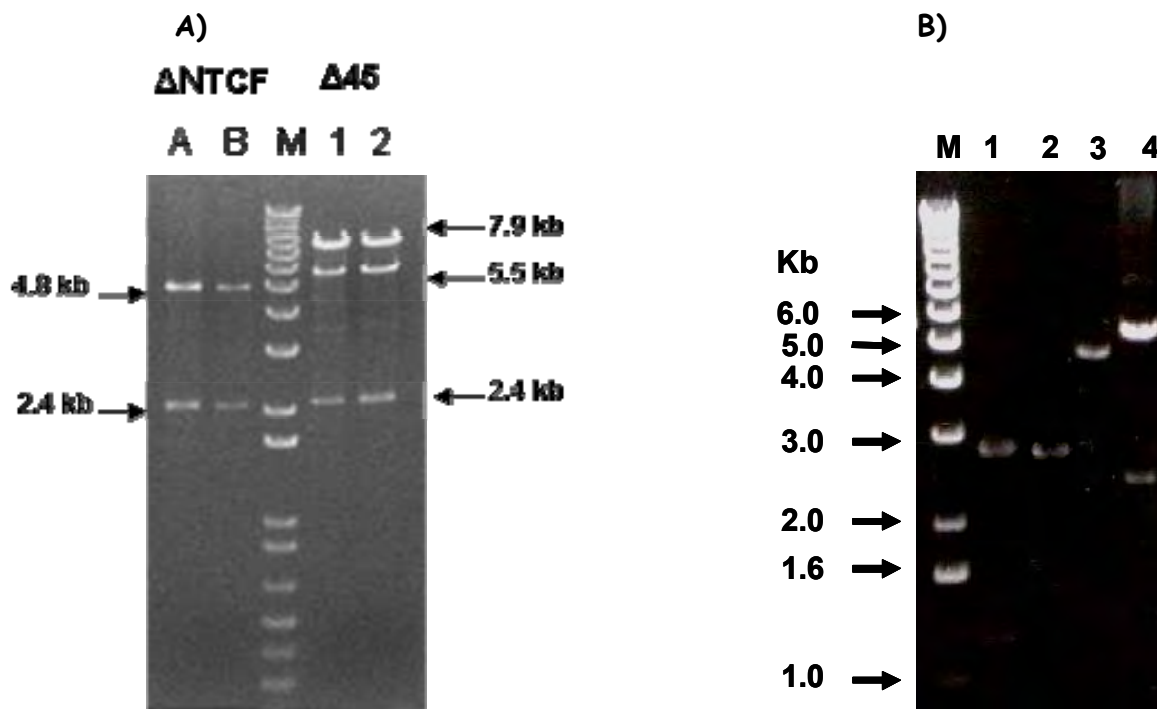


Figura 13. Patrones de digestión enzimáticos de los plásmidos. A) Digestiones enzimáticas de los plásmidos pΔNTCF4 (A y B) pΔ45 (1 y 2) con digestión parcial. B) Digestiones enzimáticas de los plásmidos pTOP (1), pFOP (2) y pGFP (3). M) Marcador de peso molecular (1 Kb, Life Technologies).

1.2. La cuantificación de DNA plasmidico se realizó por medio de la absorbancia obtenida a una longitud de onda de 260 nm de cada preparación (ver Tabla 4), y aplicando la relación siguiente:

1 U a $DO_{260\text{ nm}}$ equivale a 50 $\mu\text{g/ml}$ de DNA de doble cadena.

Tabla 4. Concentración de las preparaciones de DNA plasmídico.

Plásmido	$DO_{260\text{ nm}}$	$DO_{280\text{ nm}}$	Concentración [ng/ μl]	260/280
pTOP	29803	15834	1490	1.88
pFOP	4347	2320	217	1.87
pGFP	42104	21920	2105	1.92
pΔNTCF4	3006	1704	140	1.77
pΔ45	6124	3285	306	1.86
pRL	1891	1035	94	1.83
pcDNA	8385	4478	419	1.87

2. **Transfección de las líneas celulares de CaCU:** HeLa, SiHa, Caski, Calo y C33 con los plásmidos correspondientes.

La transfección se estandarizó empleando el agente lipofectin Reagent (Invitrogen) y el plásmido pGFP, con el cual es posible observar de manera directa los niveles de transfección obtenidos en las diferentes líneas celulares de CaCU. Finalmente se emplearon 2 μ g DNA total y 10 μ l de lipofectin por caja de 35 mm de diámetro o cajas de 6 pozos. La Figura 14 muestra la eficiencia de transfección en función de la fluorescencia de la proteína GFP en las diferentes líneas celulares.

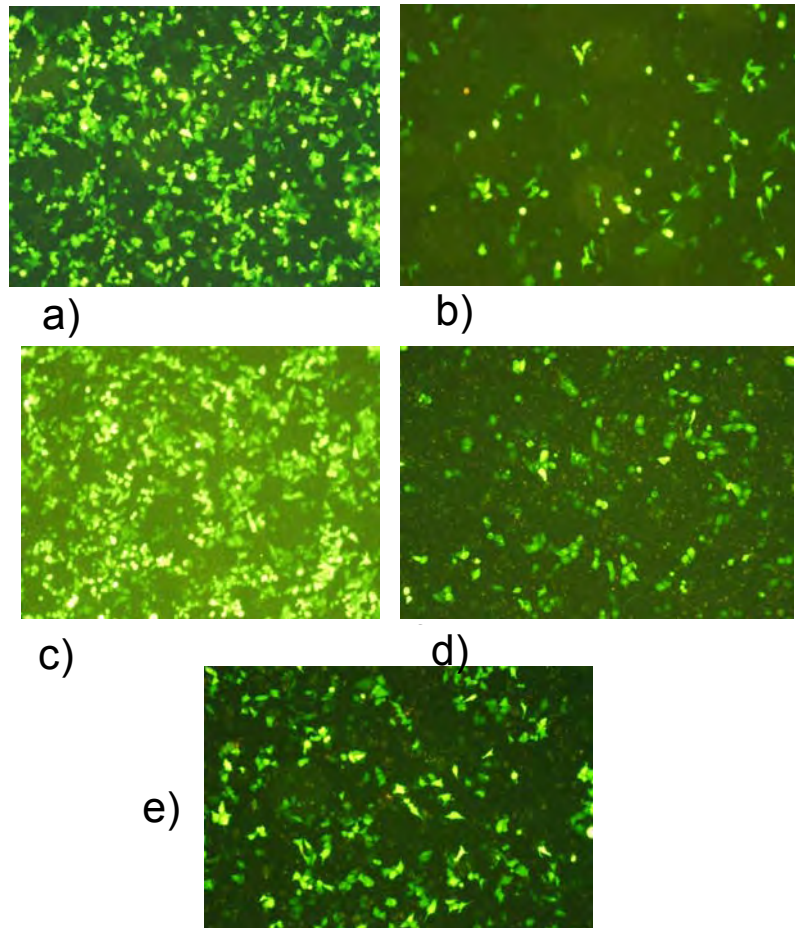


Figura 14. Células transfectadas con el plásmido pGFP. Las células después de 48 hrs de la transfección, se observaron al microscopio de fluorescencia. a) HeLa, b) SiHa, c) Calo, d) Caski y e) C33. Aumento de 10X.

Los niveles de transfección obtenidos fueron variables entre las diferentes líneas celulares utilizadas. El porcentaje de células fluorescentes, es considerada como una relación directa del nivel de transfección, es decir, de la cantidad de DNA plasmídico introducido o aceptado en la célula. Por lo cual, para el análisis de la actividad transcripcional se empleó plásmidos con el gen reportero luciferasa, y como control interno se utilizó el plásmido con el gen Renila (pRL) que permitió hacer un ajuste en función de la cantidad de actividad Renila que indica la cantidad de DNA plasmídico que fue transfectado a la célula.

3. Evaluación de la actividad transcripcional del complejo β -catenina-TCF/LEF.

Para determinar si la β -catenina endógena de las líneas celulares de CaCU forman un complejo funcional con TCF/LEF, se empleó el sistema TOP/FOP, que consiste en dos plásmidos que contienen en la región promotora dos secuencias consenso para la unión del complejo β -catenina-TCF/LEF, normal (wt) para TOP y mutados para FOP, ambos acoplados al gen reportero Luciferasa, como se describió en métodos. Se cotransfectaron las líneas celulares Caski, SiHa, HeLa, C33, Calo y SW480 (cáncer de colón, control positivo), con los plásmidos pTOP/pRL, pFOP/pRL y pGFP (como control negativo)/pRL a una concentración de 2 μ g DNA total y 10 μ l de lipofectin por caja de 35 mm y se determinó la actividad luciferasa y Renila empleando el Kit Dual Luciferase (Promega) 48 horas después de la transfección.

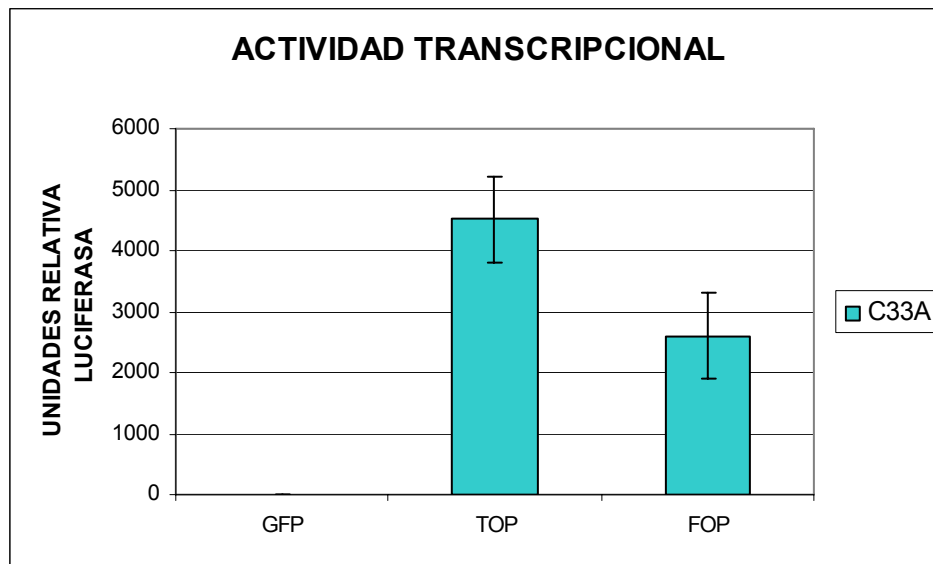
Los experimentos se realizaron por triplicado para cada una de las líneas celulares y por cada cotransfección ya antes mencionada. Cada serie se repitió 3 veces en experimentos separados e independientes.

La actividad Luciferasa se ajusto con la actividad Renila en cada una de las muestras, por lo cual la actividad de Luciferasa se indica como Unidades Relativas. También se determinó el promedio y la desviación estándar de cada repetición y se gráfico los resultados por líneas celulares. Además se determinó la relación TOP/FOP (Tabla 5).

Tabla 5. Actividad Luciferasa y relación TOP/FOP para cada línea celular.

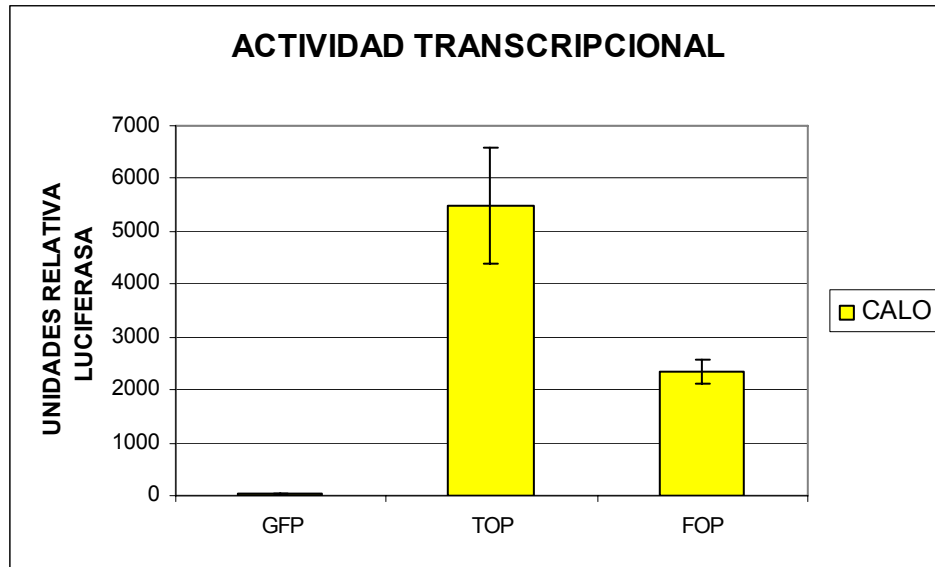
Plamidos	Calo	C33A	SiHa	Caski	HeLa	SW480
pGFP	24	3	131	46	1	39
pTOP	5491	4511	2137	1449	47591	220274
pFOP	2339	2597	481	129	14424	3134
TOP/FOP	2.3	1.7	4.4	11.3	3.3	70

La línea celular C33A presentó una relación TOP/FOP de 1.7, lo que indica que la actividad Luciferasa fue muy similar cuando se transfectó la célula con el plasmido TOP comparada con el plasmido FOP. Este último plasmido presenta mutados los dos sitios putativos de unión al complejo β -catenina-TCF/LEF en la región promotora, por lo cual, la activación transcripcional del gen reportero Luciferasa que se ve traducida en la actividad propia de Luciferasa, no se asocia a la actividad transcripcional del complejo β -catenina-TCF/LEF. Grafica 1.

