



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DEL CANAL DE
POTASIO ÉTER A GO-GO 1 POR LA PROSTAGLANDINA E₂ EN
CÉLULAS DE CÁNCER CERVICAL**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

DAVID ARTEAGA DURÁN



MÉXICO, D.F.

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: J. Eleazar Martínez Barajas**

VOCAL: **Profesor: José Pedraza Chaverri**

SECRETARIO: **Profesor: Euclides Avila Chávez**

1er. SUPLENTE: **Profesor: Nuria Victoria Sánchez Puig**

2º SUPLENTE: **Profesor: Nancy Monroy Jaramillo**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
DE LA REPRODUCCIÓN, INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN.**

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Euclides Avila Chávez

SUSTENTANTE:

David Arteaga Durán

Abreviaturas

AINE	Antiinflamatorio no esteroideo
AMPc	Monofosfato cíclico de 3,5-adenosina
COX	Ciclooxigenasa
CRE	Elemento de respuesta al AMPc
CREB	Proteína de unión a CRE
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAc	DNA complementario
Eag1	<i>Éter à go-go-1</i>
IBMX	3-Isobutil-1-metilxantina
MRP	Proteína asociada a la resistencia a multidrogas
15-PGDH	15-Hidroxiprostaglandina deshidrogenasa dependiente de NAD ⁺
PGs	Prostaglandinas
PGD ₂	Prostaglandina D ₂
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGF ₂ α	Prostaglandina F ₂ α
PGG ₂	Prostaglandina G ₂
PGH ₂	Prostaglandina H ₂
PGI ₂	Prostaciclina I ₂
PGT	Proteína transportadora de prostaglandinas
PKA	Proteína cinasa A
PLA ₂	Fosfolipasa A ₂
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa
SFB	Suero fetal bovino
TC	Toxina del cólera
TXA ₂	Tromboxano A ₂
VPH	Virus del papiloma humano

Índice

Contenido	página
1. Resumen	6
2. Introducción	7
2.1. El cáncer cérvico uterino	7
2.2. El virus del papiloma humano (VPH)	8
2.3. El semen y el cáncer cervical	9
2.4. Los prostanooides	11
2.5. Biosíntesis y catabolismo de los prostanooides	12
2.6. Los receptores de los prostanooides	14
2.7. La PGE ₂ y sus receptores	14
2.8. La PGE ₂ y el cáncer	16
2.9. El canal de potasio éter à go-go 1 (Eag1)	17
3. Planteamiento del problema	21
4. Hipótesis	22
5. Objetivo general	22
5.1. Objetivos particulares	22
6. Materiales y métodos	23
6.1. Cultivo celular	23
6.2. Radioinmunoanálisis de AMPc	23
6.3. Análisis de la expresión génica	24
6.3.1. Extracción de RNA total	24
6.3.2. Reacción de la transcriptasa reversa (RT)	25
6.3.3. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)	25
6.4. Estudios de transactivación del promotor Eag1 con la PGE ₂	28
6.5. Derivación de una sublínea C33a transfectante estable del receptor EP2	28
6.6. Análisis de datos	31

7. Resultados	32
7.1. Los receptores EP2, EP3 y EP4 se expresan en las células C33a	32
7.2. La PGE ₂ incrementa la síntesis de AMPc en las células C33a	33
7.3. La PGE ₂ incrementa la proliferación de las células C33a	33
7.4. La PGE ₂ no tiene efecto sobre la expresión génica del canal Eag1 en las células C33a	35
7.5. Derivación de una sublínea C33a transfectante estable para EP2	36
7.6. La PGE ₂ incrementa la proliferación celular, la síntesis de AMPc y la expresión de los oncogenes c-Fos y Eag1 en las células C33a transfectantes estables para EP2	36
7.7. El promotor del Eag1 se induce tras la activación del receptor EP2 por la PGE ₂	38
7.8. La activación del promotor proximal del Eag1 por la PGE ₂ es un proceso mediado por la proteína CREB	40
8. Discusión	42
9. Conclusiones	47
10. Bibliografía	48

1. Resumen

El cáncer cérvico uterino es el segundo cáncer más común entre la población femenina a nivel mundial, así como el segundo de mayor importancia en México. El virus de papiloma humano (VPH) es el principal agente causal de carcinomas cervicales, sin embargo, existen otros factores que contribuyen a la progresión de esta neoplasia. Entre estos factores destacan las prostaglandinas, en especial la prostaglandina E₂ (PGE₂), presente en elevadas concentraciones en el semen. La PGE₂ genera una amplia variedad de respuestas biológicas secundarias a la activación de sus cuatro receptores (EP1- EP4). Diversos estudios señalan que en carcinomas cervicales la expresión y señalización de los receptores EP2 y EP4 es elevada, incrementando las concentraciones de AMPc intracelular. Por otro lado, la expresión del canal de potasio éter à go-go 1 (Eag1) fuera del sistema nervioso central es considerada una marca de oncogénesis. El Eag1 incrementa su expresión por agentes causales de cáncer cervical como son las proteínas oncogénicas del VPH y los estrógenos. Considerando que la expresión del Eag1 es un marcador temprano de cáncer cervical, resultó interesante investigar si el principal agente mitogénico presente en el semen, la PGE₂, aumenta la expresión del oncogén Eag1 e incrementa la proliferación de células de cáncer cervical. Para ello se utilizaron células C33a como modelo, las cuales corresponden a una línea celular establecida de cáncer cervical libre de secuencias del VPH y que expresa niveles basales de Eag1. Para los experimentos las células fueron tratadas con etanol como vehículo y PGE₂ 1 µM durante tiempos variables. Se encontró que las células C33a expresan los genes de 3 de los 4 receptores de la PGE₂: EP2, EP3 y EP4. De manera simultánea se observó que la PGE₂ incrementa los niveles de AMPc intracelular y aumenta la proliferación celular de células C33a, pero sin afectar la expresión génica del gen Eag1. Por lo tanto, se realizó la derivación de una sublínea C33a transfectante estable para el receptor EP2. Se observó que con la sobreexpresión del receptor EP2, la PGE₂ incrementa la proliferación celular, la síntesis de AMPc y la expresión del Eag1 y de c-Fos, un gen previamente descrito que es regulado por la PGE₂. Mediante estudios con vectores reporteros con luciferasa se observó que la PGE₂ activó el promotor proximal del Eag1. La generación de AMPc como segundo mensajero nos condujo a investigar la presencia de posibles elementos de respuesta a AMPc en el promotor del gen Eag1. Mediante un análisis *in silico* con el programa MatInspector se localizaron 6 sitios potenciales de unión a la proteína CREB en el promotor proximal del gen Eag1. En experimentos con vectores de expresión de CREB o de una mutante dominante negativa de esta proteína se demostró que la proteína CREB participa en la activación del promotor Eag1 dado por la PGE₂. Con este estudio demostramos que la PGE₂ promueve la expresión del oncogén Eag1 en carcinomas cervicales no dependientes de VPH, a través de la activación del receptor EP2. Los resultados obtenidos sugieren que las altas concentraciones de PGE₂ en el semen lo convierten en un factor que predispone el desarrollo de carcinomas cervicales. Por el otro lado, este estudio indica que el receptor EP2 podría ser considerado como un posible blanco terapéutico en diversos tipos de cáncer.

2. Introducción

2.1. El cáncer cérvico uterino

El cáncer cérvico uterino es el segundo cáncer más común entre la población femenina a nivel mundial, con un estimado de 529, 409 nuevos casos y 274, 883 muertes en el 2008. Cerca del 86% de estos casos ocurren en países en desarrollo, que representan el 13% del total de los cánceres en la mujer. La mayoría de los casos son carcinomas de células escamosas mientras que los adenocarcinomas son menos comunes [1].

Se estima que cada año 10 186 mujeres son diagnosticadas con cáncer cervical y 5 061 mueren a causa del mismo en México. El cáncer cervical es el segundo más frecuente en la población femenina entre los 15 y 44 años en México (Figura 1).

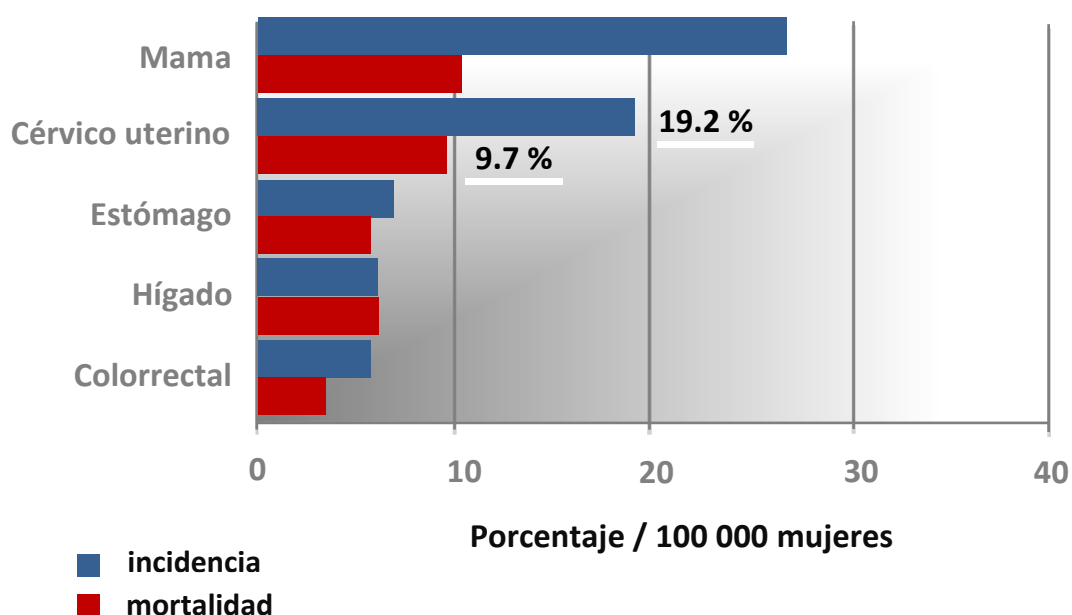


Figura 1. El cáncer cérvico uterino en México. Incidencia y mortalidad del cáncer cervical comparado contra otros tipos de cáncer en la población femenina mexicana (IARC, GLOBOCAN 2012).

2.2. El virus del papiloma humano (VPH)

El VPH es un virus de DNA que presenta tropismo por el epitelio escamoso. Se han identificado cerca de 120 tipos de VPH y aproximadamente un tercio de estos infectan el epitelio escamoso del tracto genital [2]. Las manifestaciones clínicas de la infección por VPH incluyen lesiones anogenitales, neoplasias intraepiteliales cervicales y el cáncer. De los VPH genitales, 15 han sido caracterizados como de alto riesgo y son considerados como los principales agentes causantes de la mayoría de los tumores cervicales [3]. Los VPH de alto riesgo, se encuentran asociados al desarrollo de los carcinomas anales, vulvares y orales [4].

De los VPH de alto riesgo, los VPH-16 y VPH-18 se encuentran en un 70% de los casos de cáncer cervical [5,6]. El genoma del VPH es pequeño (aproximadamente de 8 kb) y no codifica para polimerasas u otras enzimas necesarias para la replicación viral (Figura 2). La infección de las células en la placa basal obliga a las células a entrar nuevamente en la fase S permitiendo reclutar a las proteínas de la célula infectada para la replicación del genoma del virus, seguido de la síntesis de proteínas de la cápside, el ensamblaje y su posterior salida de célula [7].

De las proteínas que codifica el genoma del VPH, 3 están completamente relacionadas a procesos oncogénicos: E5, E6 y E7 [8,9]. La proteína E6 induce la rápida degradación de la proteína p53 [10], evitando que la célula infectada inicie el proceso de apoptosis, mientras que la proteína E7 inactiva a la proteína Rb forzando a la célula hospedera a continuar con la división celular [11]. La proteína E5 coopera con E6 y E7 promoviendo la hiperproliferación de las células infectadas, facilitando la progresión del cáncer [12].

El contagio por VPH ocurre principalmente por contacto sexual. Un estudio demuestra que 48 meses después de su primer encuentro sexual más del 50% de las mujeres jóvenes han adquirido alguna infección por VPH a nivel cervical. A pesar de que la infección por VPH juega un papel importante en la carcinogénesis cervical, la infección por sí misma es insuficiente para el desarrollo del cáncer [13], ya que toma aproximadamente 12-15 años entre el contagio por VPH y el desarrollo del cáncer [14]. El epitelio genital sin lesiones es resistente a la infección por VPH. Para iniciar la infección, el VPH debe moverse sobre la superficie de las células epiteliales basales a

través de pequeñas lesiones en la piel o la mucosa genital, de forma que una lesión en el epitelio genital permite la infección de los queratinocitos presentes en la placa basal del epitelio [7].