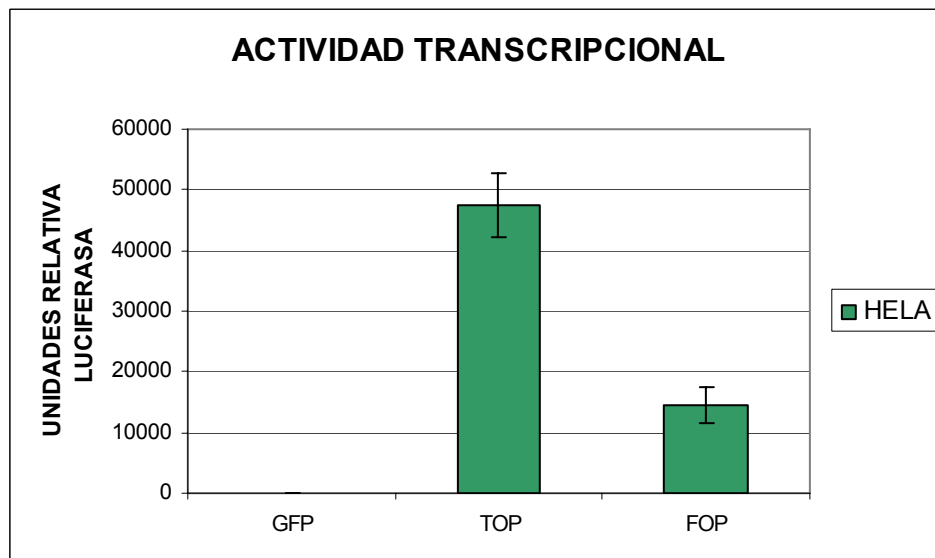


Grafica 1. Actividad Luciferasa en la línea celular **C33A** transfectada con los plasmidos pGFP, pTOP y pFOP respectivamente. Relación TOP/FOP de 1.7

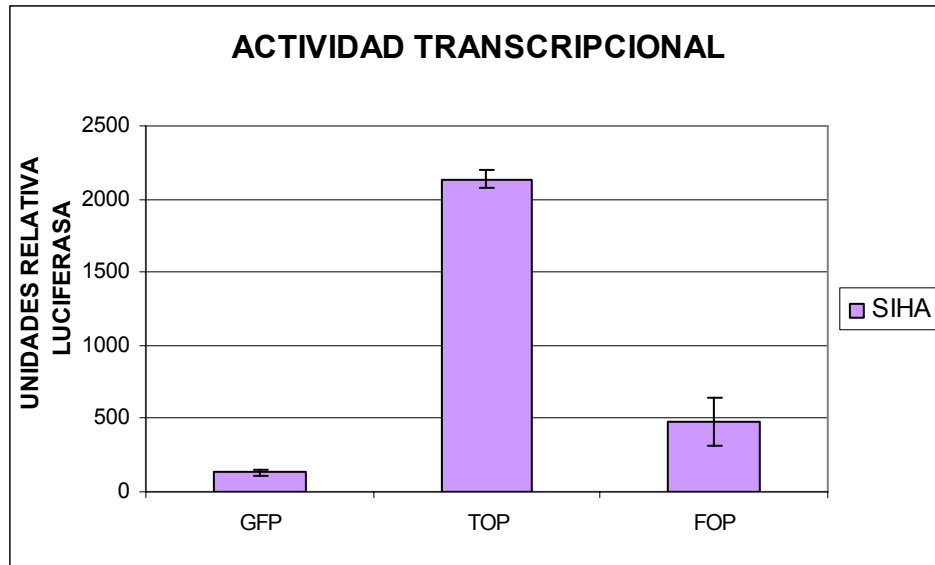
La línea Calo presentó una relación TOP/FOP de 2.3, justo por arriba de 2, que es el límite para considerar una actividad transcripcional asociada al complejo β -catenina-TCF/LEF. Por su parte HeLa presentó un TOP/FOP de 3.3. Graficas 2 y 3.



Grafica 2. Actividad Luciferasa en la línea celular **CaLo** transfectada con los plasmidos pGFP, pTOP y pFOP respectivamente. Relación TOP/FOP de 2.3

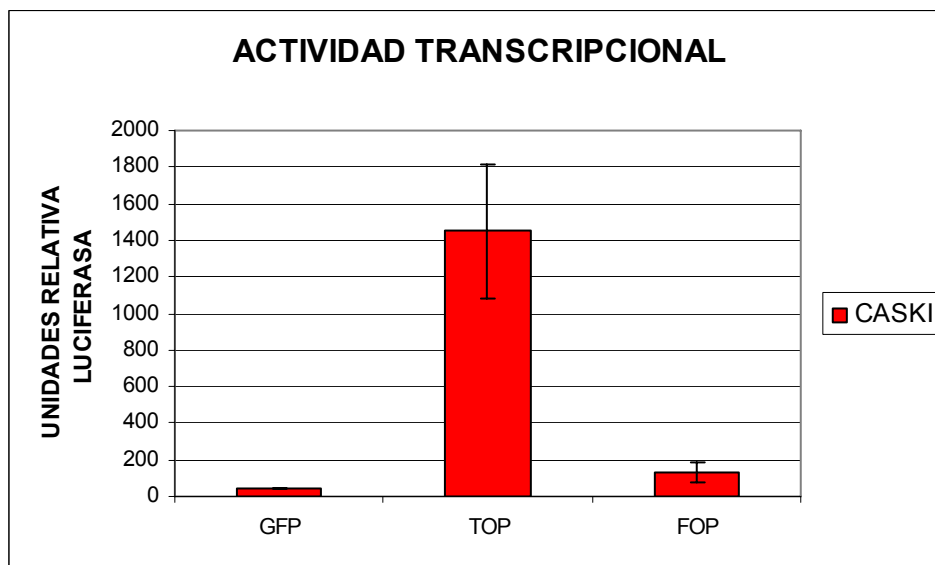


Grafica 3. Actividad Luciferasa en la línea celular **HeLa** transfectada con los plasmidos pGFP, pTOP y pFOP respectivamente. Relación TOP/FOP de 3.3



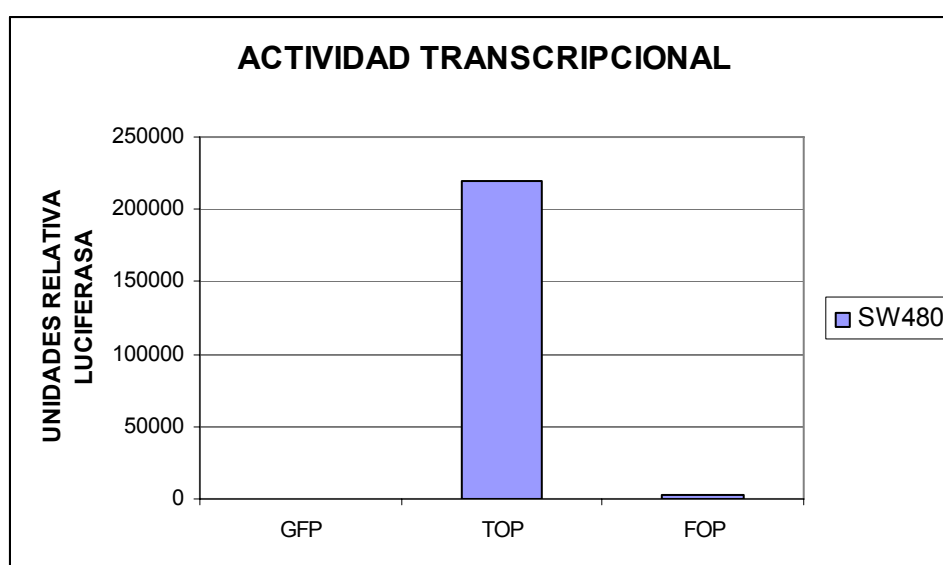
Grafica 4. Actividad Luciferasa en la línea celular **SiHa** transfectada con los plásmidos pGFP, pTOP y pFOP respectivamente. Relación TOP/FOP de 4.3

La células SiHa mostraron un valor TOP/FOP de 4.3 y la línea Caski, fue quién presento entre las líneas de CaCU la mayor actividad asociada a el complejo β -catenina-TCF/LEF, con un valor TOP/FOP de 11.3. Graficas 4 y 5.



Grafica 5. Actividad Luciferasa en la línea celular **Caski** transfectada con los plásmidos pGFP, pTOP y pFOP respectivamente. Relación TOP/FOP de 11.3

Como control positivo se utilizó la línea celular SW480 de cáncer de colón, la cual, debido a una mutación en el gen APC, la β -catenina no puede ser fosforilada por el complejo GSK3 β /APC/Axina/PP2A, lo que permite su estabilización en el citoplasma y posterior translocación a el núcleo. Por lo cual forma el complejo β -catenina-TCF/LEF y activa genes como c-myc y ciclina D. Esta actividad transcripcional se determinó y mostró una relación TOP/FOP de 70, como se observa en la grafica 6.



Grafica 6. Actividad Luciferasa en la línea celular **SW480** transfectada con los plásmidos pGFP, pTOP y pFOP respectivamente. Relación TOP/FOP de 70

4. Evaluación de los niveles de expresión de β -catenina endógena.

Para determinar la concentración de β -catenina en cada línea celular y nos indique si existe una relación entre los niveles de expresión de β -catenina con la actividad transcripcional antes observada; se preparó un extracto proteico total de las líneas celulares de CaCU y de SW480 (como control positivo), y se analizaron las muestras por Western Blot empleando un anti- β -catenina (Pharmigen) y como control un anti- α -Actina (Santa Cruz), ambos anticuerpos monoclonales. Se empleó 15 μ g de proteína total y se separaron en geles de acrilamida a 10% y 15%

respectivamente. Se transfirió a membranas de Inmobilon (BioRad) y se inmunodetectaron con los anticuerpos primarios y como anticuerpo secundario se empleo un anti-raton (SantaCruz). Figura 15 A y D.