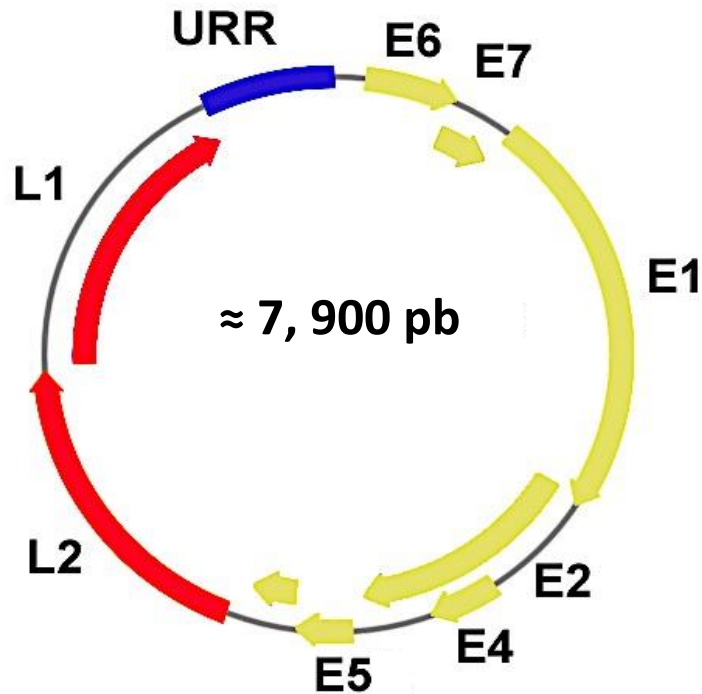


Figura 2. Genoma del virus del papiloma humano (VPH). El genoma del VPH consiste en una doble cadena de DNA de aproximadamente 8 kb. Se divide en tres regiones: la región temprana (E) que contiene la secuencia de los genes para proteínas no estructurales, la región tardía (L) que contiene los genes que codifican para las proteínas de la cápside, y una región reguladora (URR), la cual contiene un origen de replicación de DNA, secuencias reguladoras de la transcripción y uno o más promotores los cuales controlan la expresión de las oncoproteínas E6 y E7[8].

2.3. El semen y el cáncer cervical

Se sabe que el semen humano contiene varios componentes químicos que pueden ocasionar cambios en la arquitectura normal del epitelio cervical, lo cual promueve la infección por el VPH. Perez-Andino et al. descubrieron que la cápside del VPH-16 puede unirse a los espermatozoides [15], los cuales tienen una alta motilidad para atravesar la placa de moco en el tracto genital femenino.

El semen es fraccionado en dos partes: los espermatozoides y el plasma seminal. El plasma seminal esta compuesto de diferentes secreciones, que son aportadas por los testículos, el epidídimo, las vesículas seminales y la próstata. El semen es un fluido biológico altamente complejo, que contiene proteínas, aminoácidos, enzimas, fructosa y otros carbohidratos, lípidos y minerales (Tabla 1). Entre sus funciones destacan la generación de un medio alcalino en la cavidad vaginal, que permita la coagulación del eyaculado y forme un depósito que suple de nutrimentos a los espermatozoides. El líquido seminal reviste a los espermatozoides con inhibidores de la capacitación y activa la motilidad de los mismos.

Tabla 1. Rangos normales para los constituyentes bioquímicos del plasma seminal [16].

<i>Componente</i>	<i>Unidades</i>	<i>Rango Normal</i>
Fosfatasa ácida	U/eyaculado	≥ 200
L-carnitina	nmol/eyaculado	390-1830
Ácido cítrico	μmol/eyaculado	≥ 52
Fructosa	μmol/eyaculado	≥ 13
α-glucosidasa	mU/eyaculado	≥ 20
Glicerofosocolina	μmol/eyaculado	1.2-22.6
Magnesio	mmol/L	2.9-10.3
Zinc	μmol/eyaculado	≥ 2.4
Prostaglandinas		
PGE ₂	μg/mL	73 (2-272)
PGF _{2α}	μg/mL	2.1 (0.1-7.0)

La inmunosupresión por el semen humano ha sido bien documentada ya que es capaz de interactuar con las células del epitelio cervical, lo cual afecta la síntesis de citocinas relacionadas a la respuesta inmune [17,18]. Esta propiedad permite inhibir la respuesta inmune de la mujer a los espermatozoides, facilitando la implantación y la tolerancia gestacional. La respuesta inmune celular es considerada la mejor defensa contra la infección por el VPH, pero es probable que la inmunosupresión mediada por el semen, facilite la transmisión genital del VPH, reactivando la infección latente y promoviendo la progresión e invasión del cáncer [18]. Jeremias y Witkin validaron la

capacidad del semen de estimular la expresión de la metaloproteinasa de matriz-9, enzima necesaria para la degradación de la matriz extracelular, permitiendo la metástasis y la invasión del tumor [19-21]. Estos datos sustentan la posibilidad de que el semen humano puede incrementar el riesgo de progresión del cáncer cervical.

El 80% de los casos de cáncer cervical ocurren en países en desarrollo [22]. Los métodos anticonceptivos que no incluyen al condón, como la ligación, aumentan la exposición del semen y por lo tanto se le considera un cofactor que aumenta la incidencia del cáncer cervical en estos países. Por el otro lado, se ha probado que el uso del condón promueve la eliminación de la infección por el VPH así como el saneamiento de las lesiones por neoplasias intraepiteliales cervicales [23].

La inflamación crónica es generalmente considerada como un factor de riesgo para el desarrollo de diversos tipos de cáncer [24]. La exposición repetida al semen puede desencadenar cambios celulares permitiendo la inflamación del cérvix [25].

Las prostaglandinas (PGs), se encuentran entre los principales mediadores de la inflamación y se encuentran presentes en el semen a una concentración de 10 000 veces mayor que las halladas en cualquier otro sitio de inflamación [16,18], siendo la prostaglandina E₂ (PGE₂) el tipo más abundante en el semen [18,26] (Tabla 1). El aumento de la síntesis de la PGE₂ es considerado un posible promotor del cáncer cervical [27], de forma que en mujeres sexualmente activas, el cáncer cervical puede ser modulado por la exposición constante de las células cervicales infectadas con VPH a concentraciones altas de PGE₂ presentes en el plasma seminal.

2.4. Los prostanoides

Las PGs, la prostaciclina I₂ (PGI₂) y el tromboxano A₂ (TXA₂) son lípidos bioactivos que bajo condiciones fisiológicas normales, poseen funciones homeostáticas entre las que destacan la citoprotección de la mucosa gástrica, la fisiología renal, la gestación y el parto. Los prostanoides también se encuentran involucrados en varios procesos patológicos como enfermedades cardiovasculares y el cáncer [28]. Algunas de las funciones de los prostanoides se presentan a continuación [29]:

- PGE₂: Actúa durante la inflamación, la fertilidad, la integridad de la mucosa gástrica y la modulación de la respuesta inmune.
- Prostaglandina D₂ (PGD₂): Inhibe la agregación plaquetaria y permite la vasodilatación.
- Prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}): Induce la síntesis de interleucinas, participa en el crecimiento hipertrófico celular, la luteólisis y la contracción uterina.
- TXA₂: Estimula la agregación plaquetaria y participa en la constricción del músculo liso.
- PGI₂: Inhibe la agregación plaquetaria e induce la vasodilatación, funciona como una contraparte del TXA₂.

2.5. Biosíntesis y catabolismo de los prostanoideos

Los prostanoideos derivan del ácido araquidónico (AA), un ácido graso de 20 carbonos, el cual es almacenado en la membrana plasmática de las células [28,30]. El AA ingerido en la dieta o sintetizado a partir del ácido linoleico, es insertado en la membrana fosfolipídica, la cual retiene el AA hasta que el estímulo apropiado cataliza su liberación por la fosfolipasa A₂ (PLA₂) [31] (Figura 3). Una vez liberado, el AA es sustrato para las enzimas ciclooxigenasas (COX) 1 o 2, que catalizan una reacción de oxidación, que resulta en la síntesis de la prostaglandina G₂ (PGG₂).

La PGG₂ es utilizada por dos clases de COX dando como producto final a la prostaglandina H₂ (PGH₂) [32,33]. A su vez, la PGH₂ sirve como sustrato para las sintasas de PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}, PGI₂ y la del TXA₂ [28]. Una vez sintetizadas, las prostaglandinas son transportadas fuera de la célula por las proteínas asociadas a la resistencia a multidroga (MRPs) [34]; de entre las cuales la MRP4, actúa como el transportador primario de prostaglandinas. Una vez exportadas, las prostaglandinas se unen a sus receptores acoplados a proteínas G.

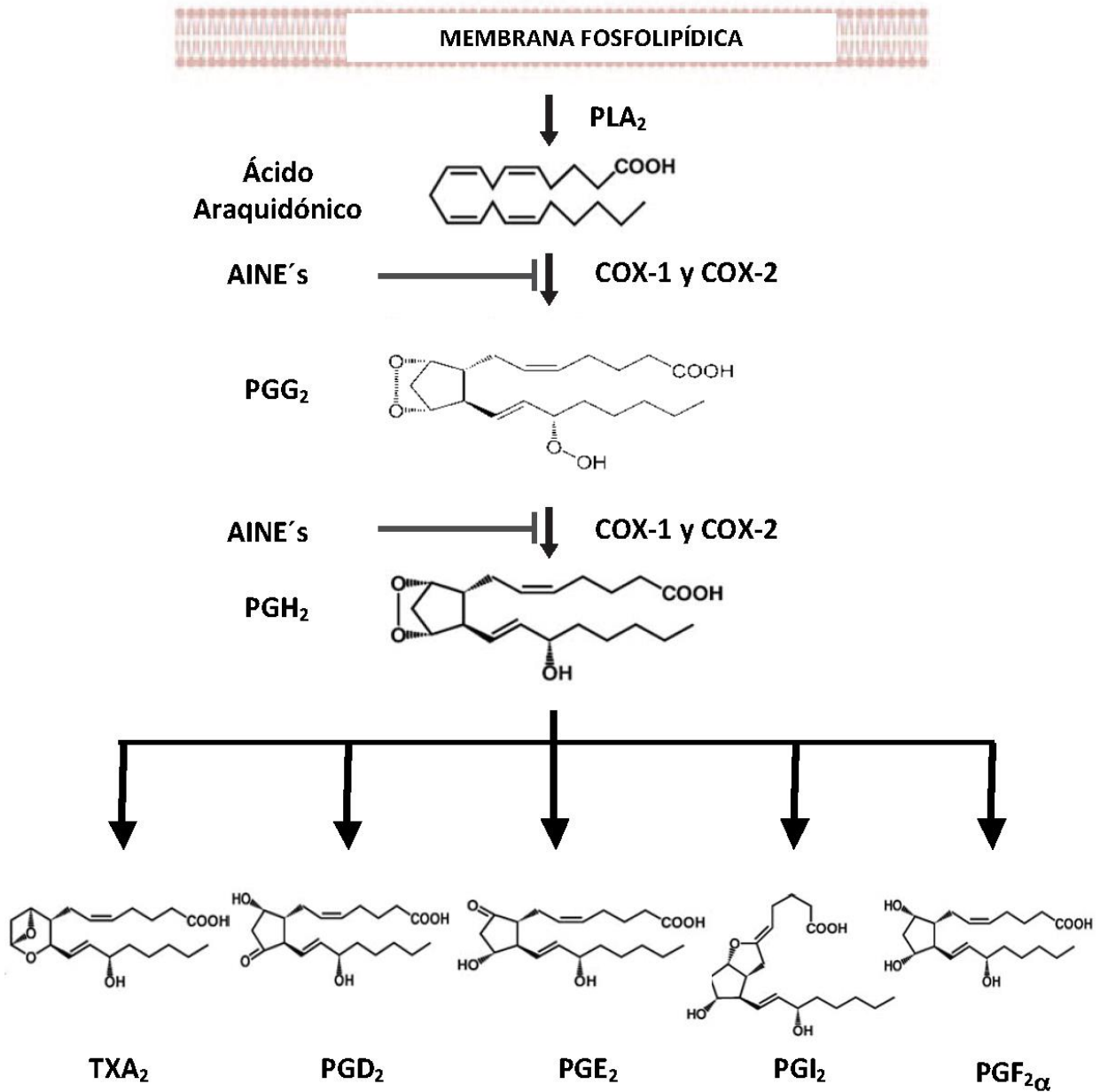


Figura 3. Biosíntesis de los prostanoideos. El ácido araquidónico (AA) es un ácido graso esencial que es transportado dentro de las células y almacenado en la membrana celular. La fosfolipasa A₂ (PLA₂) es la encargada de liberar el AA de la membrana celular. El AA liberado es convertido a PGG₂ y después a PGH₂ por las ciclooxigenasas (COXs). La PGH₂ se convierte en sustrato de una gran variedad de sintasas de prostaglandinas y de tromboxanos. Los antiinflamatorios no esteroideos (AINE's) inhiben la acción de las enzimas COX's, bloqueando la producción de prostaglandinas, evitando procesos inflamatorios [28].

El catabolismo de las prostaglandinas ocurre a través de 2 pasos; primero las prostaglandinas son captadas por la glicoproteína conocida como transportadora de Prostaglandinas (PGT) [35] y posteriormente catabolizadas por oxidación. Por ejemplo, la PGE₂ es reingresada a la célula y es enzimáticamente catabolizada por la 15-hidroxi prostaglandina deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ (15-PGDH) [36].

2.6. Los receptores de los prostanoides

Las acciones de los prostanoides son mediadas por su interacción con receptores acoplados a proteínas G, los cuales han sido clasificados de la siguiente manera: la PGE₂ se une a los receptores EP (EP1–EP4), la PGD₂ activa a los receptores DP (DP1-DP2), la PGF_{2α} actúa a través del receptor FP y la PGI₂ se une al receptor IP. El resultado inmediato de dicha interacción es el incremento o decremento en la velocidad de generación de segundos mensajeros, así como cambios en el potencial de membrana o la activación de diferentes cinasas [28,30].

2.7. La PGE₂ y sus receptores

Entre las prostaglandinas, la PGE₂ es la que exhibe la mayor cantidad de funciones en el cuerpo humano. En el tracto gastrointestinal la PGE₂ es el principal prostanoides biológicamente activo, regulando procesos en el intestino como la citoprotección de la mucosa, la secreción gastrointestinal y la motilidad [37].