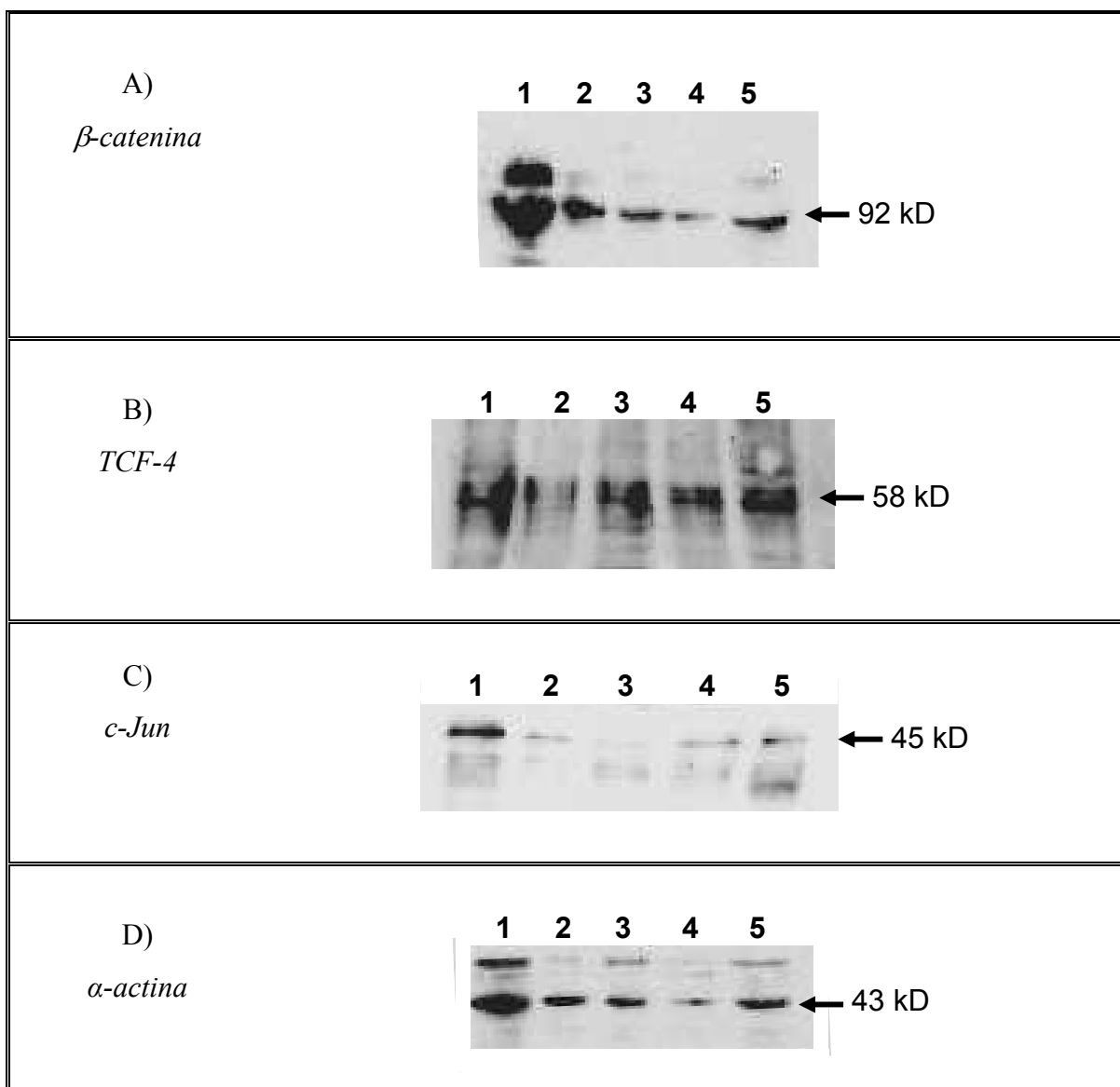


Figura 15. Expresión diferencial de proteínas en extractos totales de las líneas celulares. 1) SW480, 2) Caski, 3) HeLa, 4) SiHa y 5) C33A

También se analizaron las proteínas TCF-4 y c-Jun, con sus respectivos anticuerpos primarios, ambos policlonales (Santa Cruz), y el segundo anticuerpo un anti-conejo (Santa Cruz) para ambos (figura 15 B y C).

Como se esperaba, la línea SW480 presenta una gran cantidad de β -catenina, le sigue en concentración la línea Caski que es la línea de CaCU que presenta más concentración de β -catenina que las demás, quienes mantienen una concentración muy semejante, incluso SiHa si comparamos y ajustamos con la señal de α -actina (figura 15 A y C).

De cierta manera, la concentración de β -catenina si correlaciona con la actividad transcripcional observada con el sistema TOP/FOP, ya que Caski quién presenta mayor actividad transcripcional de las líneas de CaCU, también posee mas concentración de β -catenina. Por su parte SiHa y HeLa presentan tanto la misma concentración de β -catenina, así como de actividad transcripcional. Y por supuesto, es clara la asociación entre la concentración de β -catenina en SW480, comparada con la gran actividad transcripcional observada.

De manera sorprendente, C33A presenta la misma concentración de β -catenina que HeLa y SiHa, a diferencia de lo encontrado por Pereira y colaboradores (2001) - figura 8, donde no encontraron niveles detectables de β -catenina. Lo anterior permitía sugerir que la ausencia de β -catenina en C33A correlacionaba con la ausencia de actividad transcripcional en esa línea celular. Sin embargo, nuestro resultado del nivel de expresión de β -catenina en esta línea no concuerda con el nivel de actividad transcripcional observado en este estudio.

Con respecto a la proteína TCF-4, al parecer los niveles de expresión son muy homogéneos en todas las líneas celulares, quizás sea Caski quién presente menor concentración, sin embargo la calidad de la señal no es muy clara como para permitir concluir de manera contundente (figura 15 B). Al menos podemos sugerir que la proteína TCF-4 no es limitante para que el complejo β -catenina-TCF/LEF se forme y se una el DNA.

5. Determinación de los niveles de sobreexpresión de β -catenina.

Con el objetivo de analizar la actividad transcripcional del complejo β -catenina-TCF/LEF, se propuso sobreexpresar una β -catenina mutada en líneas celulares de CaCU. Esta β -catenina mutada no puede ser fosforilada y posteriormente degradada porque el sitio de fosforilación ser45 esta mutado, por lo cual se acumula en el citoplasma y en seguida es translocada al núcleo. De tal manera que en estas condiciones podemos analizar algunos de los genes blancos de este complejo en las Líneas de CaCU. Para esto se empleo el plasmido p Δ 45 y para comprobar que la β -catenina de este plasmido si se sobreexpresa, se procedió a transfectar células HeLa con el p Δ 45 y el pGFP como control negativo, y determinar el nivel de expresión por Western blot con el anti- β -catenina (Pharmigen). Las condiciones de transfección fueron las mismas antes mencionadas y como se describe en materiales y métodos.

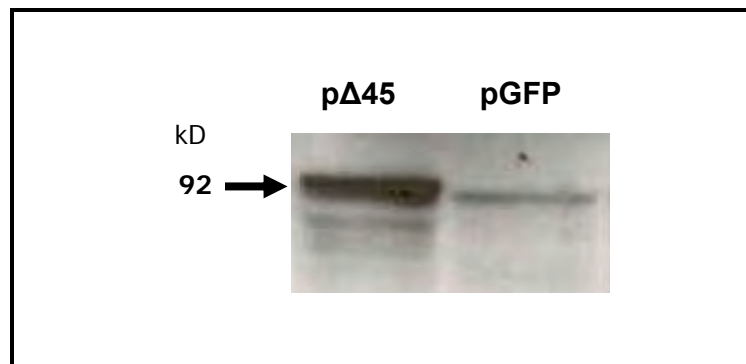


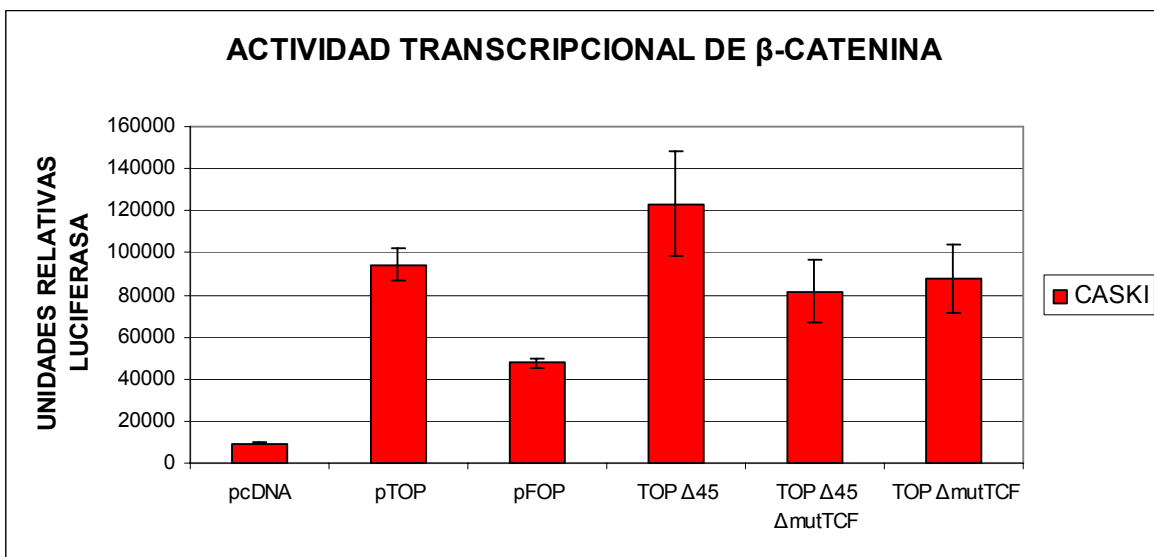
Figura 16. Sobreexpresión de β -catenina. La inmunodetección se realizó en células HeLa transfectadas con los plásmidos p Δ 45 y pGFP, respectivamente. El peso molecular de β -catenina es de 92 kDa.

En la figura 16 se observa que las células transfectadas con p Δ 45 sobreexpresa la β -catenina en alrededor de 5 veces más, comparada con las células transfectadas con pGFP que muestran la concentración de la β -catenina endógena.

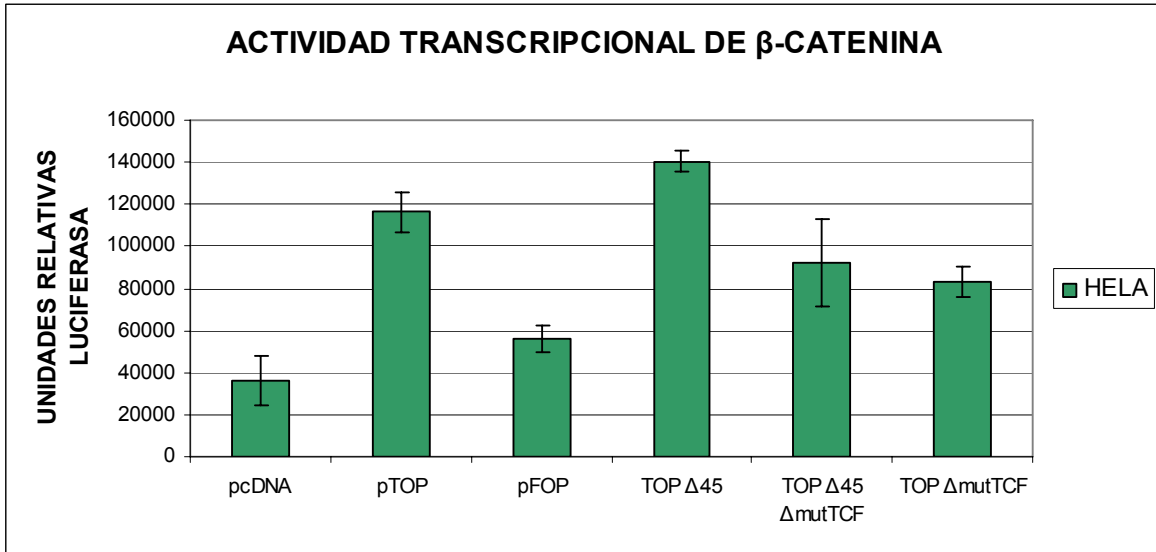
6. Regulación de la actividad transcripcional del complejo β -catenina-TCF/LEF.

Se procedió a determinar que la sobreexpresión de β -catenina mediante la transfección con el plasmido p Δ 45 correlacionaba con un aumento en la actividad transcripcional del complejo β -catenina-TCF/LEF, por lo cual se utilizó nuevamente el sistema TOP/FOP. Además se empleó el plasmido p Δ NTCF4 que expresa un TCF-4 mutante negativo, es decir, que tiene la capacidad de unirse a β -catenina pero no al DNA, con el objetivo de mostrar que éste puede reprimir la actividad Luciferasa inducida por la sobreexpresión de β -catenina. Se incluyó al pRL como control interno. Se co-transfectaron las líneas celulares Caski, SiHa, HeLa, C33A y SW480, como se indica en materiales y métodos.

En la grafica 7 se observa como en Caski la sobreexpresión de β -catenina aumenta la actividad FOP en 1.3 veces, y que el mutante Δ NTCF4 logra reprimir en aproximadamente 30% esta actividad.