En el riñón, la PGE₂ es el mayor prostanoides sintetizado a lo largo de la nefrona y regula la microcirculación renal así como el transporte de agua y sales. Aparte de los esteroides, las prostaglandinas son importantes reguladores de la función reproductiva en la mujer (ovulación, receptividad del útero, la implantación y el parto). La PGE₂ es un potente vasodilatador en humanos. Durante el embarazo, la PGE₂ induce la alteración local de la secreción de factores de crecimiento y nutrimentos e incrementa la permeabilidad vascular. La síntesis de PGE₂ se incrementa durante la labor de parto, siendo usada como fármaco para inducir dicha acción [38].

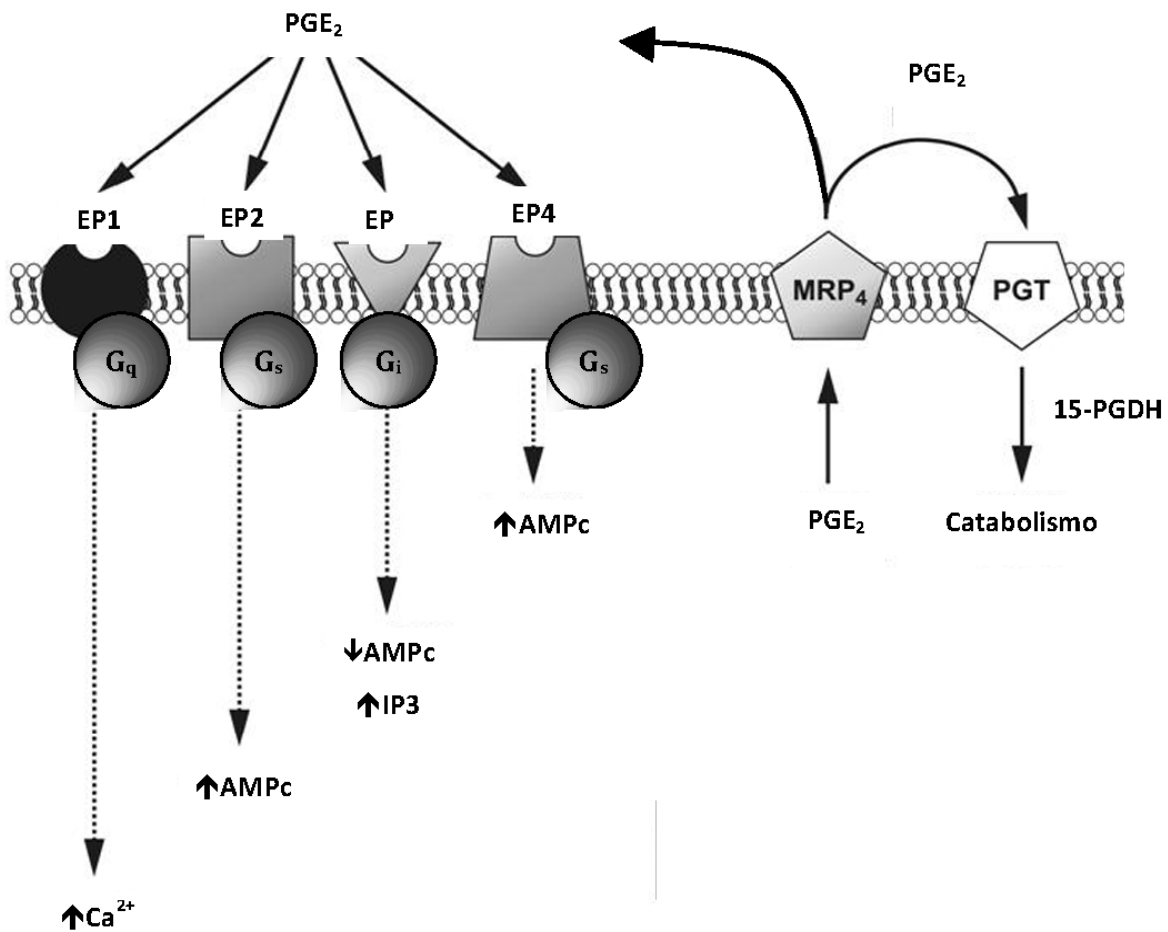


Figura 4. Activación de los receptores EP por la PGE₂. Después de la síntesis de la PGE₂, esta sale al ambiente extracelular mediante la proteína MRP₄ para unirse a sus receptores de membrana específicos (EP1-EP4), activando vías de señalización a través de segundos mensajeros. Después de la activación de los receptores, la PGE₂ es internalizada a la célula por el transportador PGT donde es inactivada por la 15-PGDH [30].

La transducción de señales mediada por la unión de la PGE₂ a sus 4 receptores ha sido ampliamente estudiada y se ha observado que induce cambios a nivel de segundos mensajeros como lo son el AMPc, Ca²⁺ y los trifosfatos de inositol, activando o reprimiendo diferentes vías de señalización [39]. La PGE₂ se une fuertemente a estos receptores con valores de K_d en el rango de 1-40 nM [40,41]. El receptor EP1 modula el incremento de la concentración de Ca²⁺ libre [42].

Los receptores EP2 y EP4 se acoplan a proteínas Gs y modulan el incremento de las concentraciones de AMPc. La activación del receptor EP3 inhibe a la adenilato ciclasa a través de una proteína Gi, disminuyendo los niveles de AMPc (Figura 4).

Las funciones de cada uno de los receptores se han estudiado en ratones homocigotos nulos para cada uno de estos receptores. Por mencionar algunos ejemplos, el receptor EP1 es mediador de la respuesta al estrés a través de la secreción de ACTH [43]. El receptor EP2 participa en la ovulación y la fertilización [44], facilita la transmisión del dolor [45], induce la formación de hueso [46] y facilita el cierre de ductos de tipo arterial [47]. El receptor EP3 participa en la generación de la fiebre [48], regula la secreción duodenal [49] y modula la angiogénesis asociada a tumores [41].

Vías de señalización moduladas por el receptor EP4, facilitan la movilización, migración y maduración de las células de Langerhans [40], induce la formación de hueso [46] y facilita el cierre de ductos de tipo arterial [47].

2.8. La PGE₂ y el cáncer

Se sabe que las prostaglandinas pueden modular la proliferación celular, así como la diferenciación y la apoptosis a través de múltiples vías de señalización [28,32]. La PGE₂ es la prostaglandina más abundante que se ha detectado en varios tipos de cáncer, incluidos los de colon, pulmón, mama, cabeza y cuello [44,50-52].

En cáncer de mama, la PGE₂ aumenta la producción de aromatasa en células estromales y concomitantemente la producción de estrógenos, lo cual estimula la proliferación celular [53]. En células de carcinomas de colon, la PGE₂ activa la cascada de señalización PI3K-Akt-PPAR γ [54]. De igual manera, la PGE₂ promueve la síntesis de la proteína BCL-2, proteína anti-apoptótica, así como la inducción de la actividad transcripcional del factor nuclear NF- κ B, promoviendo la inhibición de la apoptosis [55,56].

Se sabe que la 15-PGDH (enzima encargada de su inactivación) como la PGT (enzima encargada de secuestrar a la PGE₂ del ambiente extracelular) se expresan abundantemente en tejido normal, pero en procesos cancerígenos los niveles de ambas enzimas disminuyen drásticamente. Los bajos niveles de ambas proteínas conducen al aumento de la concentración de la PGE₂ [35,57-59]. La acumulación de la

PGE₂ promueve la reorganización, angiogénesis, así como la adhesión, migración e invasión de las células cancerígenas.

Se ha comprobado en carcinomas endometriales como cervicales, que la expresión y señalización de los receptores EP2 y EP4 es elevada, lo cual sugiere una regulación autocrina y paracrina de las células neoplásicas por parte de la PGE₂. El rol del receptor EP2 en la proliferación celular, la angiogénesis y la apoptosis ha sido descrito en varios estudios. El receptor EP2 regula la angiogénesis por la inducción del VEGF en células de cáncer de próstata y de páncreas, así como el aumento de la supervivencia y la motilidad de células endoteliales [60-62]. La activación del receptor EP2 por la PGE₂ regula la diferenciación de células Th17 así como reacciones proinflamatorias por vías dependientes de AMPc [63], y juega un rol crítico en el desarrollo de cáncer de piel [64,65]. De la misma forma, datos presentados por Fujino y colaboradores, indican la relación entre el receptor EP4 y el crecimiento del tumor, donde la PGE₂ induce la expresión del factor de respuesta de crecimiento temprano y aumenta la proliferación celular a través de vías de señalización como la PKB/Akt y ERK 1/2 [66]. Chen y colaboradores demostraron que la PGE₂ aumenta la expresión de oncogenes como *c-Fos* en células de cáncer de próstata a través de la activación de los receptores EP2 y EP4 [67].

2.9. El canal de potasio éter à go-go 1 (Eag1)

Los canales iónicos son proteínas de membrana que permiten el paso de iones en la célula. Estas proteínas juegan un papel importante en la fisiología humana incluyendo la transmisión neuronal, el ritmo cardiaco, la contracción muscular, la secreción de insulina, la función inmune y la proliferación celular. La relevancia de estas proteínas, en situaciones de enfermedad donde su expresión y actividad se ven alteradas, han hecho que dichos canales sean blancos terapéuticos para una gran cantidad de fármacos, en tratamientos como la epilepsia, la fibrosis quística y arritmias cardiacas, por mencionar algunas [68]. Específicamente los canales de potasio dependientes de voltaje, se han asociado a varias desórdenes fisiológicos y representan blancos importantes en enfermedades como el cáncer [69].

Entre estos canales, el *eter à go-go-1* (Eag1) ha generado gran interés en el estudio del cáncer por su relación en la proliferación celular del tumor, así como su regulación por diferentes factores etiológicos. El Eag1 (Kv10.1, KCNH1), es un canal de potasio dependiente de voltaje, cuyo locus fue descrito por primera vez en el genoma de la mosca *Drosophila melanogaster* [70,71]. El Eag1 ha sido clonado en varias especies, incluyendo la rata, el bovino y el humano [72-74]. La distribución del Eag1 es restringida en el cuerpo humano, limitando su expresión a zonas como el cerebro, el testículo, la placenta y la glándula suprarrenal [74-77] (Figura 5).

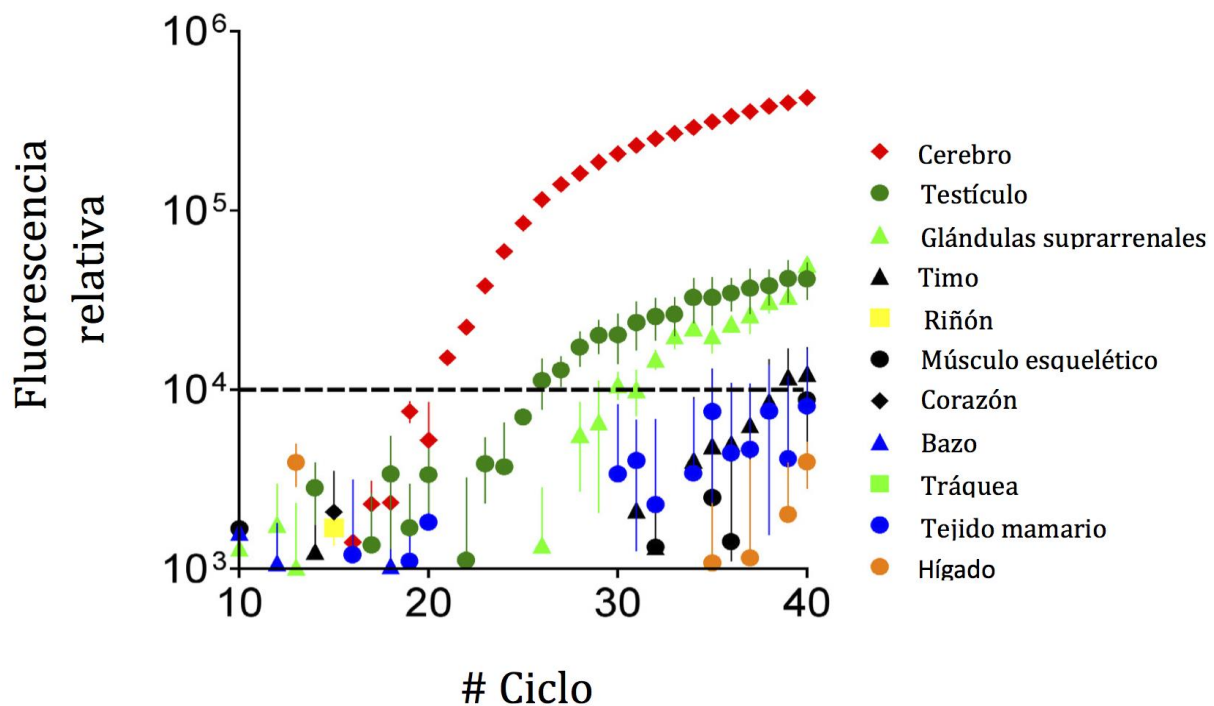


Figura 5. La expresión del RNAm del gen Eag1 en tejidos periféricos es restringida. La figura muestra la fluorescencia obtenida por PCR en tiempo real de diferentes tejidos humanos, donde la línea marcada indica los valores ocupados para determinar si la señal es o no positiva. Se observa que en cerebro y testículo la expresión del RNAm del Eag1 es alta [76].