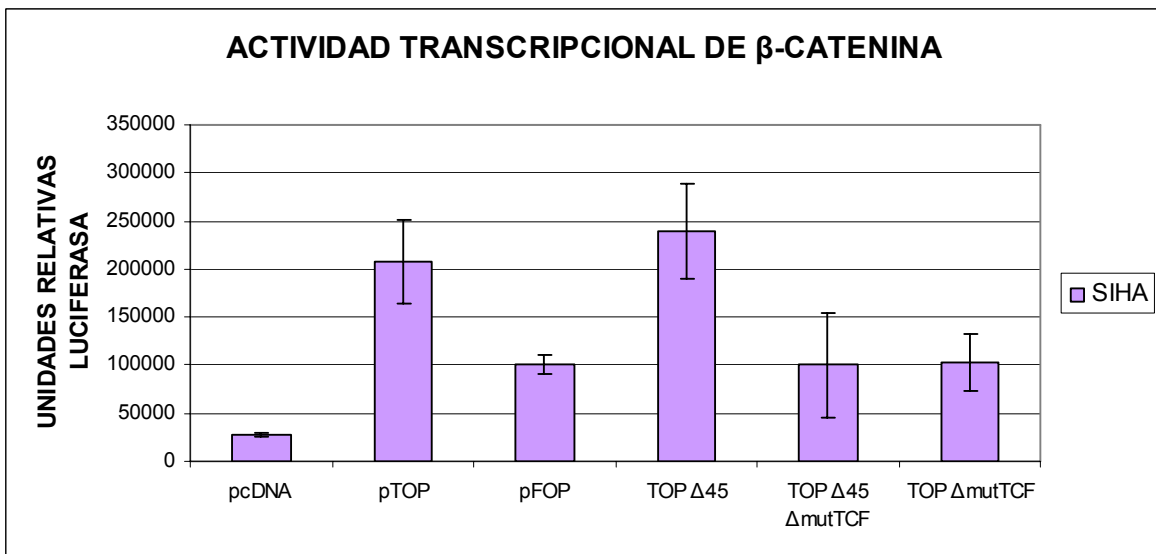


Grafica 7. Actividad Transcripcional de β -catenina en la línea celular Caski co-transfectada con los plasmidos pTOP/p Δ 45/p Δ NTCF4/pFOP, combinados según indicado en la grafica.

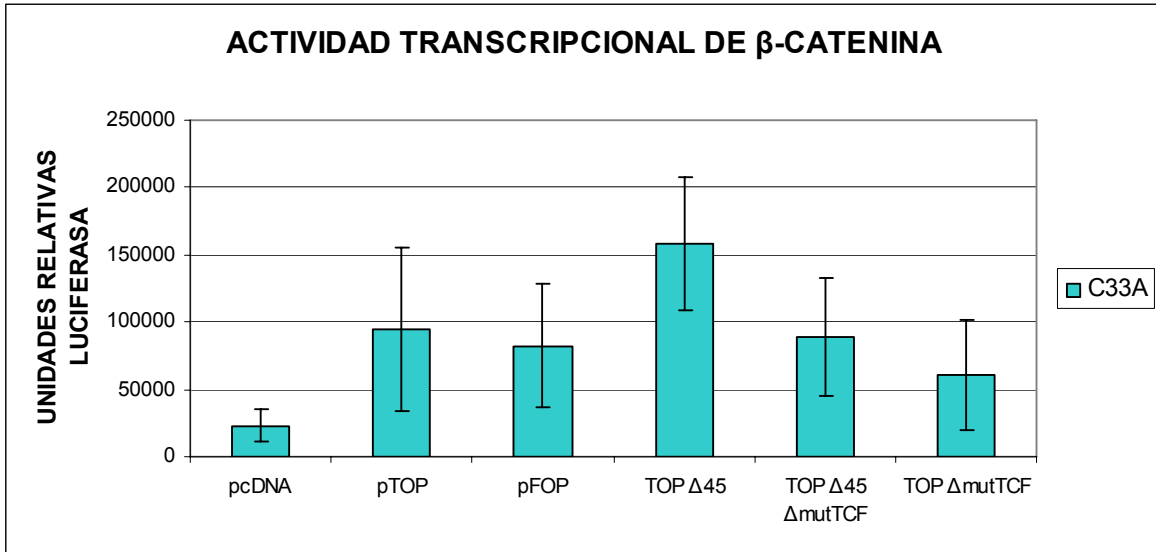


Grafica 8. Actividad Transcripcional de β -catenina en la línea celular **HeLa** co-transfectada con los plasmidos pTOP/p Δ 45/p Δ NTCF4/pFOP, combinados según indicado en la grafica.

De manera semejante las células HeLa y SiHa mostraron aumento en la actividad TOP con la sobreexpresión de de β -catenina y disminución de éste por la acción del mutante Δ NTCF4. Graficas 8 y 9.

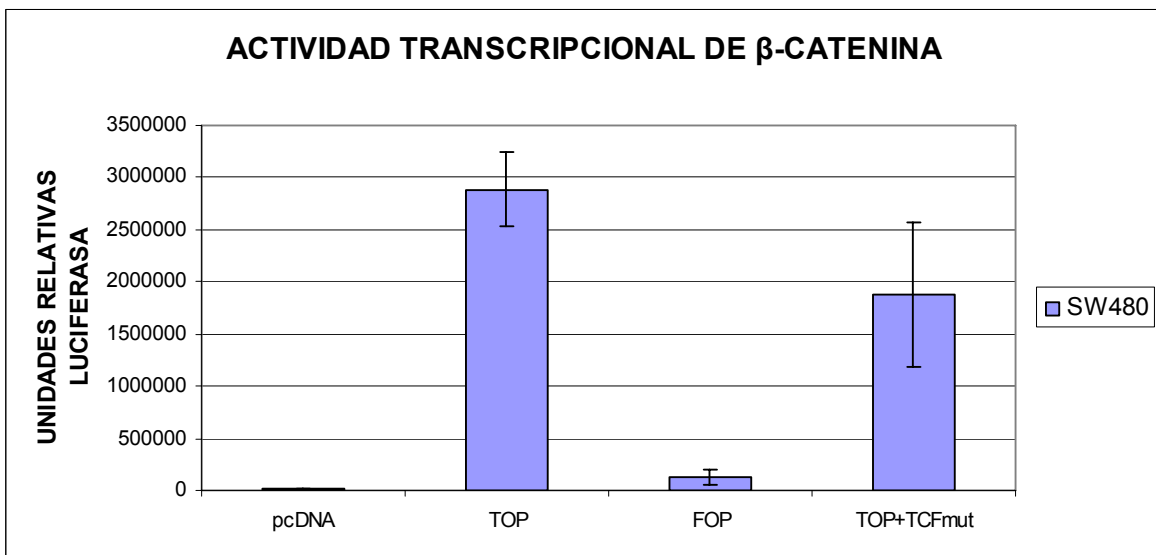


Grafica 9. Actividad Transcripcional de β -catenina en la línea celular **SiHa** co-transfectada con los plasmidos pTOP/p Δ 45/p Δ NTCF4/pFOP, combinados según indicado en la grafica.



Grafica 10. Actividad Transcripcional de β -catenina en la línea celular C33A co-transfectada con los plasmidos pTOP/p Δ 45/p Δ NTCF4/pFOP, combinados según indicado en la grafica.

En células C33A si bien la tendencia en el nivel de actividad transcripcional se asemeja a las otras líneas de CaCU, la desviación estándar fue muy grande en casi todos los casos, grafica 10. Con respecto a SW480, el mutante Δ NTCF4 logró disminuir en 30% la actividad transcripcional del complejo β -catenina-TCF/LEF, grafica 11.

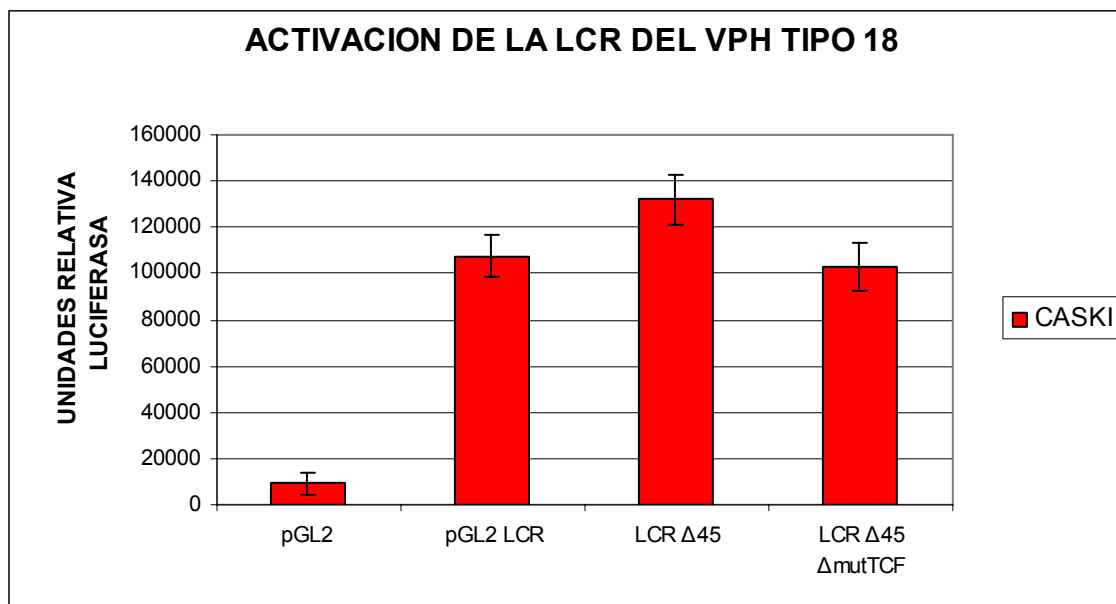


Grafica 11. Actividad Transcripcional de β -catenina en la línea celular SW480 co-transfectada con los plasmidos pTOP/p Δ 45/p Δ NTCF4/pFOP, combinados según indicado en la grafica.

7. Activación de la LCR del VPH tipo 18 por el complejo β -catenina-TCF/LEF.

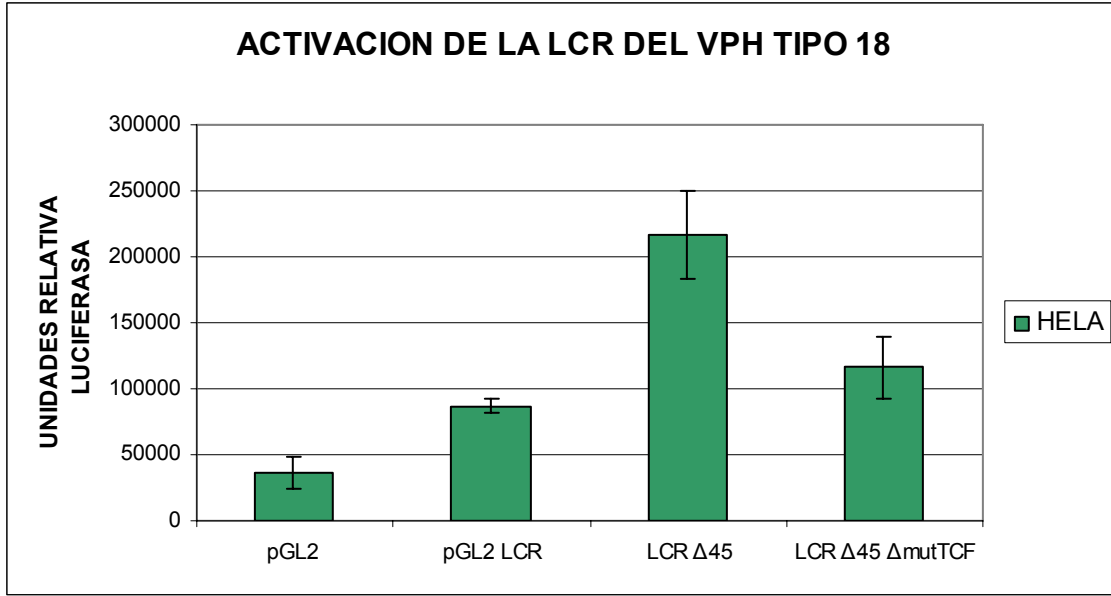
Como se mencionó en antecedentes, hay evidencia que sugiere una posible colaboración entre el complejo AP-1 y proteínas de la familia HMG para la activación transcripcional de genes blanco. Además, TCF/LEF poseen un motivo HMG y surge la pregunta si el complejo β -catenina-TCF/LEF podría colaborar con los miembros del complejo AP-1 en la activación de la LCR del VPH tipo 18.

Para analizar esta propuesta, se utilizó el plasmido pGL2LCR que fue construido por López-Saavedra A (en publicación 2008) quién amablemente nos lo donó. Este plasmido que posee el fragmento de -721 al -124 de la LCR referencia del tipo 18, en el vector base pGL2 que contiene el gen reportero Luciferasa. Se co-transfectaron las células de CaCU Caski (VPH tipo 16), HeLa (VPH tipo18) y C33A (no VPH), con los plasmidos pGL2/pGL2LCR/p Δ 45/p Δ NTCF4. Se incluyó al pRL como control interno.