Los canales Eag1 tienen 4 subunidades α idénticas, las cuales contienen 6 dominios transmembrana (S1-S6) (Figura 6). Los extremos carboxilo y amino están presentes en el citoplasma. La región del poro está localizada entre los dominios S5 y S6 y es

altamente selectiva a los iones de potasio, mientras que el dominio S4 actúa como un sensor de voltaje [78,79]. El extremo N-terminal incluye un sitio de unión a calmodulina (CaM) y un dominio Per-Arnt-Sim (PAS), el cual está asociado con la sensibilidad al oxígeno y la activación del factor inducible por la hipoxia (HIF1) [80]. El extremo C-terminal incluye un sitio de unión a nucleótidos cíclicos (cNBHD), un dominio de tetramerización y 2 sitios de unión a la CaM [81].

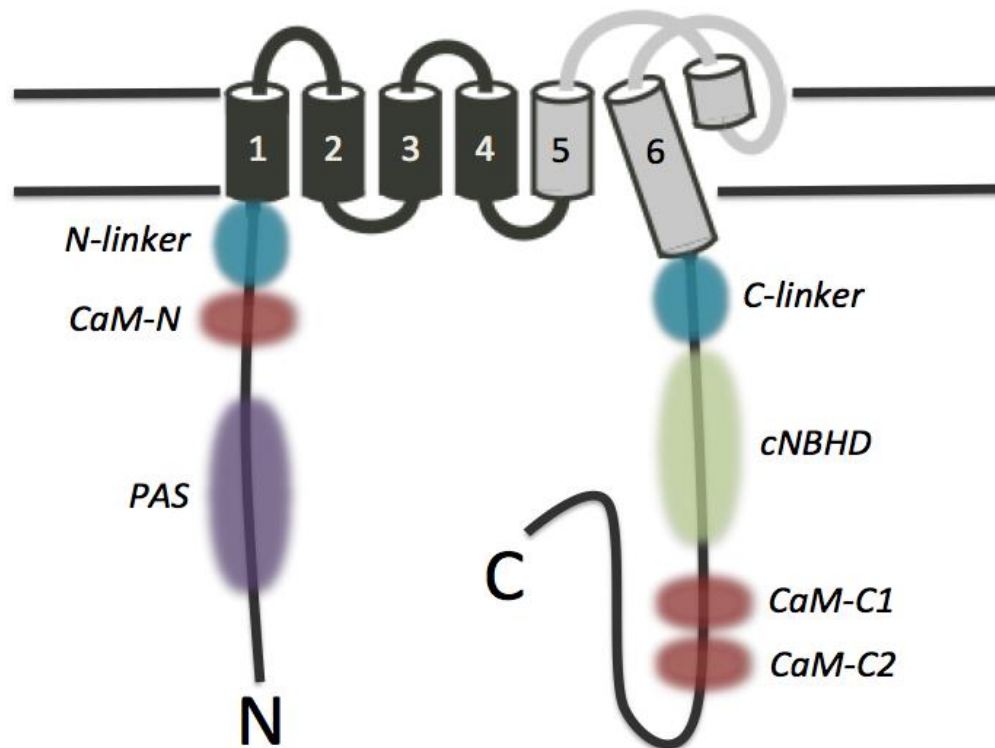


Figura 6. Representación esquemática de una subunidad del canal de potasio Eag1. En la figura se muestran 6 segmentos transmembrana y los extremos carboxilo y amino, donde se marcan los sitios CaM (dominio de unión a calmodulina, rojo), dominio PAS (Per-ARNT-Sim, en morado), un sitio de unión a nucleótidos cíclicos (cNBHD, en verde) y las uniones carboxilo y amino (azul) [82].

El Eag1 fue descrito como un canal regulador del ciclo celular [83-85] en el proceso de fusión del mioblasto [74,86]. Sin embargo, el principal rol del Eag1 en la mayoría de los tejidos sanos donde se expresa permanece desconocido. El Eag1 se ha detectado

en aproximadamente 70% de las líneas celulares derivadas de carcinomas como el de colon [87,88], gástricos [89], de mama [76], cervicales [90], así como en diferentes sarcomas [91]. En estas líneas, el Eag1 promueve la proliferación y ha sido considerado un marcador tumoral. Se ha demostrado que el Eag1 es regulado por los estrógenos y los oncogenes E6 y E7 del VPH, tanto en células sanas como células de cáncer cervical [77].

La regulación del Eag1 por diferentes factores etiológicos en el cáncer cervical ha sugerido que su detección en lesiones precancerosas, funcione como un marcador temprano e indicador de riesgo en el cáncer cervical [92]. Camacho y colaboradores han demostrado que la proteína Eag1, es diferencialmente sobreexpresada en citologías cervicales de alto riesgo comparada con el cérvix sano, incrementando su expresión en lesiones intraepiteliales de bajo y alto grado [93]. La inhibición específica en la expresión del Eag1 por RNA de interferencia [91], y bloqueadores no específicos del canal [94], como la imipamina y el astemizol, muestran una reducción en la proliferación del tumor en modelos *in vitro*. El astemizol inhibe el crecimiento del tumor en modelos *in vivo* [95]. Resultados en nuestro grupo de trabajo indican que el calcitriol (1, 25-dihidroxitamina D₃), la forma hormonal activa de la vitamina D₃, inhibe la expresión del gen Eag1 en células de cáncer de mama y de cáncer cervical [96,97].

Estas evidencias resaltan al Eag1 como un blanco molecular atractivo para el tratamiento del cáncer y dan impulso a la investigación relacionada con los mecanismos de regulación de la expresión del Eag1 por factores etiológicos del cáncer.

3. Planteamiento del problema

La PGE₂ es un lípido que se encuentra en concentraciones muy elevadas en el líquido seminal. En diversos estudios se ha demostrado que la PGE₂ es un agente mitogénico en diferentes modelos de cáncer, incluyendo el cáncer cérvico uterino. Estos estudios han resaltado la importancia de los receptores EP2 y EP4 en los efectos proliferativos de la PGE₂. Considerando que la expresión del canal de potasio Eag1 es un marcador temprano de cáncer cervical, resulta interesante investigar si la PGE₂ incrementa la expresión del oncogen Eag1 como parte de sus efectos oncogénicos.

4. Hipótesis

La PGE₂ a través de los receptores EP2 aumentará la expresión génica del canal de potasio Eag1 e incrementará la proliferación de células de cáncer cervical.

5. Objetivo general

Estudiar los efectos de la activación de los receptores EP2 por la PGE₂ sobre la expresión génica del canal de potasio Eag1 en la línea C33a de cáncer cervical.

5.1. Objetivos particulares

- a) Investigar si la PGE₂ incrementa la expresión génica del canal de potasio Eag1 en células C33a de cáncer cervical.
- b) Evaluar si la PGE₂ aumenta la proliferación de las células C33a.
- c) Determinar si la PGE₂ incrementa la producción de AMPc intracelular en las células C33a.
- d) Estudiar la regulación del promotor Eag1 por la PGE₂ en las células C33a.

6. Materiales y métodos

6.1. Cultivo celular

En este trabajo utilizamos a las células C33a como modelo del cáncer cervical. Esta línea celular establecida tiene como características relevantes que: a) expresa niveles basales de Egr1 y b), que no contiene secuencias de VPH. Las células C33a (ATCC, E.E.U.U.) se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, E.E.U.U.) alto en glucosa, suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 5% y antibióticos (penicilina 50 unidades/mL y estreptomina 50 µg/mL, Gibco, E.E.U.U.), a 37°C y CO₂ al 5%. Las células fueron sembradas en cajas Petri con medio DMEM suplementado con SFB tratado con carbón dextran y posteriormente incubadas con etanol como vehículo o PGE₂ 1 x 10⁻⁶ M (Sigma-Aldrich, E.E.U.U.) durante 24 horas. En general, los experimentos se realizaron en cultivos con células al 75% de confluencia.

6.2. Radioinmunoanálisis de AMPc

Las células C33a fueron cultivadas en cajas de 24 pozos (300 x 10³ células por pozo) con medio DMEM suplementado con 3-isobutil-1-metilxantina 200 µM (IBMX, Sigma-Aldrich, E.E.U.U.), el cual es un inhibidor de fosfodiesterasas que degradan al AMPc. Las células fueron incubadas durante 24 horas a 37°C con vehículo (EtOH), PGE₂ (1 µM) y toxina de cólera (TC, 10 ng/mL) como control positivo, ya que activa a la adenilato ciclasa y aumenta los niveles de AMPc intracelular. A las 24 horas se removió el medio y las células fueron colocadas en hielo. La cuantificación de AMPc intracelular se llevó a cabo en las células en cultivo por radioinmunoanálisis utilizando un anticuerpo específico anti-AMPc (Calbiochem, E.E.U.U.) como se describió previamente [98]. Para ello, se retiró el medio y las células se lisaron en amortiguador RIPA con IBMX 0.1 mM. Los homogenados celulares fueron calentados a 95°C durante 5 min para inactivar a las fosfodiesterasas. Los extractos celulares, así como la sal de sodio del AMPc utilizada como estándar, fueron diluidas en acetato de sodio pH 4.7 y acetiladas con una mezcla 2:1 de trietilamina y anhídrido acético. Las muestras se incubaron durante 18 h a 4°C en presencia del anticuerpo anti-AMPc 1:3000 en solución de acetato de sodio 50 mM pH 6.1 con albúmina de suero bovino 0.1%. El éster tirosilmetílico del AMPc 2'-O-monosuccinilado (Sigma-Aldrich)

marcado con ^{125}I (Amersham Pharmacia Biotech) por el método de la cloramina T, se purificó en una columna de dietilaminoetilcelulosa. El trazador fue utilizado a razón de 10000 cpm por tubo. Después de 18 h a 4°C , se determinó la radiactividad presente en los precipitados en un contador gamma (Crystal Plus multidetector RIA system, Packard Instrument Company, E.E.U.U.).

6.3. Análisis de la expresión génica

Para evaluar la expresión del gen *Eag1* en las células C33a, se realizó la extracción del RNA total que se procesó por la reacción de la transcriptasa reversa (RT), y posteriormente, por la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) de la siguiente manera:

6.3.1. Extracción de RNA total

Para extraer el RNA total de las células C33a cultivadas en cajas Petri de 100 mm^2 (1×10^6 células por caja) se utilizó *TRIzol* (Invitrogen, E.E.U.U.), de acuerdo a la técnica descrita por Chomczynski y Sacchi [99]. El TRIzol disolvió los componentes celulares y permitió la extracción de los RNAs preservando su integridad. Las células fueron homogenizadas con 1 mL de TRIzol y cada homogenado fue extraído con $200\ \mu\text{L}$ de cloroformo frío. Los tubos se centrifugaron a 14,000 rpm durante 45 minutos y 4°C , paso que permite la formación de una fase acuosa y una fase orgánica. La fase acuosa contiene el RNA y fue transferida a tubos nuevos, a los cuales se les agregó isopropanol para precipitar el RNA, el cual se recolectó mediante centrifugación (14,000 rpm, 30 minutos, 4°C). El RNA se lavó con etanol al 75% y fue centrifugado nuevamente (14,000 rpm, 10 minutos, 4°C). Al término se invirtieron los tubos para evaporar el etanol residual y se disolvió el RNA obtenido en agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC). La integridad del RNA se evaluó por electroforesis desnaturalizante en geles de agarosa. La cantidad y pureza del RNA se evaluó mediante espectrofotometría a longitudes de onda de 260 y 280 nm y se almacenó a -80°C para posteriormente procesarlo por la reacción de RT y qPCR.

6.3.2. Reacción de la transcriptasa reversa (RT)

Esta técnica se basa en la síntesis de DNA a partir de una molécula base de RNA por acción de la enzima transcriptasa reversa. Para la generación del DNA complementario (DNAc), se realizó una primera mezcla con RNA total (5 µg), oligo-dT (50 µM) y agua grado PCR (volumen total de 13 µL), que fue sometida a un proceso de desnaturalización (65°C/10 min), en el cual se linealiza el RNA. Dicha mezcla fue colocada de manera inmediata en hielo para asegurar que las cadenas de RNA no se volvieran a unir. A continuación se añadieron 4 µL de amortiguador 5X, 0.5 µL de inhibidor de RNasa (40 U/µL), 2 µL de una mezcla de los 4 desoxirribonucleótidos (dNTPs, 10 µM c/u) y 0.5 µL de la enzima transcriptasa reversa (20 U/µL), siguiendo las indicaciones del estuche comercial *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis* (Roche, Alemania). El programa de PCR al que fue sometido el volumen final es 42°C/90 minutos/1 ciclo (síntesis del DNAc), 85°C/10 minutos/1 ciclo (desnaturalización de la transcriptasa reversa) utilizando el termociclador *Veriti 96 well Thermal Cycler* (Applied Biosystems, E.E.U.U.). El DNAc sintetizado se almacenó a -20°C.