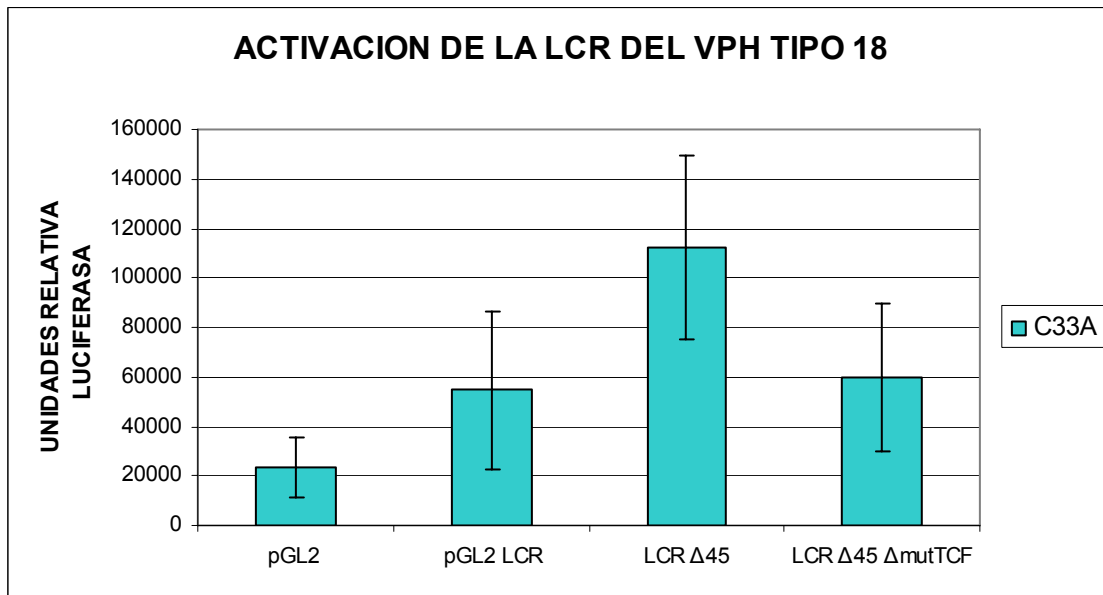
Grafica 12. Activación de la LCR en la línea celular Caski co-transfectada con los plasmidos pGL2/pGL2LCR/p Δ 45/p Δ NTCF4/, combinados según indicado en la grafica.

De manera interesante, en Caski se observa un aumento en la actividad de la LCR cuando se sobreexpresa β -catenina y el mutante Δ NTCF4, logra reprimir esta activación. Sin embargo la actividad observada con el pGL2LCR inicial ya es elevada.



Grafica 13. Activación de la LCR en la línea celular HeLa co-transfectada con los plásmidos pGL2/pGL2LCR/pΔ45/pΔNTCF4/, combinados según indicado en la grafica.

De manera semejante en HeLa, la activación de la LCR cuando se sobreexpresa β -catenina es 2.5 veces mayor que con el pGL2LCR solo, mientras que en Caski sólo aumento 1.3 veces. En Hela también el mutante Δ NTCF4 logró reprimir parte de esta activación.



Grafica 14. Activación de la LCR en la línea celular C33A co-transfectada con los plásmidos pGL2/pGL2LCR/pΔ45/pΔNTCF4/, combinados según indicado en la grafica.

La línea C33A no posee ningún VPH, pero al transfectarle el plasmido pGL2LCR hay cierto nivel de activación de la LCR, y este se ve aumentado 2 veces por la sobreexpresión de *β-catenina*. El mutante Δ NTCF4 reprime esta activación. Sin embargo la variación en los resultados es muy alta, como lo indica la desviación estándar.

Es importante destacar que HeLa posee copias del VPH tipo 18, que sugeriría que el contexto celular sería propicio para la activación de la LCR referencia del tipo 18. Sin embargo la actividad luciferasa en la misma tanto para Caski como para HeLa cuando fueron transfectadas solo por el pGL2LCR.

8. Análisis de la expresión de genes blancos del complejo *β-catenina-TCF/LEF* en líneas de CaCU.

Para determinar si el complejo *β-catenina-TCF/LEF* activa genes blanco importantes para el desarrollo o progresión tumoral, como VEGF y MMP7, se procedió a transfectar las células Caski con el plasmido p Δ 45, como se indica en métodos, y se purificó el RNAm total, para determinar por RT-PCR la activación de los genes VEGF y MMP7, como se indica en métodos.

A partir del 5 μ g de RNAm y oligo dT18 se amplificó el cDNA (figura 17, a). Se amplificó por PCR un fragmento de 260 pb del gen de β -globina como control positivo de la RT (Figura 17, b). Y se buscaron las condiciones de amplificación para los genes VEGF y MMP7. Sin embargo no se logró amplificar segmentos con el tamaño esperado para cada fragmento del cDNA buscado (figura 17, c)

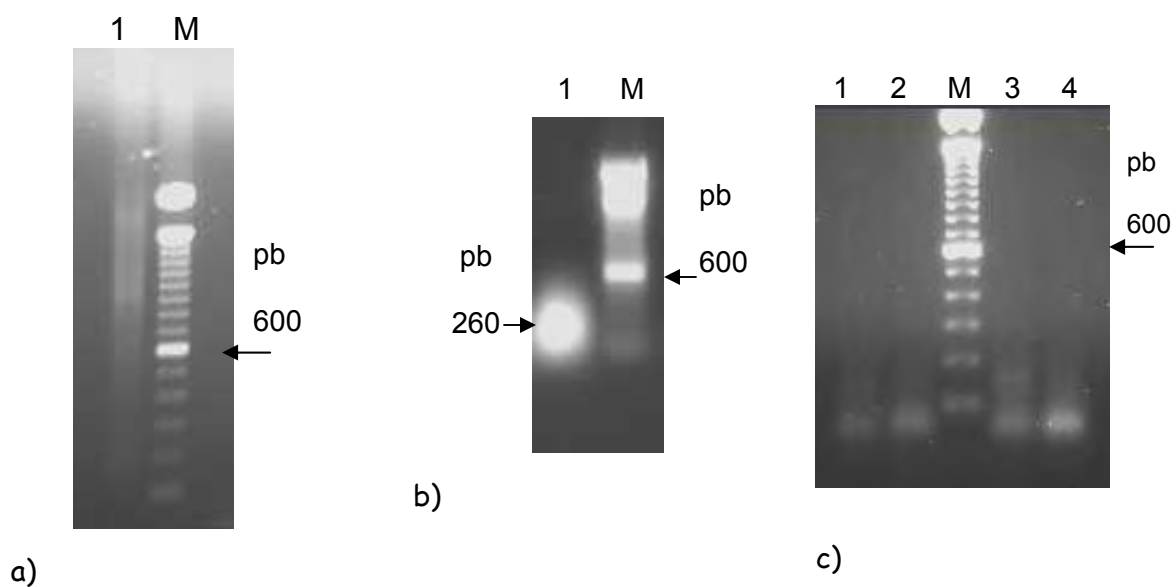


Figura 17. Análisis de la expresión de genes blancos del complejo β -catenina-TCF/LEF. a) Muestra del cDNA obtenido por RT, 1 μ l; b) Amplificación de un fragmento de 260 pb del gen b-globina por PCR como control positivo del cDNA; c) Amplificación por PCR de los genes MMP7 (1 y 2) y VEGF (3 y 5). M marcador de peso molecular de 100 pb (invitrogen)

No se logró amplificar ninguno de los fragmentos esperados para los genes MMP7 y VEGF por RT-PCR, a pesar de usar varias temperaturas de amplificación que variaron entre 50 y 65 °C, en intervalos de 2-3 °C, y de utilizar de 1 a 3 μ l de cDNA. Será importante continuar con la optimización de las condiciones de amplificación, modificando las concentraciones de Mg²⁺ y los tiempos de hibridación.

Discusión

El presente estudio permitió mostrar que en las líneas celulares provenientes de CaCU Caski, SiHA, HeLa y Calo, la β -catenina endógena forma el complejo β -catenina-Tcf/LEF y presenta actividad como factor transcripcional. Esto mediante la activación del gen reportero luciferasa controlado por una secuencia promotora mínima de la timidin cinasa (TK) y dos sitios consenso de unión al complejo β -catenina-Tcf/LEF AAGATCAAAG (Korinek et al., 1997). Lo cual se corroboró al emplear un TCF-4 mutado negativamente (Δ NTCF-4), que reprimió la activación de la transcripción del gen luciferasa, cuando las células se co-transfectaron (Lévy et al., 2002). Es importante resaltar que la línea celular C33A de CaCU, que no tiene infección de VPH, no presentó actividad transcripcional asociada al complejo β -catenina-Tcf/LEF.

Al analizar los niveles de expresión de β -catenina endógena en las diferentes líneas celulares, se pudo determinar que Caski presentó una mayor concentración de ésta proteína y justamente, Caski, también mostró la mayor actividad transcripcional asociada al complejo β -catenina-Tcf/LEF. De manera intermedia, tanto en concentración de β -catenina como en actividad del complejo β -catenina-Tcf/LEF, se situaron las líneas SiHa y HeLa.

La línea celular de cáncer de colón SW480 presentó una perfecta correlación entre la alta concentración de β -catenina y la alta actividad transcripcional del complejo β -catenina-Tcf/LEF, como ya había sido mostrado por Korinek y colaboradores (1997).

Los niveles de expresión de β -catenina observados en este estudio en las diferentes líneas celulares, difieren con respecto a la línea celular C33A y lo publicado por Pereira y colaboradores (2002), ya que ellos no logran detectar niveles de β -catenina en esa línea celular, lo que podría explicar perfectamente nuestro resultado,

con respecto a la ausencia de actividad transcripcional asociada al complejo β -*catenina-Tcf/LEF* en esta línea celular. Sin embargo, nuestros resultados muestran niveles de expresión de β -*catenina* comparables a los presentados por HeLa o SiHa, donde sí se observó actividad transcripcional. Por el momento no encontramos razones para explicar dicha discrepancia, pero es un hecho que no se observa actividad transcripcional asociada al complejo β -*catenina-TCF/LEF* en la línea C33A que carece de infección por VPH.

Por otro lado, si bien la diferencia en los niveles de actividad transcripcional entre las líneas SW480 (70) y las de CaCU (Hela 3.3, SiHa 4.4 y Caski 11) es muy elevada, en un orden de aproximadamente 7 veces. En realidad este valor puede ser relativo, ya que en células Hela se mostró que el empleo de un RNAi para β -*catenina* inhibía de manera significativa la expresión de genes como VEGF, COX2, MMP7, entre otros, lo que indicaba la importante participación de β -*catenina* en la expresión de esos genes. Además se observó que con este mismo tratamiento de RNAi, las células fueron más sensibles a apoptosis hasta en un 30% y podría relacionarse con la represión de genes como PTEN, entre otros (Huang et al., 2006).

Los niveles de expresión de TCF-4 son muy homogéneos en todas las líneas celulares, incluyendo a SW480. Lo que sugiere que esta proteína no es elemento limitante para la formación del complejo, y por consiguiente para la activación de la expresión de genes blanco.

Una vez definido que las líneas celulares de CaCU con infección de algún tipo del VPH, si presentan actividad transcripcional asociada al complejo β -*catenina-Tcf/LEF*. Se procedió a evaluar o analizar la expresión de genes blanco de este complejo, por la sobre-expresión de una β -*catenina* mutada (Lévy, et al., 2002) incapaz de ser fosforilada, y por tanto, estabilizada y translocada al núcleo, donde forme el complejo β -*catenina-Tcf/LEF* y se promueva la activación de genes. Además del empleo de un TCF-4 mutado que reprima la activación por la sobre-expresión de β -

catenina, como control de la acción de dicho complejo sobre la actividad observada (Lévy, et al., 2002).

A partir de una serie de publicaciones donde se ha mostrado la participación de proteínas de la familia HMG-I(Y) para formar enhanceosomas con miembros del complejo AP-1 en la activación de la LCR del VPH tipo 18 (Bouallaga et al., 2000); que los factores TCF/LEF pertenecen a esta familia y poseen dominios HMG (Arce et al., 2006). Además de la cooperación sinérgica entre miembros del complejo AP-1 (c-Jun) y el complejo β -*catenina*-LEF-1 en la activación del promotor del gen Matrilisina (Rivat et al., 2003), que la forma fosforilada de c-Jun interacciona con el dominio HMG-box del factor TCF4, para formar un complejo ternario c-Jun-TCF4- β -*catenina* (Abdolrahman et al., 2005; Gan et al., 2008; Hasselblatt et al., 2008). Se evaluó la activación de la LCR del VHP tipo 18 por el complejo β -*catenina*-Tcf/LEF, en las líneas portadoras de VPH, Caski (tipo 16) y HeLa (tipo 18) y en la C33A (sin VPH).

Los resultados sugieren que al sobreexpresar β -*catenina* se incrementa la activación de la LCR del VPH 18, tanto en Caski como HeLa, siendo mayor el aumento en HeLa. Y que la actividad disminuye al sobreexpresar el TCF-4 mutante negativo.

En C33A se observó la misma tendencia, sin embargo la gran variabilidad en los resultados no permiten concluir seriamente en esta línea celular.

La diferencia entre Caski y HeLa podría explicarse porque HeLa ya posee copias del VHP tipo 18 y quizás sea un contexto celular ventajoso para que la LCR que proviene del mismo tipo de VPH se active. Sin embargo, el nivel de activación de la LCR en ambas células es el mismo cuando no se sobreexpresa β -*catenina*. Además Caski presentó mayor actividad transcripcional asociada al complejo β -*catenina*-Tcf/LEF que HeLa, así que la diferencia en activación se puede asociar a otro factor que interactúe con complejo β -*catenina*-Tcf/LEF. Este factor o elemento podría ser c-Jun, ya que éste en su forma fosforilada puede participar con el complejo β -*catenina*-Tcf4 para estabilizar su unión a su propio promotor *jun1* y activar la transcripción (Abdolrahman et al., 2005). También por medio de Dvl, c-Jun puede interaccionar con el complejo β -

catenina-Tcf4 y activar *in vitro* un promotor *c-myc-luciferasa* (Gan et al., 2008). Sin embargo, al analizar la expresión de la proteína *c-Jun* en ambas líneas celulares, al parecer hay más proteína *c-Jun* en *Caski* que en *HeLa*, pero la calidad y resolución del Western blot no fue satisfactoria, lo cual no nos permite confirmar esta hipótesis.

Finalmente, la activación de la LCR puede asociarse a la acción indirecta del complejo *β-catenina-Tcf/LEF*. Es decir, por la activación de la expresión de miembros del complejo *AP-1*, como *c-Jun* y *Fra-1*, que han sido reportados como blancos del complejo *β-catenina-Tcf/LEF* en carcinomas de colon (Mann et al., 1999)

Por otro lado, se intento analizar la activación de la expresión de los genes *VEGF* y *MMP7* que ya han sido reportados como blancos del complejo *β-catenina-Tcf/LEF*, tanto en células *HeLa* (Huang et al., 2006), como en otros tipos tumorales (Brabletz et al., 1999). Sin embargo, no fue posible amplificar por PCR los segmentos esperados de los genes *VEGF* y *MMP7* a partir del cDNA obtenido por medio de Transcriptasa reversa (RT), a pesar de haber amplificado el control de *β-globina*.

Para determinar el impacto de esta alteración de la vía *Wnt* en las líneas celulares de cáncer cérvico uterino, es importante determinar los genes blancos activados por el complejo *β-catenina-Tcf/LEF*, que permitan sugerir su papel en la transformación celular, el desarrollo tumoral o la invasión y metástasis.

Uren y colaboradores (2005) mostraron que queratinocitos inmortalizados por DNA del VPH tipo 18, al ser transfectados con una *β-catenina* mutada, induce la transformación, de manera semejante que cuando se introduce el oncogen *smt* del *SV40*. Además el estudio realizado por Rodríguez-Sastre y colaboradores (2005) mostró que en un gran numero (85%) de tumores del cuello uterino, *β-catenina* se encuentra estabilizada en el citoplasma, y que esta misma deslocalización se observaba en alrededor del 50% de la lesiones de bajo grado. Sugiriendo que esta alteración en la vía *Wnt* puede ser un evento temprano en el desarrollo tumoral. Además de los estudios realizados por Huang y colaboradores (2006), donde en células *HeLa* la inhibición de la expresión de *β-catenina* con un *RNAi* reprimió a su vez

la expresión de genes asociados a la invasión tumoral como VEGF y MMP7, además de hacer más sensibles a estas células a apoptosis, aun cuando la actividad TOP/FOP fue de un nivel bajo, de 5.0 veces, valor semejante al encontrado en el presente trabajo.

Conclusiones

- El sistema TOP/FOP permitió determinar que las líneas celulares Caski, SiHa, Calo y HeLa presentan una actividad transcripcional baja asociada al complejo *β-catenina-TCF/LEF*, y al compararla con la actividad obtenida en células SW480.
- El nivel de expresión de *β-catenina* en las diferentes líneas celulares se puede asociar con el nivel de actividad transcripcional del complejo *β-catenina-TCF/LEF*.
- La proteína TCF-4 se expresa de manera muy similar en todas las líneas celulares, por lo cual, no es el regulador de las diferentes actividades observadas entre líneas.
- La expresión de la proteína c-Jun fue muy variable en las diferentes líneas celulares, por lo cual es necesario verificar esos niveles de expresión y entonces tratar de asociarlos a las diferencias en los niveles de actividad transcripcional asociado al complejo *β-catenina-TCF/LEF* entre las líneas celulares.
- El complejo *β-catenina-TCF/LEF* está involucrado en la activación de la LCR del VPH tipo 18. Y esta activación puede ser de manera directa o indirecta.

Referencias

Aberle H., Bauer A., Stapper J., Kispert A. y Kemler R. 1997. β -catenin is a target for the ubiquitin-proteosome pathway. *EMBO Journal*. 16:3797-3804.

Aoki M., Sobek V., Maslyar J. D., Hecht A. y Vogt K. P. 2002. Oncogenic transformation by β -catenin: deletion analysis and characterization of selected target genes. *Oncogene*. 21:6983-6991.

Akiyama, T. 2000 Wnt/beta-catenin signaling. *Cytokine Grow Factor Review*. 11:273-282.

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. y Watson D. J. 1996. *Biología molecular de la célula*. Tercera edición. Ed. Omega. Barcelona España. 1387.

Araki Y., Okamura S., Hussain P. S., Nagashima M., Peijun H., Shiseki M., Miura K. y Curtis H. C. 2003. Regulation of Cyclooxygenase-2 Expression by the Wnt and Ras Pathways. *Cancer Research*. February. 63:728-734.

Barker N., Morin P. J. y Cleavers H. 2000. *The Yin-Yang of TCF/ β -catenin Signaling*. *Advances in Cancer Research*. 77:1-24.

Barolo S. y Posakony W. J. 2002. Three habits of highly effective signaling pathways: principles of transcriptional control by developmental cell signaling. *Gen & Development* 16:1167-1181.

Berumen J. et al. 1997. Epidemiología molecular de cánceres de alta incidencia. *Gaceta Medica de México*. Vol. 133. Suplemento 1. 35-41.

Bouallaga I., Teissier S., Yaniv M. And Thierry F. 2003. HMG-I(Y) and the CBP/p300 coactivadores are essential for Human Papilomavirus Type 18 Enhanceosome transcriptional Activity. *Molecular and Cell Biology*. 7:2329-2340.

Brabletz T., Jung A., Dag S., Hulbek F. y Kirchner T. 1999. β -catenin Regulates the Expression of the Matrix Metalloproteinase-7 in Human Colorectal Cancer. *American Journal of Pathology*. 155:4.

Dennis S., Aikawa M., Szeto W., d'Amore P. A. y Papkoff J. 1999. Asecreted Frizzled related protein, FrzA, selectively associates with Wnt-1 protein and regulates Wnt-1 signaling. *Journal of Cell Science*. 112:3815-3820.

Doble W. B. y Woodgett R. J. 2003. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *Journal of Cell Science*. 116:1175-1186.

Fernhead S. Incola, Britton P. M. y Bodmer W. F. 2001. The ABC of APC. *Human Molecular Genetics*. 10:721-733.

Griffiths, Anthony J. F., Miller Jeffrey H., Suzuki, David T., Lewontin C. Richard y Gelbart M. William. 2002. *Genética, Séptima Edición*. Ed. McGraw Hill. Madrid, España. P.p 860.

He, T.C. 1998. Identification of c-myc as a target of the APC pathway. *Science*, 281:1509-1512.

Haeri R., Douglas W. G., Craing B. B., James A. P. y Jeffrey A. D. 2001. Supression of β -catenin inhibits the neoplastic Growth of APC-Mutant Colon Cancer Cells. *Cancer Research*. 61:6563-6568.

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

Hurlstone A. y Clevers H. 2002. T-cell factors: turn-ons and turns-offs. *The EMBO Journal*. 21:2303-2311.

Ilyas M. y Tomlinson M.P.I. 1997. The interactions of APC, E-Cadherin and β -Catenin in Tumor Development and Progression. *Journal of Pathology*. 182:128-137.

Kikuchi A. 2003. Tumor formation by genetic mutations in the components of the Wnt signaling pathway. *Cancer Science*. 94:225-229.

King K. L. y Cidlowski J. A. 1998. Cell cycle regulation and apoptosis. *Annual Review of Physiology*. 60:601-617.

Kishidra S., Yamamoto H., Ikeda S., Kishida M., Sakamoto I., Koyama S. y Kikuchi A. 1998. Axin, a Negative Regulator of the Wnt Signaling Pathway, Directly Interacts with Adenomatous Polyposis Coli and Regulates the Stabilization of β -Catenin. *The Journal of Biological Chemistry*. 273:10823-10826.

Klung S. William y Cummings R. Michael. 1999. *Conceptos de Genética*. Ed. Prentice Hall. Madrid España. P.p. 814.

Korinek V., Barker N., Morin J. P., Van W. D., Weger R., Kinzler W. K., Vogelstein B. y Clevers H. 1997. Constitutive Transcriptional Activation by a β -catenin-Tcf Complex in APC^{-/-} Colon Carcinoma. *Science*. 275 :1784-1787.

Lévy L., Neuveut C., Renard C. A., Charneau P., Branchereau S., Gauthier F., Tran J. Nhieu V., Cherqui D., Petit-Bertron A. F., Mathieus D. y Annick M. Buendia. 2002. Transcriptional Activation of interlekin-8 by β -catenin-Tcf4. *The Journal of Biological Chemistry*. 277:42386-42393.

Lewin B. 2000. *GenesVII*. USA, NY. Oxford University Press. 938-940.

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., y Hanski C. 1999. Target genes of β -Catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proceeding of the National Academy of the Science of the United States of America*. 96:1603-1608.

Millar, J.R., Hocking, A.M., Brown, J.D. y Moon, R.T. 1999. Mechanism and function of signal transductions by the Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca²⁺pathways. *Oncogene*. 18:7860-7872.

McCormick F. 1999. Signalling networks that cause cancer. *Trends in Cell Biology*. 24:53-56.

Morin J. P. 1999. β -catenin signaling and cancer. *BioEssays*. 21:1021-1030.

Munger K. y **Howley P. M.** 2002. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Research*. 89:213-28.

Nateri A. S., **Spencer-Dene B.** y **Behrens A.** 2005. Interaction of phosphorylated c-Jun with TCF4 regulates intestinal cancer development. *Nature*. 437:281-285.

Nusse R. 1999. Wnt targets: repression and activation. *Trends in Genetics*. January. 15:1-3

Orsulic, S., **Huber, O.**, **Aberle, H.**, **Arnold, S.** y **Kemler, R.** 1999. E-cadherin binding prevent β -catenin nuclear localization and β -catenin/LEF-1 mediated transactivation. *Journal of Cell Science*. 112:1237-1245.

Hasselblatt P., **Grez L.**, **Kudo H.**, **Viniegra J. G.** y **Wagner E. F.** 2008. The role of the transcription factor AP-1 in colitis-associated and beta-catenin dependent intestinal tumorigenesis in mice. *Oncogene*. 89:213-28.

Pereira-Suárez A. L., **Meraz M. A.**, **Lizano M.**, **Estrada-Chávez C.**, **Hernández F.**, **Olivera P.**, **Pérez E.**, **Padilla P.**, **Yaniv M.**, **Thierry F.** y **García-Carrancá A.** 2001. Frequent Alterations of the β -Catenin Protein in Cancer of the Uterine Cervix. *Tumor Biology*. 23:45-53.

Penton A., **Wordarz A.** y **Nusse R.** 2002. A mutational Análisis of dishevelled in Drosophila Defines Novel Domains in the Dishevelled Protein as Well as novel suppressing Alleles of axin. *Genetics*. 161:747-726.

Polakis, P. 1999. The oncogenic activation of beta-catenin. *Current Opinion in Genetics & Development*. 9:15-21.

Polakis P. 2000. Wnt signaling and cancer. *Genes and Development*. 14:1837-1851.

Povelones M. y Nusse R. 2002. Wnt signaling sees spots. *Nature Cell Biology*. 4:249-250.

Rivat C., Le Floch N., Sabbah M., Teyrol I., Redeuilh G., Bruyneel E. 2003. Synergistic cooperation between the AP-1 and LEF-1 transcription factors in activation of the matrilysin promoter by the src oncogene: implications in cellular invasion. *The Federation of American Societies of Experimental Biology Journal*. 17:7121-7123.