6.3.3. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)

El DNAc se utilizó para la amplificación mediante qPCR, la cual es una técnica que permite la medición cuantitativa de la expresión de genes. La técnica de qPCR estandarizada en nuestro laboratorio emplea sondas de hidrólisis conocidas como sondas Taqman (Roche, Alemania). Las sondas Taqman son secuencias cortas de DNA complementarias a los DNAc que contienen fluorocromos donadores ubicados en el extremo 5' y grupos aceptores localizados en el extremo 3'. Cuando la sonda Taqman se encuentra íntegra, la excitación de los grupos donadores con una longitud de onda apropiada (530 nm) resulta en la emisión de fluorescencia, la cual es transferida a los grupos donadores mediante transferencia de energía fluorescente resonante y anulada por los grupos donadores. Durante el proceso de amplificación, el desplazamiento de la DNA polimerasa que tiene actividad 5' exonucleasa hidroliza a la sonda en el extremo 5' liberando al donador, los nucleótidos y al aceptor. De esta manera, el donador libre y espacialmente alejado del aceptor, emite fluorescencia que

es captada por un lector con una intensidad de emisión proporcional a la cantidad de amplicones generados en cada ciclo.

Para realizar la qPCR se utilizó el estuche comercial *Light Cycler Taqman Master* de Roche. Cada DNAc fue amplificado en un volumen final de 10 μL , utilizando una mezcla de reacción que contenía para cada 2 μL de DNAc: 5.7 μL de agua grado PCR, 0.1 μL de sonda, 0.1 μL de oligonucleótido sentido, 0.1 μL de oligonucleótido antisentido, 2 μL de Taq DNA polimerasa (Master Mix 5X). La mezcla se colocó en capilares de vidrio, los cuales se centrifugaron a 1 000 rpm durante 1 minuto y se colocaron en el termociclador *LightCycler 2.0* (Roche, Alemania), previamente programado (Tabla 2).

Tabla 2. Protocolo de amplificación de DNAc por qPCR

Ciclos	T (°C)		Tiempo (s)
1	95	Activación de la Taq DNA polimerasa y desnaturalización inicial del DNAc	600
45	95	Desnaturalización del DNAc	10
	60	Alineamiento	30
	72	Alargamiento	1
1	4	Enfriamiento	∞

Para el diseño de los oligonucleótidos y las sondas específicas para cada gen se utilizó el programa *Universal Probe Library Assay Design Center* de Roche (<https://roche-applied-science.com/index.jsp>), del cual se adquirieron las secuencias (Tabla 3). El análisis del qPCR, relaciona la fluorescencia con la cantidad de producto de PCR que se acumula durante el proceso. Para ello, utiliza el Cp (crossing point) de cada curva, el cual representa el punto en el cual la intensidad de la fluorescencia excede la fluorescencia basal en un ciclo dado. Después de ello, se realiza la cuantificación relativa que compara los niveles tanto del gen problema como el gen de referencia, que en nuestros experimentos fue el gen L32, el cual codifica para una proteína ribosomal y cuya expresión no se modificó con los tratamientos realizados a las células C33a.

Tabla 3. Secuencia de los oligonucleótidos y sondas de hidrólisis utilizadas (Universal Probe Library, Roche).

Gen	Secuencia	Orientación	Amplicón	No. Sonda
Eag1	cctggaggtgatccaagatg ccaacacgtctcctttcc	Sentido Antisentido	60 nt	49
Ki67	ggtgtgcagaaaatccaaga actgtccctatgacttctggtg	Sentido Antisentido	77 nt	73
L32	gaagttcctggtccacaacg gagcgatctcggcacagta	Sentido Antisentido	77 nt	17
EP1	atggtggtgctgcatct cgctgcagggaggtagag	Sentido Antisentido	86 nt	28
EP2	cctggctatcatgaccatcac gttcattcatatagcaaaaatcgt	Sentido Antisentido	72 nt	68
EP3	tgatgtggagcgaccattt caggtgggaagaaatgcaa	Sentido Antisentido	98 nt	38
EP4	ctccctggtggtgctcat ggctgatataactggttgacga	Sentido Antisentido	69 nt	58
c-Fos	ctaccactcaccgcagact agggtccgtgcagaagtcct	Sentido Antisentido	72 nt	67

6.4. Estudios de transactivación del promotor Eag1 con la PGE₂

Para la investigación de los efectos de la PGE₂ sobre el promotor Eag1 humano, se utilizó un vector reportero previamente obtenido en nuestro laboratorio (datos no publicados). Este vector reportero (pGL4, Promega, E.E.U.U.) contiene 850 pb del promotor proximal del gen Eag1 humano ligado a la secuencia codificadora de la luciferasa de luciérnaga. Para fines de normalización de los resultados, utilizamos un plásmido que codifica para la luciferasa de *Renilla reniformis* bajo el control del promotor SV40. Estos plásmidos (o el plásmido vacío pGL4 como control negativo) fueron cotransfectados con el reactivo Fugene HD (Roche, Alemania) en células C33a cultivadas durante 24 h en cajas de 6 pozos a razón de 2×10^5 células/pozo.

Al siguiente día, las células se lavaron con solución salina y se agregaron los estímulos de PGE₂ 1 μ M y TC 10 ng/mL, usando medio DMEM HG suplementado con IBMX 200 μ M. Los estímulos se dejaron durante 24 horas. Después de este tiempo se retiró el medio, se agregaron 500 μ L/pozo de amortiguador de lisis pasiva 1X, se agitaron las muestras 1 h/250 rpm, para después extraer los sobrenadantes a los que se les realizaron los ensayos de luciferasa. Las actividades de las luciferasas de luciérnaga y de *Renilla* fueron determinadas mediante el sistema *Dual luciferase assay kit* (Promega, E.E.U.U.). Los resultados se expresaron como el cociente de las actividades de la luciferasa de luciérnaga y de *Renilla* y fueron normalizados con los valores obtenidos en el vehículo, al cual se le asignó un valor de 1.

6.5. Derivación de una sublínea C33a transfectante estable del receptor EP2

Para cumplir con los objetivos propuestos, en este trabajo fue necesaria la derivación de una sublínea C33a que sobreexpresara al receptor EP2 humano. Para ello, se utilizó la línea celular de cáncer de próstata PC3 (ATCC, E.E.U.U.), la cual presenta altos niveles de expresión del gen EP2. El RNA total y el DNAc de las células PC3 se obtuvieron como se describió previamente en los incisos 6.3.1 y 6.3.2. La secuencia codificadora completa del receptor EP2 humano de 1076 pb se obtuvo por PCR de punto final basado en una secuencia previamente descrita [100]. Los oligonucleótidos utilizados fueron: 5'-tcaaaggctcagctgtttact-3' y 5'-atgggcaatgcctccaatga-3' y la reacción de amplificación se realizó con una DNA polimerasa de alta fidelidad (GC-

RICH PCR System, Roche, Alemania). El programa de amplificación fue el siguiente: 95°C/3 min durante 1 ciclo; (95°C/ 30 s; 55°C/30 s; 72°C/1 min 25 s) durante 10 ciclos; (95°C/30 s; 55°C/30 s; 72°C/ 1 min 30 s) durante 20 ciclos y un ciclo de extensión final a 72°C durante 10 min. El producto de amplificación fue separado en gel de agarosa 1%, y la banda de 1076 pb fue extraída y purificada usando el kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, E.E.U.U.). El producto de PCR fue ligado en el vector de expresión pcDNA3.1/V5-His-Topo (Invitrogen, E.E.U.U, Figura 7), el cual posee un promotor del citomegalovirus y que confiere resistencia al antibiótico Geneticina o G418. Los plásmidos fueron propagados en *Escherichia coli* One Shot TOP10 (Invitrogen, E.E.U.U.), mediante transformación química y las bacterias portadoras de plásmidos fueron seleccionadas por la expresión funcional de la β -lactamasa. El DNA plasmídico de algunas colonias resistentes a la ampicilina se purificó y usando los oligonucleótidos de la tabla 4, se verificó la presencia y la direccionalidad del inserto.

Tabla 4. Oligonucleótidos para verificar la presencia y la dirección del inserto del DNAC de EP2 en el vector pcDNA3.1/V5-His-Topo.

Oligonucleótido	Secuencia
T7	5'-taatacgactcactataggg-3'
EP2R	5'-gcccgatggtaaacctcgcc-3'

El plásmido que tiene el inserto del DNAC de EP2 en la dirección correcta se denominó EV EP2 S y es el que se utilizó para la expresión del EP2. Por el contrario, se obtuvo un plásmido que contiene el inserto posicionado al revés con respecto al promotor CMV. Este vector se denominó EV EP2 AS y se utilizó como un control negativo de la expresión del receptor EP2. En ambos casos se verificó la secuencia de nucleótidos de cada inserto por secuenciación automática de DNA (Genetic Analyzer ABI PRISM 3100, Applied Biosystems, E.E.U.U.).

Los plásmidos EV EP2 (S y AS) se obtuvieron en gran escala mediante sistemas de maxipreparación basados en el método de lisis alcalina (PureYield Plasmid Maxiprep

System, Promega). Los plásmidos fueron cuantificados y con ellos se transfectaron por separado células C33a utilizando el reactivo Polyfect (Qiagen). Después de 48 h fue agregado el medio selectivo (DMEM alto en glucosa, SFB 5% suplementado con G418 600 µg/mL, Gibco, E.E.U.U.). El G418 es un aminoglucósido que inhibe la síntesis de proteínas y en este estudio se utilizó para eliminar las células C33a no transfectadas.

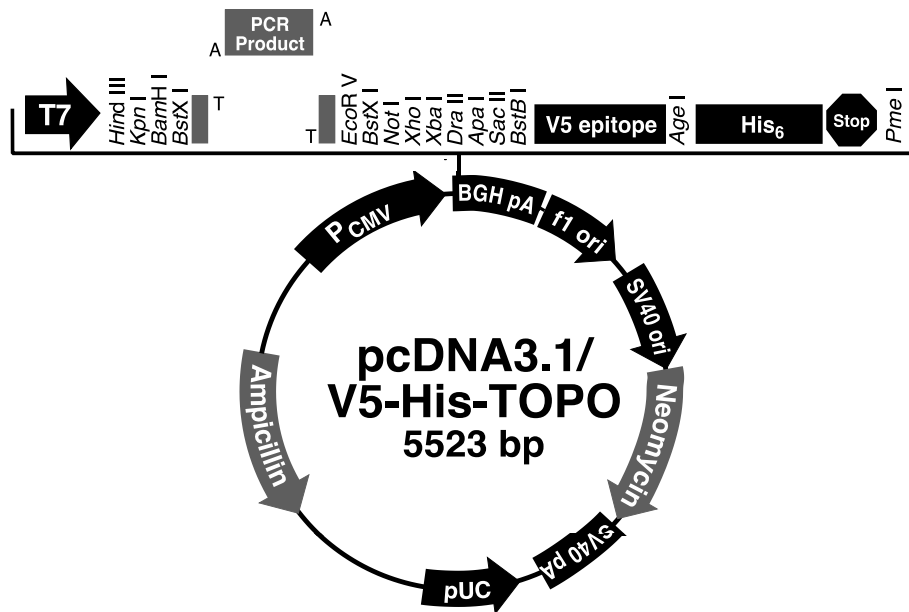


Figura 7. Mapa del vector de expresión pcDNA3.1/V5-His-Topo. El vector contiene: **P_{CMV}**, promotor-enhancer de citomegalovirus el cual facilita la alta expresión de proteínas recombinantes, región **BGH pA**, que da la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento de bovino y la secuencia de terminación de la transcripción, **f1 ori**, permite la replicación de DNA de cadena sencilla, región **SV40 ori**, permite la alta expresión de los marcadores de selección de **neomicina** (G418, selección de transfectantes estables en células de mamífero) y **ampicilina** (selección del vector en *E. coli*), **región SV40 pA**, aumenta la eficiencia en la terminación de la transcripción y poliadenilación del RNAm, y una región **pUC**, que permite un alto crecimiento y replicación en *E. coli*.

Las células transfectadas seleccionadas se sembraron en medio selectivo con G418 100 µg/mL, concentración a la cual se realizaron el resto de los experimentos. Durante la selección se obtuvieron dos clones: las células transfectadas con el vector de expresión *EV EP2 S*, a las que llamamos C33a EP2 S, así como células transfectadas con el vector no funcional, *EV EP2 AS*, a las que nombramos C33a EP2 AS. En las

células C33a EP2 (S y AS) se realizaron todos los experimentos que previamente se habían efectuado en la línea C33a parental.

6.6. Análisis de datos

Los datos se presentan como la media \pm la desviación estándar. El significado estadístico se determinó mediante las pruebas estadística *t* de Student y ANOVA. Las diferencias entre los tratamientos se consideraron significativas cuando el valor de $P < 0.05$.

7. Resultados

7.1. Los receptores EP2, EP3 y EP4 se expresan en las células C33a

En primer lugar se investigó si los genes de los receptores EP1, EP2, EP3 y EP4 se expresan en la línea celular C33a de cáncer cervical. Para ello, las células fueron tratadas con etanol como *vh* y PGE₂ 1 μM y la expresión génica de cada receptor se evaluó por RT-qPCR. La Figura 8 muestra que las células C33a expresan basalmente los RNAm de los receptores EP2 (A), EP3 (B) y EP4 (C).