Roth J. M., Johnson L. L., Quon-Hang W., Ahnen J. D., Iwamoto M., Dawsey M. S., Taylor R. P. y Huppi K. 2005. β -Catenin Splice Variants and Downstream Targets as Markers for Neoplastic Progression of Esophageal Cancer. *Genes, Chromosomes and Cancer*. 44:423-428.

Rubinfeld B., Albert I., Porfiri E., Fiol C., Munemitsu S. y Polakis P. 1996. Binding of GSK3 β to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly. *Science*. 272:1023-1026.

Rubinfeld B., Albert I., Porfiri E., Munemitsu S. y Polakis P. 1997. Loss of beta-catenin regulation by the APC tumor suppressor protein correlates with loss of structure due to common somatic mutations of the gene. *Cancer Research*. 57:4624-4630.

Rui-Hong C. y McCormick F. 2001. Selective Targeting to the Hyperactive β -catenin/T-Cell Factor Pathway in Colon Cancer Cells. *Cancer Research*. 61:4445-4449.

Shinohara A., Yokoyama Y., Wan X., Takahashi Y., Mori Y., Takami T., Shimokawa K. y Tamaya T. 2001. Cytoplasmic/nuclear Expression without Mutation of Exon 3 of the β -Catenin Gene Is Frequent in the Development of the Neoplasm of the Uterine Cervix. *Gynecologic Oncology*. 82:450-455.

Takashi M., Fujita M., Furukawa Y., Hamamoto R., Shimokawa T., Miwa N., Ogawa M. y Yusuke N. 2002. Isolation of Novel Human Gene, APCDD1, as a Direct Target of the β -Catenin/T-Cell Factor 4 Complex with Probable Involvement in Colorectal Carcinogenesis. *Cancer Research*. 15:5156-5656.

Ueda M., Gemill R. M., West J., Winn R., Sugita M., Tanaka N., Ueki M. y Drabking H. A. 2000. Mutation of β - and γ -catenin genes are uncommon in human lung, breast, kidney, cervical and ovarian carcinomas. *British Journal of Cancer*. 85:64-68.

Üren A., Fallen S., Yuan H., Usubütü A., Türkan K., Schlegel R. y Toretsky A. J. 2005. Activation of the Canonical Wnt Pathway during Genital Keratinocyte Transformation: A Model for Cervical Cancer Progression. *Cancer Research*. 6:6199-6206.

Willert K. y Nusse R. 1998. β -catenina: a key of Wnt signaling. *Current Opinion in Genetics & Development*. 8:95-102.

Wordarz A. y Nusse R. 1998. Mechanisms of wnt signaling in Development. *Annual Review of Development*. 14:59-88.

Xiao-qing G., Ji-yong W., Ying X., Zhi-li W., Yi-ping L. y Lin L. 2008. Nuclear Dvl, c-Jun, β -Catenin and TCF form a complex leading to stabilization of β -Catenin-TCF interaction. *The Journal of Cell Biology*. 180:1087-1100.

Yochum G. S., McWeeney S., Rajaraman V., Cleland R., Peters S. y Goodman H. R. 2006. Serial analysis of chromatin occupancy identifies β -catenin target genes in colorectal carcinoma cells. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 104:3324-3329.

Yokoya F., Imamoto N., Tachibana T. y Moneda Y. 1999. β -Catenin Can Be Transported into the Nucleus in a Ran-unassisted Manner. *Molecular Biology of the Cell*. 10:1119-1131.

Zhang X., Gaspard P. J. y Cheng C. D. 2001. *Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor by the Wnt and K-ras Pathways in Colonic Neoplasia*. *Cancer Research*. 61: 6050-6054.

Zur Hausen H. 2000. Papillomaviruses Causing Cancer: Evasion From Host-Cell Control in Early Events in Carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*. 92:690-698.

Zur Hausen H. 2002. Papillomaviruses and cancer: From basic studies to clinical application. *Nature Reviews*. 2:342-350.

Anexo

Medio de cultivo líquido LB

Bactotripton	20.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
NaCl	0.5 g

Resuspender en 800 ml de agua bidestilada y ajustar el pH a 7.5 con KOH. Posteriormente aforar a 1 litro con agua bidestilada y esterilizar en autoclave (se puede guardar por una noche a 4°C y después se esteriliza).

Medio de cultivo sólido LB

Preparar las cajas petri de plástico (10cm de diámetro) con medio LB-Agar de la siguiente forma:

Bactotripton	10.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
NaCl	10.0 g
Bacto-agar	15.0 g

Resuspender en 800 ml de agua y ajustar el pH a 7.5 con NaOH 10 M. Aforar a 1 litro con agua bidestilada y esterilizar inmediatamente en autoclave. Enfriar a aproximadamente 45°-50°C y agregar el antibiótico de interés.

Reactivos para la minipreparación de plásmidos

Solución I

EDTA pH 8	1 mM
Tris/HCl pH 8	10 mM

Esterilizar por filtración (membrana de 0.22 µm) y almacenar a 4°C.

Solución II

NaOH	200 mM
SDS	1 %

Preparar esta solución justo antes de usarla, ya que tiende a formar precipitados, por lo que se recomienda preparar solamente la que se vaya a utilizar en ese momento.

Solución III

Acetato de potasio 5 M	60 ml
Acido acético glacial	11.52 ml

Aforar a 100 ml con agua bidestilada estéril. El pH de la solución debe de quedar a 5.5 por lo que se recomienda preparar el acetato de potasio y medir el pH conforme se le agrega el ácido acético glacial. Guardar a 4°C muy bien tapado para evitar que se oxide.

PBS

	1X	5X
NaCl	8.0 g	40 g
KCl	0.2 g	1.0 g
Na ₂ HPO ₄	1.15 g	5.75 g
KH ₂ PO ₄	0.27 g	1.35 g

Posteriormente ajustar el pH a 7.3 con hidróxido de sodio 10mM. Esterilizar por filtración en la campana por medio de filtros con un poro de 0.22 µm.

Solución amortiguadora (RIPA)

Tris-HCl	50 mM
NaCl	150 mM
NP40	1.0 %
Desoxicolato de Sodio	0.5 %
SDS	0.1 %

Lizosima

Tris-HCl pH 8	10 mM
---------------	-------

Preparar en el momento y ajustar el pH a 8.

Para la actividad luciferasa

Tris pH 8 2M	25µl
MgCl ₂ 25mM	640 µl
EDTA 0.5M	4 µl
Tritón	100 µl

Glicerol	300 μ l
BSA 10 mg/ml	1 ml
DTT 200mM	10 μ l
PMSF 100mM	80 μ l

- **Transformación de bacterias con DNA plasmídico**

Utilizar de 1-3 μ l por cada plásmido y emplear 200 μ l de bacterias DH5 α competentes. Después del choque térmico, incubar las células con medio LB a 37°C con agitación moderada (150 rpm) por 45 minutos. Posteriormente, cultivar las células en placas con medio LB sólido en presencia del antibiótico de selección.

Plásmido	GFP	RL	TOP	FOP	Δ TCF	TCF	Δ 45
Antibiótico utilizado	Kan 50 μ g/ml	Amp 100 μ g/ml	Amp 100 μ g/ml	Amp 100 μ g/ml	Amp 100 μ g/ml	Amp 100 μ g/ml	Amp 100 μ g/ml

Kan= Kanamicina

Amp= Ampicilina

- **Cultivo**

Después de la selección de las clonas positivas, realizar la propagación de las bacterias por cultivos en medio LB de 500 ml a 1 litro, dependiendo del plásmido. Posteriormente, iniciar la purificación de los plásmidos mediante lisis alcalina.

Minipreparación de plásmidos

Tomar 1.5ml de cada tubo de ensaye de cada uno de los diferentes plásmidos. Transferir a un tubo de 1.5 ml y centrifugar a 14 000 r.p.m. durante cinco minutos para empaquetar las células. Eliminar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 100 μ l de la solución I. Mezclar vigorosamente para homogenizar la pastilla correctamente. Agregar 200 μ l de la solución II y agitar ligeramente, para posteriormente adicionar la solución III. Agitarse suavemente por inversión unas seis veces. Centrifugar 5 minutos a velocidad máxima (14 000 rpm) y recuperar el sobrenadante en un tubo nuevo, para finalmente agregar 300 μ l de isopropanol. Agitar vigorosamente. Centrifugar nuevamente por 5 minutos a velocidad máxima y eliminar el sobrenadante. Resuspender la pastilla en 50 μ l de agua y agregar 40 μ l de LiCl 5 M. Agitar e incubar a -20°C por 30 minutos. Centrifugar por cinco minutos a velocidad máxima y eliminar el sobrenadante. Lavar la pastilla con etanol al 70% y dejar secando por cinco minutos al aire. Resuspender el DNA plasmídico que se

extrajo en 50 μ l de agua estéril, esto con el objetivo de hacer digestiones y saber si se tenían bacterias con el plásmido deseado.

Digestiones enzimáticas

Para llevar a cabo las digestiones utilizar 0.5 unidades de enzima en un volumen total de reacción de 10 μ l. Una unidad corresponde a la cantidad requerida para digerir 1 μ g de DNA en una hora a 37°C en un volumen total de reacción de 50 μ l. Cada volumen de la reacción total de 10 μ l contiene también BSA (0.1 μ l) y amortiguador de pH (el que corresponde a cada enzima y con un volumen de 1 μ l). Realizar la cuantificación del DNA a digerir (colocándose 0.5-4 μ l) y aforar a 10 μ l con agua inyectable.

Realizar la preparación de medio LB para cultivos de 1 litro.

Maxipreps

Centrifugar las células procedentes de los cultivos de 1 litro a 5 000 rpm durante 20 minutos y se desecho el sobrenadante. A la pastilla se le resuspendió en la solución I. Por cada 1000 ml de cultivo se agregaron 36 ml de la solución I.

Posteriormente se colocaron de 2 ml de lizosima (10mg/ml en 10mM Tris-Cl pH8) Esta solución se preparo al momento.

Se agregaron 80 ml de la solución II para mezclarse posteriormente el tubo por inversión, dejándose incubar por aproximadamente 10 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 40 ml de la solución III fría y se agito igualmente el tubo por inversión dejándose incubar en hielo durante 10 minutos. Posteriormente se centrifugo a 5000 rpm por 30 min a 4°C y se filtro el sobrenadante con el uso de gasas. Se eliminó el precipitado blanco.

Se adicionaron 0.6 volúmenes de isopropanol. Se mezclaron con ayuda del vortex y se dejaron incubar por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugaron a 5000 rpm por un tiempo de 20 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se lavaron los tubos con etanol al 70% y de dejo secar por aproximadamente 15 minutos. Finalmente se resuspendió la pastilla donde estaba contenido el DNA plasmídico (DNAP) en 1 ml de agua inyectable. El DNAP extraído fue purificado mediante cloruro de cesio.

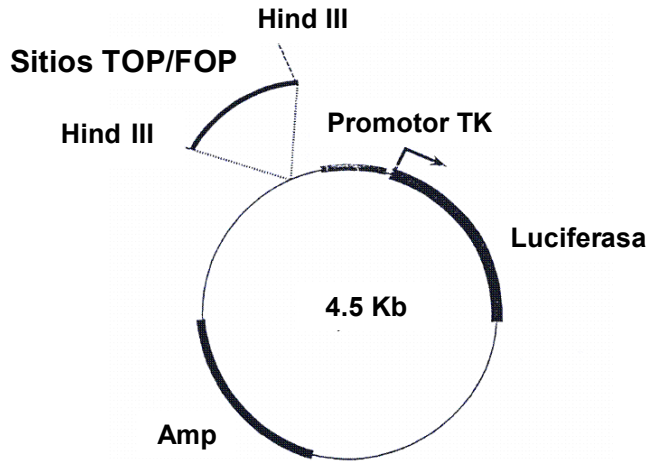


Figura 18. Plásmido TOP/FOP.

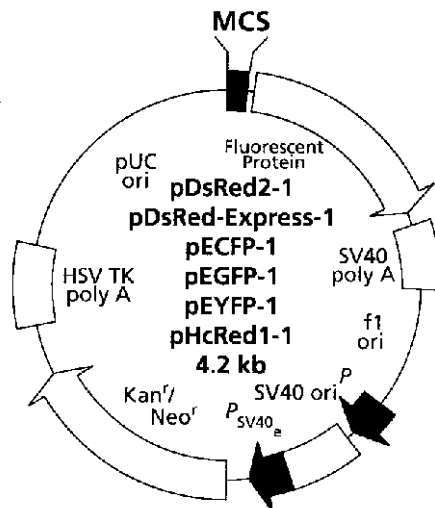
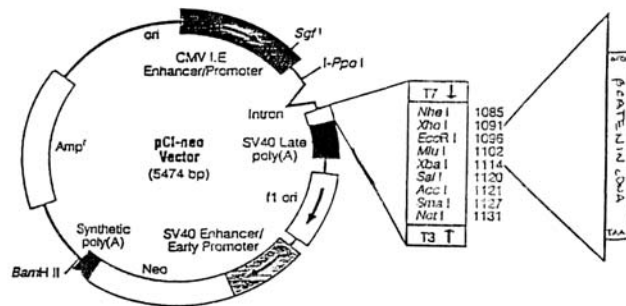


Figura 19. Plásmido GFP.

pCI-NEO-βcateninxl
S33Y Δ45



Serina → Treonina

Figura 20. Plásmido Δ45.