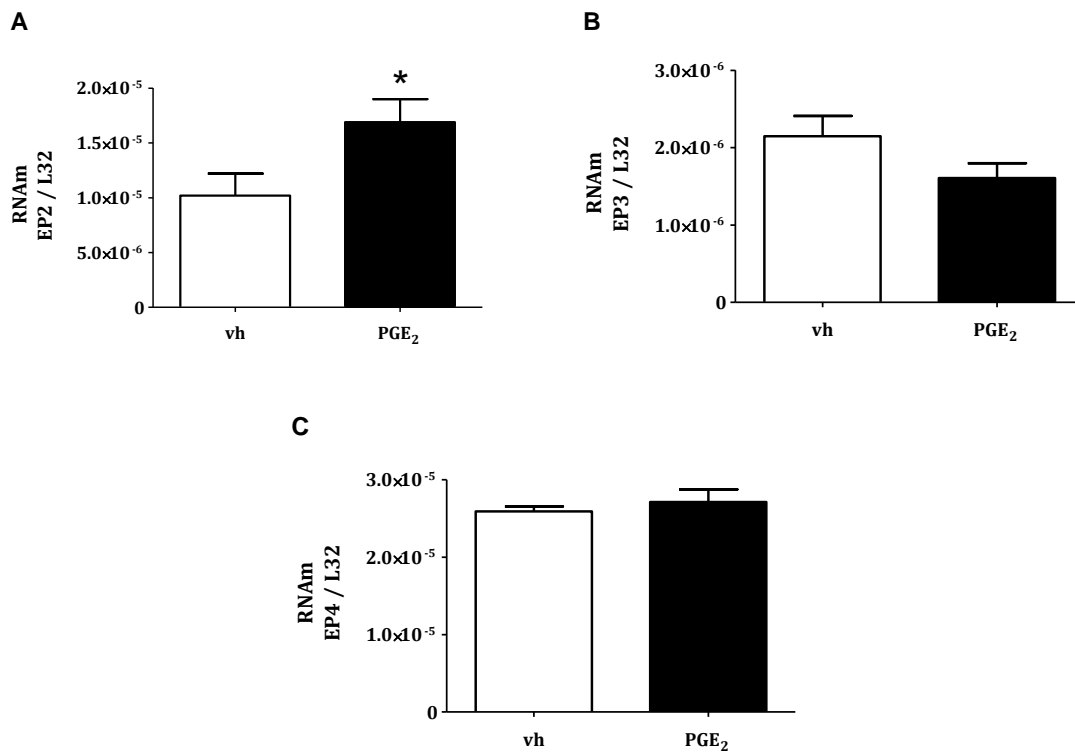


Figura 8. El RNAm del receptor EP2 se incrementa por la PGE₂ en las células C33a. La detección y cuantificación del RNAm de los diferentes receptores EP en células C33a se realizó por medio de RT-qPCR. Las células se estimularon con PGE₂ 1 μM y etanol como vehículo durante 24 horas. Cada barra muestra la expresión génica relativa de los receptores EP2 (A), EP3 (B) y EP4 (C) respecto al gen constitutivo L32. El RNAm del receptor EP1 no se detectó bajo ninguna condición experimental (datos no mostrados). Los datos son presentados como el promedio ± la desviación estándar de 3 diferentes experimentos. * $P < 0.05$ respecto al vehículo.

El RNAm del receptor EP1 no pudo ser detectado bajo ninguna condición experimental por lo que concluimos que la línea C33a no expresa de manera endógena dicho receptor. Cuando las células C33a se incubaron con PGE₂, se observó que la

expresión génica de EP2 se incrementó significativamente en un 70% (Figura 8A) mientras que no se detectaron cambios significativos con los receptores EP3 y EP4 (Figura 8 B y C). Aunque no se realizaron los experimentos para la detección de las proteínas por western blot, la detección de los RNAm de EP2, EP3 y EP4 nos proporcionó evidencia sólida de que las células C33a pueden ser un modelo para el estudio de procesos regulados por la PGE₂ porque expresa 3 de sus 4 receptores.

7.2. La PGE₂ incrementa la síntesis de AMPc en las células C33a

Los receptores EP2 y EP4 activan proteínas Gs, incrementando los niveles de AMPc intracelular. Puesto que la Figura 8 muestra que la PGE₂ incrementa la expresión del gen EP2 nos propusimos investigar si la PGE₂ promueve la generación de AMPc. Para ello se estimularon células C33a con etanol como vehículo, PGE₂ 1 μM y toxina del cólera (TC, 10 ng/mL) como control positivo de la producción de AMPc. Las incubaciones se realizaron durante 24 horas en presencia de IBMX (200 μM) como inhibidor de fosfodiesterasas, las cuales degradan el AMPc. Los resultados en la Figura 9 muestran que las células tratadas con el vehículo producen 0.65 ± 0.09 pmoles/mL de AMPc mientras que las células incubadas con PGE₂ y TC sintetizan significativamente más AMPc (1.29 ± 0.22 pmoles/mL y 18.81 ± 1.22 pmoles/mL, respectivamente). Con ello se corrobora que la PGE₂ incrementa la síntesis de AMPc en las células C33a.

7.3. La PGE₂ incrementa la proliferación de las células C33a

Para investigar si la PGE₂ incrementa la proliferación de las células C33a, se incubaron células con etanol como vehículo o con PGE₂ 1 μM en medio DMEM sin suero y suplementado con IBMX 200 μM para evitar la degradación del AMPc producido. En estas células se evaluó la expresión del gen Ki67, el cual incrementa su expresión en estados proliferativos [101]. Adicionalmente, determinamos la actividad metabólica relativa como una aproximación para investigar si la PGE₂ incrementa la proliferación de las células C33a. De acuerdo a lo esperado, la expresión génica de Ki67 y la actividad metabólica relativa fueron significativamente mayores tras el estímulo con la

PGE₂ (Figura 10 A y B), lo cual nos indicó que la PGE₂ es un agente mitogénico en este modelo de cáncer cervical.

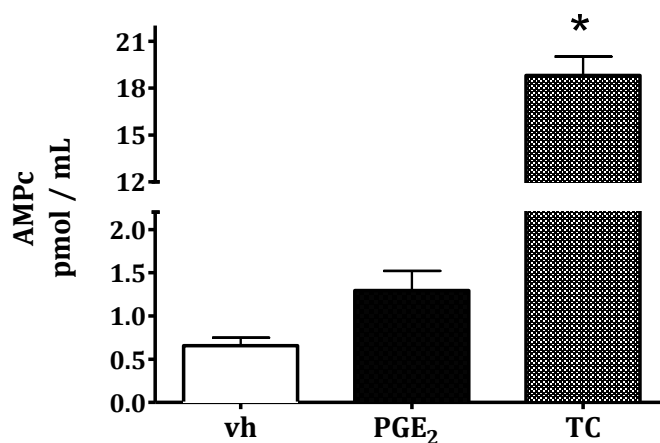


Figura 9. La PGE₂ incrementa la síntesis de AMPc en las células C33a. La cuantificación del AMPc total se realizó por medio de radioinmunoanálisis. Las células fueron tratadas con PGE₂ 1 μ M y etanol como vehículo. Se utilizó toxina del cólera (TC) 10 ng/mL como control positivo de la producción de AMPc. Los estímulos se dejaron durante 24 horas en presencia de IBMX 200 μ M. Los datos son presentados como el promedio \pm la desviación estándar de 3 diferentes experimentos. * $P < 0.05$ respecto al vehículo.

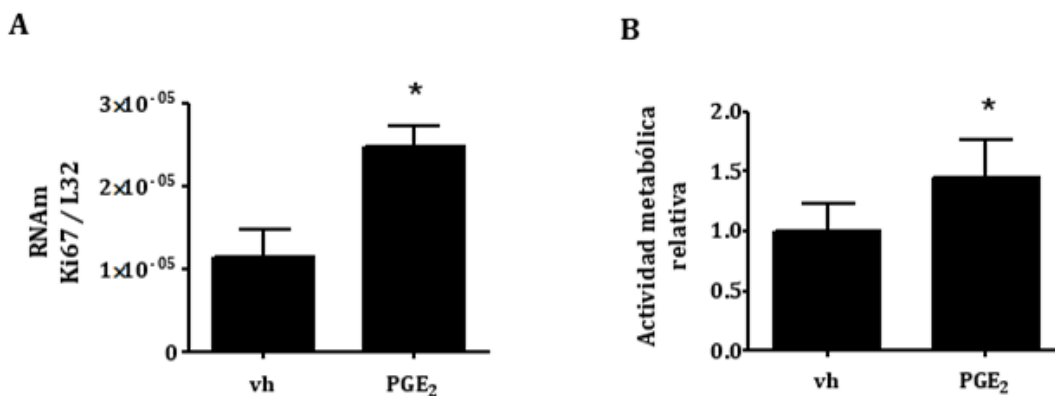


Figura 10. La PGE₂ incrementa la proliferación en células C33a. A) El RNAm del gen Ki67 fue cuantificado por medio de RT-qPCR. Las células se estimularon con PGE₂ 1 μ M y etanol como vehículo durante 24 horas. B) La actividad metabólica se determinó por medio de ensayos de proliferación celular con el sistema XTT. Las células estuvieron en contacto con PGE₂ 1 μ M durante 14 días en presencia de IBMX 200 μ M. Los datos son presentados como el promedio \pm la desviación estándar de 3 diferentes experimentos. * $P < 0.05$ respecto al vehículo.

7.4. La PGE₂ no tiene efecto sobre la expresión génica del canal Eag1 en las células C33a

La inducción del gen Ki-67 por la PGE₂ sugiere que este lípido podría incrementar la expresión de oncogenes importantes, entre los cuales seleccionamos a Eag1 y c-Fos. Estudios previos demostraron que c-Fos incrementa su expresión por la PGE₂ en modelos de cáncer de próstata [67]. Por otra parte, Eag1 es un marcador temprano de cáncer cervical que ha sido ampliamente estudiado por nuestro grupo de trabajo [92]. De manera sorprendente, los resultados de la Figura 11 A y 11 B indican que la PGE₂ no tiene efecto alguno sobre la expresión de c-Fos y Eag1, pero un dato interesante es que el aumento de los niveles de AMPc por la toxina del cólera, incrementa significativamente la expresión del RNAm de estos oncogenes. Estos datos sugieren que los niveles altos de AMPc promueven la transcripción de estos oncogenes por vías de señalización dependientes de este segundo mensajero. Adicionalmente, estos resultados indican que las células C33a contienen la maquinaria molecular necesaria para el estudio de genes regulados por la proteína cinasa A.

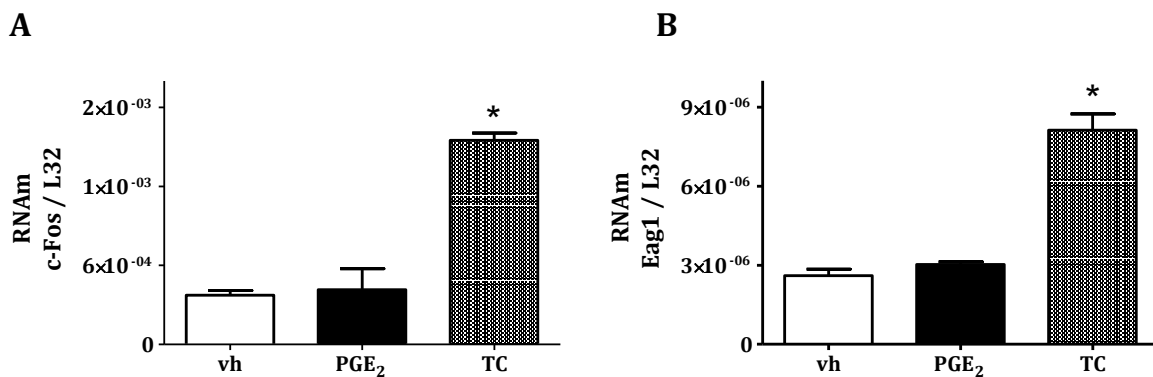


Figura 11. La PGE₂ no tiene efecto sobre la expresión génica del canal Eag1 en las células C33a. La cuantificación del RNAm de los genes c-Fos (A) y Eag1 (B) se realizó a través de RT-qPCR. Las células se estimularon con PGE₂ 1 μ M y etanol como vehículo, así como toxina del Cólera (TC) 10 ng/mL, en presencia de IBMX 200 μ M durante 24 horas. Los datos son presentados como el promedio \pm la desviación estándar de 3 diferentes experimentos. * $P < 0.05$ respecto al vehículo.

Tomando en cuenta lo anterior, nos propusimos la generación de una subclona de la línea C33a que expresara altos niveles del receptor EP2 mediante la selección de transfectantes estables que contuvieran un vector de expresión del receptor EP2 bajo el control de un promotor fuerte.

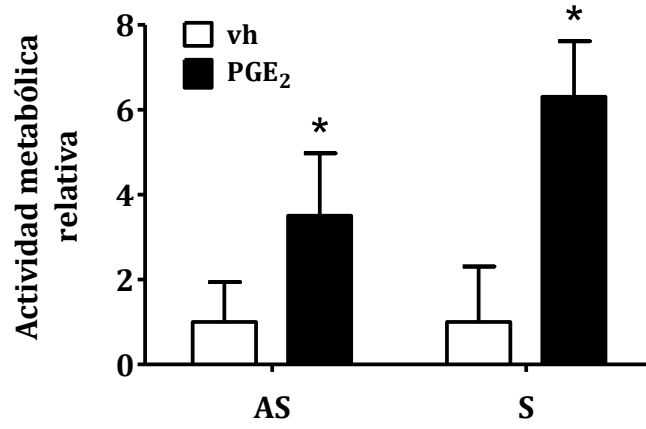
7.5. Derivación de una sublínea C33a transfectante estable para EP2

La información detallada de la generación de esta subclona se encuentra en la sección de “Material y métodos”. Baste mencionar que se obtuvieron dos subclonas de células C33a: a) una de ellas que es transfectante estable para un vector de expresión de EP2 y que denominamos C33a EP2 S y b) una clona transfectante estable que no codifica para proteína alguna y que denominamos C33a EP2 AS, la cual nos sirvió como un control negativo. La evaluación de la funcionalidad de cada subclona se llevó a cabo por RT-qPCR en donde se demostró que las células C33a EP2 S sobreexpresan el RNAm de EP2 (datos no mostrados).