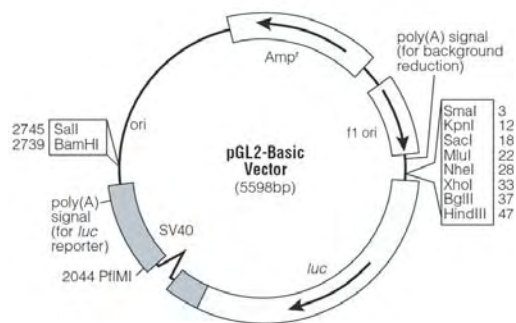


Figura 21. Plásmido con clonación de la LCR (plásmido pGL2-basic).

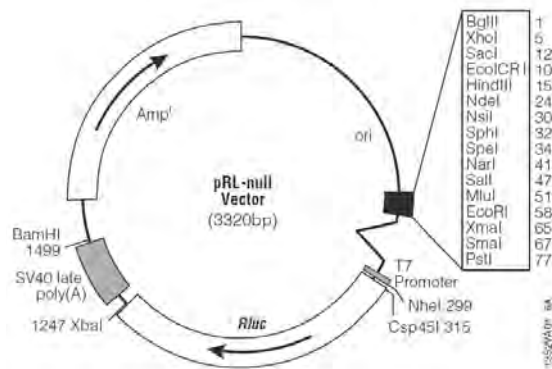


Figura 22. Plásmido Renila (plásmido pRL-null).

Actividad Luciferasa

Preparar los extractos totales de proteínas de las diferentes líneas celulares y utilizar la solución de lisis pasiva del Kit "Dual Luciferase Reporter System" de Promega. Suplementar ambas soluciones con inhibidores de proteasas (cocktail complete de Boeringer Mannheim) y fosfatasa (NaF y Na₃VO₄).

Lavar las células con PBS. Retirar por completo el PBS y adicionar 100 µl de la solución de lisis. Recuperar los extractos celulares con gendarmes. Transferir los extractos a tubos Eppendorf. Centrifugar la solución 1 min a velocidad máxima. Recuperar el sobrenadante y mantenerlo en hielo para la lectura.

Para la lectura, emplear 100 µl de la solución con el sustrato de luciferasa -LAR (luciferin) del kit "Luciferase Assay System" o "Dual Luciferase Reporter System" ambos de Promega, y 20 µl del extracto proteico. Agitar suavemente con la ayuda de la micropipeta. Realizar la lectura en un luminómetro con 10 segundos de

exposición por muestra. Colocar el reactivo para renilla según se menciona en el "Dual Luciferase Reporter System". Realizar la lectura en un luminómetro con 10 segundos de exposición por muestra (Figura 9)

El gen luciferasa (*luc*) es un gen reportero utilizado en plantas, bacterias y células de mamíferos. Este gen codifica para una proteína llamada luciferasa que tiene un peso molecular de 62 kDa. La sensibilidad del gen *luc* tiene la capacidad de detectar bajos niveles de expresión, ya que 0.02 pg de luciferasa son suficientes para una buena medición en un luminómetro. La molécula de **luciferina** se combina con el **adenosin trifosfato (ATP)**. Esta reacción tiene lugar en la superficie de la enzima luciferasa. El resultado es **adenilato luciferil**, que permanece unido a la enzima. El oxígeno se combina más rápidamente con el adenilato luciferil formando la oxiluciferina, con lo que se produce **adenosin monofosfato (AMP)** en una combinación química que produce luz con una longitud de onda de emisión de 560 nm.

Estas dos fases de la reacción química se producen a mayor velocidad que la combinación simple y directa de luciferina con el oxígeno. La luz producida por esta reacción química es de un color como amarillento o verde rojizo (Figura 23).

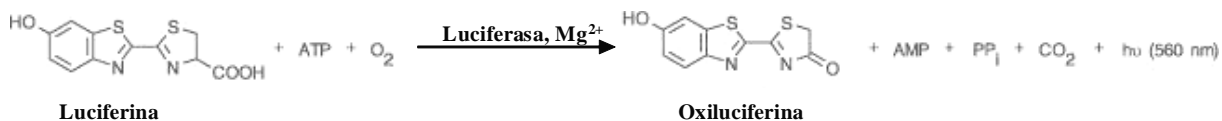


Figura 23. Reacción Luciferasa. La luciferina reacciona con ATP y oxígeno catalizada por la luciferasa produciendo AMP, pirofosfato, CO₂ y luz.

Extracción de RNA

Todo el procedimiento debe de realizarse con guantes y a temperatura ambiente. Limpiar bien el área de trabajo. Todas las centrifugaciones deben de realizarse entre 20-25 °C.

Determinar el volumen de Buffer RLT a usar, para adicionar el β-Mercaptoetanol (10μl β-Mercaptoetanol por 1ml de RLT).

Eliminar el medio de cultivo.

Adicionar 600μl de buffer RLT-β-Mercaptoetanol (para cajas de 6-10cm³). Recolectar las células con un gendarme y transferir el lisado de un tubo normales estériles 1.5ml. Mezclar con Vortex. Homogeneizar la muestra. Vortex (3 ciclos de 1 minuto) con reposos intermedios de 1 minuto.

Adicionar al lisado homogeneizado, un volumen (600μl-p60 ó p100) de EtOH al 70%. Mezclar con Pipeta. Pasar en dos tandas de 700μl el lisado (incluyendo el precipitado) dentro de la RNeasy colum, la cual ya posee un tubo recolector. Centrifugar por 15 segundos ~10 000rpm (8000g). Descartar el filtrado.

Adicionar 700 μ l de buffer RW1 a la RNeasy colum. Cuntrifugar por 15 segundos a 10000 rpm para lavar la columna. Descartar el filtrado Transferir la columna a un nuevo tubo de "recolección del Kit" y adicionar 500 μ l del buffer RPE a la columna. Centrifugar por 15 segundos a 10000 rpm para lavar la columna. Eliminar el filtrado. Adicionar 500 μ l del buffer RPE a la columa y centrifugar por 2 minutos a 10000rpm para secar la columna. Eliminar el filtrado. Centrifugar nuevamente por 1 minuto para eliminar toda traza de buffer anterior. Transferir la columna a tubos de 11.5ml (del Kit) y adicionar 50 μ l de RNase Free H₂O a la columna. Tapar el tubo y centrifugar por 1 minuto a 10000rpm. Guardar a -70 °C hasta uso. Cuantificar el RNA.

RT-PCR

Una vez que se realizo la extracción de RNA se procede a llevar a cabo la RT-PCR agregando lo siguiente:

5 μ g de RNA

0.5 μ l de Random Primer (3 μ g/ μ l)

4.5 μ l de Agua-DEPC

Se incuba el mix durante 5 minutos a 70°C y se pasa en hielo.

Adicionar lo siguiente:

4 μ l 5x Firsth Strand buffer

2 μ l 10mM dNTPs

20 Unidades de Inhibidor de Ribonucleasa

Agua-DEPC hasta completar 18 μ l

Incubar 5 minutos a 37°C

Agregar:

40 Unidades de M-MuLV RT (fermentas).

Incubar 60 minutos a 37 °C y pasar la reacción 10 minutos a 70°C

Congelar o pasar 2 μ l para PCR.

PCR

La amplificación de segmentos de los genes VEGF y MMP7, se realizó a partir del cDNA amplificado por RT y el empleo de los oligonucleotidos mencionados en Materiales. A continuación se hace mención de las concentraciones utilizadas por reacción.

cDNA	1.0 μ l
Buffer	0.5 μ l
MgCl ₂	0.25 μ l
dNTP [10mM]	0.07 μ l
Taq [1U]	0.03 μ l
H ₂ O	1.0 μ l
Se colocaron 2pmol de cada oligonucleótido	

Extracción de Proteínas Totales

Reactivos:

Solución amortiguadora RIPA:

Tris-HCl 50mM

NaCl 150mM NP40 1

Deoxicolato de sodio 0.5%

SDS al 0.1%

Cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasa.

Eliminar el medio de cultivo de las cajas. Lavar las células dos veces con 2ml de PB S. Colocar las cajas en un baño con hielo. Adicionar 300 μ l del buffer RIPA + cóctel de inhibidores, que deberá estar frío. Raspar con un gendarme la superficie de cada caja. Recuperar las células en un tubo eppendorf

Incubar durante 20 minutos en hielo. Centrifugar a 12,000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C. Retirar el sobrenadante que contiene tanto a las proteínas del citoplasma como nucleares. Los extractos pueden ser almacenados a -70°C.

El siguiente paso consiste en cuantificar el contenido de proteínas ya sea por el método de Bradford o por el ensayo DC de BioRad.

Cuantificación de Proteínas. (kit BSA Protein Assay, PIERCE)

Preparar los tubos con las diferentes concentraciones para la curva standart de BSA.

Considerar que las muestras con sólo 5µl (extractos de transfecciones), se les deberá agregar 5µl de RIPA para alcanzar un volumen final de 10µl.

Por consiguiente la proteína estará en buffer RIPA pero diluido 1:1 con agua. Es importante diluir el BSA para la curva. Por tanto el diluyente usado para la curva estandar debe de contener 50% de RIPA y 50% de agua. Hacer los siguientes tubos con sus respectivas diluciones:

Tubo	[BSA] µg/ml
A	1,500
B	1,000
C	750
D	500
E	250
F	125
G	25
H	0

Preparar la solución WR (Working Reagent) en función del número de muestras y estándar a cuantificar. Para la solución WR, se mezclan 50 partes del BSA Reagent A con 1 parte del Reagent B (50:1 ; Reagent A:B), mezclar bien. Preparar para la curva de BSA cada concentración por duplicado.

Preparar las muestras problema (dependerá del volumen total del extracto). Pasar las soluciones (volumen final de 10µl) a una placa de 96 pozos. Adicionar 200µl del WR a cada pozo. Agitar durante 30 segundos.

Cubrir con parafilm los pozos y después con papel aluminio. Incubar a 37°C durante 30 minutos. Dejar la caja a T.A. por 5 minutos.

Leer la absorbancia a 562nm (entre 540-590nm).

WESTERN BLOT

Realizar el western blot empleando anticuerpos monoclonales contra β -catenina (Farmigen) y α -actina y dos policlonales contra Tcf y c-Jun (Santa Cruz).

Para este análisis, se prepararon los extractos totales de proteínas de las diferentes muestras, utilizando la solución de lisis RIPA suplementada con inhibidores de proteasas (cocktail complete de Boeringer Mannheim) y fosfatasa (NaF y Na₃VO₄).

Lavar las células con PBS, después adicionar 100 µl de la solución de lisis y recuperar las células con gendarmes para transferirse a tubos Eppendorf. Centrifugar la

solución 1 min a velocidad máxima. Recuperar y alicuotar el sobrenadante para su posterior cuantificación y uso. Almacenar a -70°C para su conservación.

Utilizar $15\ \mu\text{g}$ de proteínas totales por muestra para su separación en un gel de poliacrilamida-SDS. Correr el gel a 100 volts con un amperaje de 30mA durante aproximadamente 2 horas. Separar por electroforesis las proteínas y transferir a una membrana de Immobilon (de Micropore).

La inmunodetección se realizó de la siguiente manera:

Bloquear con una con una solución TBS con Tween al 0.5% y 4% de leche en polvo por 30 min. Adicionar el anticuerpo primario contra β -catenina, α -actina, Tcf y c-Jun. Utilizarse la siguiente relación 1/2000, 1/2000, 1/500 y 1/1500 respectivamente. Utilizar una solución TBS-Tween al 0.5%. Dejar incubar por 12 horas a 4°C . Emplear el anticuerpo secundario (anti-ratón y anti-mouse) acoplado a la peroxidasa. En este caso emplear una relación de 1/5000 en TBS-Tween al 0.5%. Incubarse durante 1 hora a temperatura ambiente. Revelar mediante el kit ECL de Amersham Pharmacia Biotech.