7.6. La PGE₂ incrementa la proliferación celular, la síntesis de AMPc y la expresión de los oncogenes c-Fos y Eag1 en las células C33a transfectantes estables para EP2

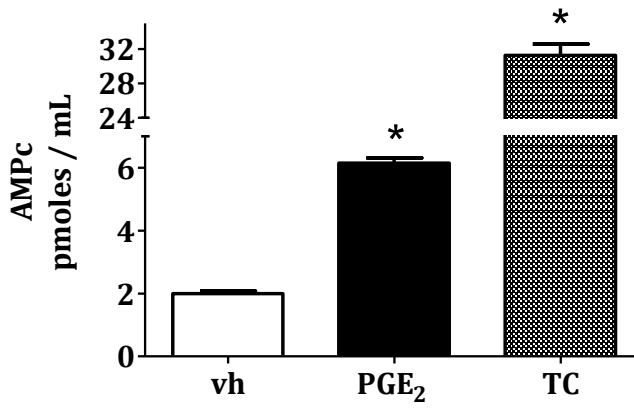
Para investigar si el receptor EP2 participa en el incremento de la proliferación de las células C33a por la PGE₂, las sublíneas C33a EP2 (S y AS) fueron incubadas en presencia de etanol como vehículo, PGE₂ 1 μM y con TC y se evaluó en ellas la producción de AMPc y la proliferación celular como se describió anteriormente. La Figura 12 A muestra que el tratamiento con PGE₂ incrementó la proliferación de ambas sublíneas. Es notable señalar que en las células C33a EP2 S se observó una tendencia no significativa hacia mostrar una mayor proliferación respecto a la clona que no sobreexpresa al receptor EP2 (Figura 12 A). En contraste, la mayor expresión del receptor EP2 se relacionó con la mayor producción de AMPc (Figuras 12 B y C). Estos resultados demuestran por un lado que el vector de expresión de EP2 utilizado es funcional y por otro lado, que parte de los efectos proliferativos de la PGE₂ son debidos a la activación del receptor EP2.

A



B

C33a EP2 S



C

C33a EP2 AS

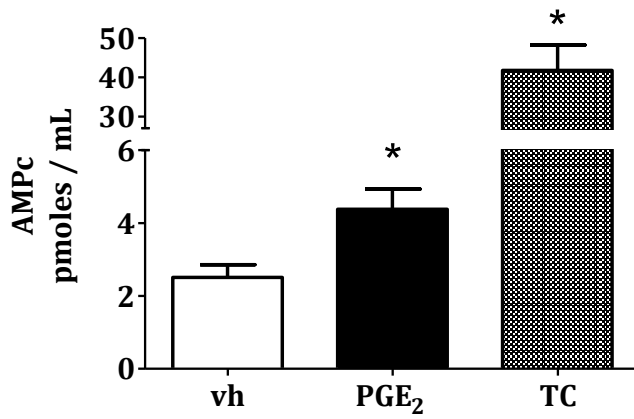


Figura 12 (página anterior). La PGE₂ induce la síntesis de AMPc e incrementa la proliferación en las células C33a EP2 S. (A) Las células C33a EP2 S (S) y C33a EP2 AS (AS) se incubaron con etanol como vehículo o PGE₂ 1 μM en presencia de G418 100 μg/mL e IBMX 200 μM durante 14 días y la actividad metabólica relativa se evaluó con el sistema XTT. Por otro lado, las células C33a EP2 S (B) y C33a EP2 AS (C) se incubaron durante 24 h con vehículo, PGE₂ o toxina del cólera (TC) 10 ng/mL y la cuantificación del AMPc intracelular se determinó por radioinmunoanálisis. Los datos son presentados como el promedio ± la desviación estándar de 3 diferentes experimentos. * $P < 0.05$ respecto al vehículo.

Considerando los resultados de la Figura 12, nos propusimos investigar si la mayor síntesis de AMPc debido a la mayor expresión del receptor EP2 es capaz de incrementar la expresión génica de los oncogenes c-Fos y Eag1. En efecto, la Figura 13 B y D muestra que la expresión génica de c-Fos y Eag1 se incrementa significativamente por la PGE₂ con respecto a los controles (Figura 13 A y C). En todos los casos, la TC incrementó la expresión de ambos oncogenes (Figura 13 A-D).

Dado que la expresión del Eag1 es considerada como un marcador temprano de cáncer cervical, nuestros estudios se enfocaron a la regulación de este canal de potasio a nivel de su promotor ya que los resultados obtenidos sugieren que el aumento de la concentración intracelular de AMPc vía el receptor EP2 activa los mecanismos que regulan la expresión de este oncogen.

7.7. El promotor del Eag1 se induce tras la activación del receptor EP2 por la PGE₂

Para probar si los efectos de la PGE₂ sobre la inducción del gen Eag1 requieren de la activación de su promotor, realizamos estudios de transactivación utilizando un plásmido reportero con el gen de la luciferasa bajo el control de la región promotora del gen Eag1 humano. Para ello, las células C33a EP2 S y AS fueron cotransfectadas con el vector reportero que contiene el promotor Eag1 y con un vector para la normalización de los resultados.

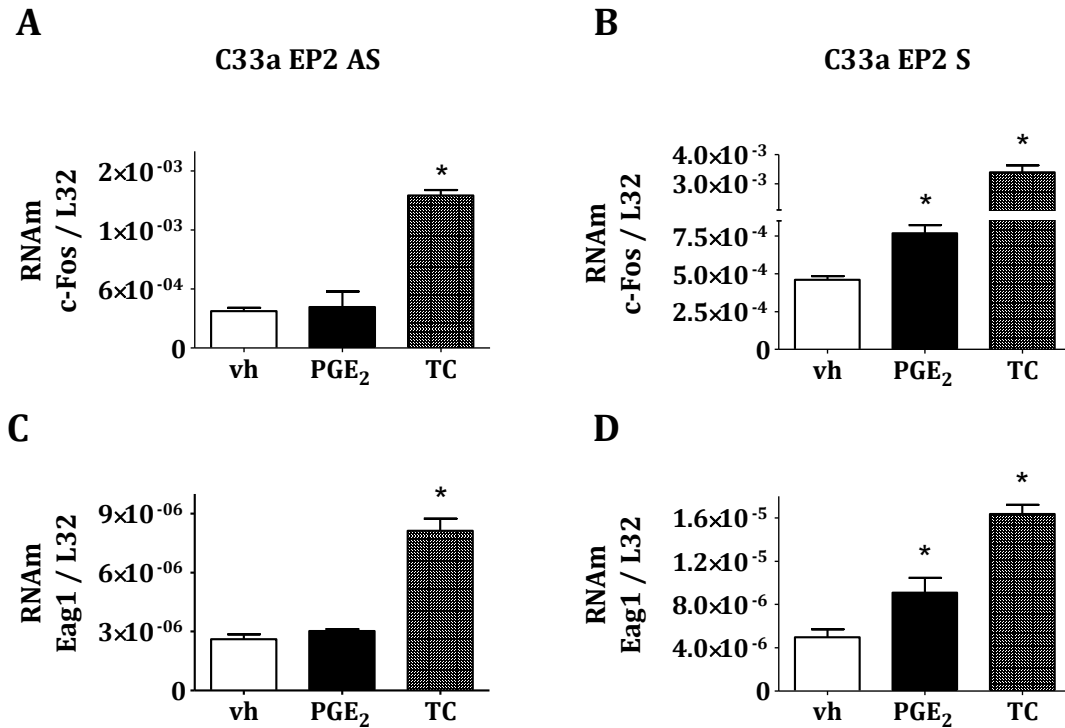


Figura 13. La PGE₂ incrementa la expresión de los oncogenes c-Fos y Eag1 en las células que sobreexpresan el receptor EP2. La cuantificación del RNAm de los genes c-Fos (A, B) y Eag1 (C, D) se realizó mediante RT-qPCR. Las células C33a EP2 (AS y S) se estimularon con PGE₂ 1 μM y etanol como vehículo, así como toxina del cólera (TC) 10 ng/mL durante 24 horas. Los experimentos se realizaron en presencia de IBMX 200 μM y G418 100 μg/mL. Los datos son presentados como el promedio ± la desviación estándar de 3 diferentes experimentos. * *P*<0.05 respecto al vehículo.

La Figura 14 revela que el promotor Eag1 se activa significativamente por la PGE₂ sólo en células que sobreexpresan el receptor EP2. De acuerdo a lo esperado, el efecto más pronunciado sobre la activación del promotor se observó cuando ambas sublíneas fueron incubadas con TC. Estos resultados indican que el efecto de la PGE₂ vía EP2 sobre el gen Eag1 es el incremento de la tasa de transcripción debido a un efecto sobre su región promotora.

Para investigar el mecanismo por el cual ocurre esta regulación consideramos que una vía clásica por la cual actúan moléculas de señalización que generan AMPc como segundo mensajero es la activación de la maquinaria de transcripción a través de secuencias de DNA conocidas como elementos de respuesta a AMPc (CRE) y la unión de una proteína a estas secuencias (CREB).

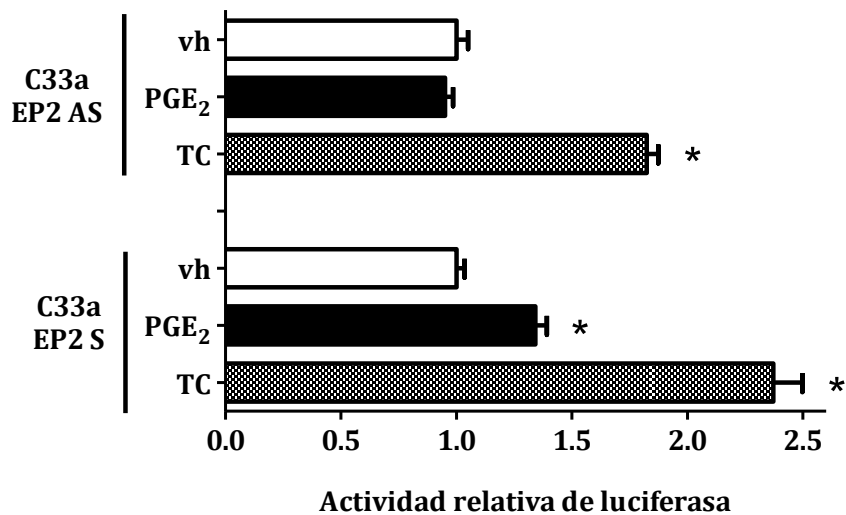


Figura 14. El promotor del gen *Eag1* se activa por la PGE₂ en células cervicales que sobreexpresan el receptor EP2. Las células C33a EP2 S y AS fueron cotransfectadas con el plásmido reportero que contiene 850 pb del promotor *Eag1* humano y el plásmido normalizador que codifica para la luciferasa de *Renilla* bajo el control del promotor SV40. Después de 24 h de transfección, las células se incubaron durante 24 h adicionales con etanol como vehículo, PGE₂ 1 μ M y toxina del cólera (TC) en medio con IBMX 200 μ M y G418 100 μ g/mL. Los resultados se expresan como actividad relativa de luciferasa. Los datos son presentados como el promedio \pm la desviación estándar de 3 diferentes experimentos. * $P < 0.05$ respecto al vehículo.

Un estudio bioinformático realizado en una secuencia de 850 pb del promotor proximal de *Eag1* con el programa MatInspector [102] reveló la presencia de 6 sitios de unión potenciales para CREB (Figura 15). Por tanto, resultó interesante investigar si los efectos inductivos de la PGE₂ vía la unión al receptor EP2 se deben a la activación del promotor *Eag1* mediante la proteína CREB.

7.8. La activación del promotor proximal del *Eag1* por la PGE₂ es un proceso mediado por la proteína CREB

Para investigar la participación de la proteína CREB en la regulación del promotor *Eag1* mediado por la PGE₂, utilizamos una estrategia que consistió en la sobreexpresión de la proteína CREB normal o una proteína CREB dominante negativa.

CTGTCCAGAAACCTTGGGTGTATGTGGTTCTTCCGTATAACCAGGGGTCAGCTGTAAAA
 CTA ACTGTATCCTCTGCACTACAGACTACCCTTCAAGCCAAAGCCAC **GGTTGCTTAA**TT
C/EBP
 AATGCTGCCCCTCTCC **TGAGC**ATTTCGCCCTTAGAGACAAGTCCACCCCTTTGATGTTTG
CRE
 TCAGGCAGTT **TGATA**CTGATCATAACAAACATCAGGAGCCTGCATTTGTGTCTACGGTA
CRE
 AAAACAACCCAAGACAACCTCTTCTGAAGCTGAATCTGCCAGTCACTCTAAATCTGCACT
 ATTGCAATACGACTTCATTAATTACT **GCTCA**AACACTGGCCTAGAATCAA **GGTGGGGCA**
CRE C/EBP
ACTTTCACTAGTCAGGCTAACCTTACAGGAAGGCAAGAAGGTGTTCCAGAGCCTCACA
 GGTCCCGGGGGCCCCGGCCTGAAACAGAGCAAAGGAAGAGAGTTACATCAGCACGCTCC
 CCTAAGACTTGTGGGGGTGAATCCGCCCTGAAAGCT **GCTCA**CAATGCCCTCCTCTCCA
CRE
 CCCAGCCCATGGCACATCC **TGAAC**ACATTTCCCGGC **TGAAC**CCAGAGGGTGGCGCTGCC
CRE CRE
 GTCCCAGCCTTGGTCCACGGCCGCCCGCCACTTCCCTGCCTCTGCGGGAGCCCCCAGC
 TTGGTCTCCCGCAGGCCGGCGGTGGGGCACGAGCCCGGTAGGGGGCGCCGCCGGCCAG
 GCGCCGCTGCTCCCTCCGCCACCCGGAGGCGGCTGCCGCTAGCCGAGGCCGGCGCGAG
=> TSS
TGCACTGCGAGGCGGGCCGCAGGGAGGGAGGCGCGAAGAGGGCGCGAGGGT**AGC**AGCCA
GAGGGA

Figura 15. El promotor proximal del gen Eag1 (0.85 kb) contiene potenciales elementos de respuesta a AMPc. Se realizó un análisis computacional sobre la región promotora del gen Eag1 con el programa MatInspector [102]. Se muestran resaltados 6 sitios CRE potenciales. TSS= sitio de inicio de la transcripción.

Para este propósito, utilizamos plásmidos de expresión que codifican para la proteína CREB nativa (CREB) o la proteína CREB133, una proteína mutante que presenta una sustitución de serina por alanina en la posición 133. Esta mutación impide la fosforilación por la proteína cinasa A evitando la transcripción.

Las células C33a EP2 S se cotransfectaron con los vectores de expresión para CREB o CREB133 junto con el vector reportero con el promotor Eag1 y el vector normalizador con la luciferasa de *Renilla* y posteriormente se realizaron los estímulos con vehículo, PGE₂ y TC. En la Figura 16 se observa que el promotor proximal Eag1 se activó significativamente por la PGE₂ y la TC únicamente en las células que sobreexpresan la

proteína CREB nativa. El uso de la dominante negativa de CREB mostró una actividad reducida del promotor Eag1 con todas las condiciones experimentales (Figura 16). En conjunto, los datos de la Figura 16 indican que la proteína CREB participa en la inducción del gen Eag1 mediado por la PGE₂.

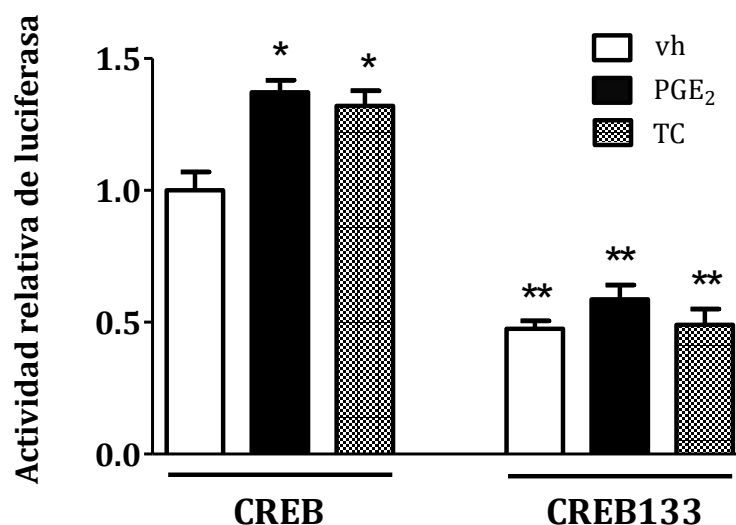


Figura 16. La activación del promotor proximal del Eag1 por la PGE₂ es mediado por la proteína CREB. Las células C33a EP2 S fueron cotransfectadas con: a) vectores de expresión de la proteína CREB nativa (CREB) o con un plásmido que codifica para una mutante dominante negativa (CREB133) y b) el vector reportero que contiene la región promotora del gen Eag1 y el vector normalizador que codifica para la luciferasa de *Renilla*. Después de 48 h de transfección, las células se incubaron durante 24 h adicionales con vehículo, PGE₂ 1 μ M y toxina del cólera 10 ng/mL en medio suplementado con IBMX 200 μ M y G418 100 μ g/mL. Los resultados se expresan como actividad relativa de luciferasa. Los datos son presentados como el promedio \pm la desviación estándar de 3 diferentes experimentos. * $P < 0.05$ respecto al vehículo (CREB); ** $P < 0.05$ respecto al mismo tratamiento (CREB).

8. Discusión

Los carcinomas cervicales son una de las principales causas de muerte en la población femenina [1]. La infección por los VPH de alto riesgo es el principal agente etiológico del desarrollo de carcinomas cervicales. Sin embargo, se han reconocido diversos factores promotores de este tipo de neoplasia.

Desde hace varios años se ha sugerido que el semen contiene factores promotores del cáncer cervical. En particular, diversos estudios han revelado que ese factor promotor del cáncer cervical corresponde a la PGE₂, la cual también participa en la fisiopatología de otro tipo de tumores como los gastrointestinales. En este trabajo realizado en un modelo de cáncer cervical encontramos que la PGE₂ al interactuar con el receptor EP2 expresado abundantemente, dispara una serie de eventos que conduce a la síntesis de AMPc, la activación de la proteína CREB y la inducción de un marcador temprano de cáncer cervical, el canal de potasio Eag1. De manera colateral, observamos que la PGE₂ incrementa la tasa de proliferación de las células C33a que sobreexpresan al receptor EP2.

En varios estudios se ha demostrado que el canal Eag1 se expresa abundantemente en diversos tipos de tumores. En el cérvix, este canal se expresa desde los estadios tempranos del desarrollo de esta neoplasia [93]. Nuestro grupo ha descrito que factores causales de este tipo de cáncer, como son las proteínas oncogénicas E6 y E7 de los VPH de alto riesgo y los estrógenos, incrementan la expresión del Eag1 en células de cáncer cervical. En este estudio utilizamos una línea celular carente de secuencias de VPH para evitar interferencias con las proteínas oncogénicas virales. Aún en este contexto, la PGE₂, en el rango de concentración micromolar, fue capaz de incrementar la tasa de expresión del Eag1 y la proliferación celular. Es de destacar que existen otros estudios que han concluido que la PGE₂, en concentraciones similares a las halladas en el semen, activa diversos blancos de interés en el cáncer como el factor de crecimiento del endotelio vascular [103], el receptor del factor de crecimiento epidérmico [104] y el oncogen c-Fos [67]. De manera interesante, la PGE₂ del plasma seminal promueve el cáncer cervical debido al incremento de la expresión tanto de sus receptores como de las enzimas COX encargadas de su síntesis como se ha

descrito en otro tipo de tumores como los colorrectales [26,103,105]. Todas estas evidencias señalan a la PGE₂ como un factor que participa en el inicio, promoción y desarrollo del cáncer.

Nuestros datos revelan que, bajo el estímulo de la PGE₂, se incrementa la expresión génica del receptor EP2 en las células C33a. Este receptor al ser activado por la PGE₂, promueve la proliferación de las células C33a, de manera semejante a lo descrito en otros modelos de cáncer cervical [106] y en carcinomas colorrectales [107]. Adicionalmente, la interacción EP2-PGE₂ promueve la angiogénesis y la progresión tumoral [108,109].

El aumento en la expresión del receptor EP2 y su activación por la PGE₂ en las células C33a resultó en la acumulación de AMPc. De manera sorprendente, la expresión génica del canal Eag1 no se incrementó bajo estas condiciones pero sí fue inducido con la toxina del cólera, la cual provocó una gran acumulación de AMPc. De manera interesante se observó este mismo patrón con c-Fos, el cual es un gen regulado por la PGE₂ a través de un mecanismo dependiente de AMPc [67]. Estos resultados indican que en las células C33a existe un umbral de AMPc para observar efectos genómicos dependientes de este segundo mensajero. Para superar este umbral, derivamos una línea que tiene una mayor tasa de producción de AMPc como resultado de la sobreexpresión del receptor EP2. En este modelo, observamos que tanto c-Fos como Eag1 incrementaron su expresión por efecto de la PGE₂. Nuestros datos sugieren que la unión de la PGE₂ al receptor EP2 activa a la adenilato ciclasa promoviendo la síntesis de AMPc. Este segundo mensajero activa a la PKA, la cual fosforila a la proteína CREB en su residuo de serina 133 [110]. La proteína CREB fosforilada en la serina 133 recluta una serie de coactivadores y moduladores transcripcionales indispensables para la regulación de la expresión génica dependiente de receptores generadores de AMPc. La proteína CREB es esencial en el control del crecimiento celular, la progresión a través del ciclo celular y la supervivencia celular y existen estudios que han mostrado que esta proteína participa en el desarrollo de diversos tipos de cáncer [111].

Entre los blancos de CREB hay genes que se encuentran relacionados al metabolismo, ciclo celular, supervivencia celular y reparación del DNA. El análisis computacional en la región proximal del promotor Eag1 reveló varios sitios CRE potenciales. Los resultados de este estudio con el uso de vectores de expresión revelaron que la proteína CREB participa en la regulación de la expresión del gen Eag1 por la PGE₂, probablemente por interacción con alguno de los sitios CRE potenciales presentes en su región promotora. Estos resultados son de gran interés porque implican que otros sistemas de señalización dependientes de AMPc a nivel de la membrana pueden incidir en la expresión de un gen cuya actividad promueve el desarrollo del cáncer. Hasta el momento no se conoce el mecanismo oncogénico del Eag1 y aparentemente la actividad conductora de potasio a través de este canal no es indispensable para su actividad neoplásica [95]. Se ha sugerido que parte de los efectos oncogénicos del canal Eag1 se deben a su interferencia con la homeostasis celular del oxígeno, particularmente a través de la activación del factor inducible por la hipoxia (HIF-1) que conduce a un estado proangiogénico secundario a la mayor síntesis del VEGF en los tumores [95].

Nuestros datos dan evidencia en parte, de la base molecular donde la PGE₂ controla la cascada de señalización que permite la expresión de varios oncogenes que regulan la progresión del cáncer cervical. En este trabajo también evaluamos la expresión del oncogén c-Fos como un control positivo de los efectos de la PGE₂. c-Fos al interactuar con c-Jun forma el factor de transcripción AP-1, el cual integra señales extracelulares en cambios en la expresión de genes que poseen secuencias de unión para este heterodímero [112]. El factor AP-1 es un regulador importante de la apoptosis y de la proliferación celular, razones por las cuales juega un papel en la fisiopatología del cáncer. En el cáncer cervical, el factor AP-1 participa en la regulación transcripcional de HPVs de alto riesgo considerados agentes causales de esta enfermedad [113]. Por ende, el incremento en la expresión de c-Fos observado en este trabajo y en estudios previos refuerzan el papel oncogénico de la PGE₂ en el cáncer cervical [67]. Por otra parte, en este trabajo observamos que la PGE₂ incrementó la expresión de Ki67, un gen ampliamente utilizado como marcador de proliferación celular [101]. En conjunto,

estas observaciones y la inducción del gen *Eag1* por la PGE_2 apoyan el concepto controversial que indica que el contacto prolongado del semen con el epitelio cervical es un factor que incrementa el riesgo del desarrollo de cáncer [18,103]. Esto implicaría que el bloqueo de la interacción entre la PGE_2 y su receptor EP2 puede ser una alternativa terapéutica en el tratamiento y la prevención del cáncer cervical.

9. Conclusiones

- La PGE₂ incrementa la expresión del gen Eag1 a través de un mecanismo de activación de su promotor que involucra a la proteína CREB.
- El aumento en la expresión de los oncogenes Eag1 y c-Fos es dependiente de la generación de AMPc por la interacción de la PGE₂ con el receptor EP2.
- La PGE₂ aumenta la expresión del gen Ki67 y la proliferación de las células C33a.

10. Bibliografía

- [1] F. Bray, J.S. Ren, E. Masuyer, J. Ferlay, Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008, *Int J Cancer*. 132 (2012) 1133-1145.
- [2] E.M. de Villiers, C. Fauquet, T.R. Broker, H.U. Bernard, H. zur Hausen, Classification of papillomaviruses, *Virology*. 324 (2004) 17-27.
- [3] J.M. Walboomers, M.V. Jacobs, M.M. Manos, F.X. Bosch, J.A. Kummer, K.V. Shah, P.J. Snijders, J. Peto, C.J. Meijer, N. Munoz, Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide, *J Pathol*. 189 (1999) 12-19.
- [4] D.M. Parkin, F. Bray, Chapter 2: The burden of HPV-related cancers, *Vaccine*. 24 Suppl 3 (2006) S3/11-25.
- [5] D.M. Harper, E.L. Franco, C.M. Wheeler, A.B. Moscicki, B. Romanowski, C.M. Roteli-Martins, D. Jenkins, A. Schuind, S.A. Costa Clemens, G. Dubin, Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial, *Lancet*. 367 (2006) 1247-1255.
- [6] C.A. Moody, L.A. Laimins, Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation, *Nat Rev Cancer*. 10 (2010) 550-560.
- [7] S. Cheng, D.C. Schmidt-Grimminger, T. Murrant, T.R. Broker, L.T. Chow, Differentiation-dependent up-regulation of the human papillomavirus E7 gene reactivates cellular DNA replication in suprabasal differentiated keratinocytes, *Genes Dev*. 9 (1995) 2335-2349.
- [8] H. zur Hausen, E.M. de Villiers, Human papillomaviruses, *Annu Rev Microbiol*. 48 (1994) 427-447.
- [9] C.B. Woodman, S.I. Collins, L.S. Young, The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues, *Nat Rev Cancer*. 7 (2007) 11-22.
- [10] M. Scheffner, B.A. Werness, J.M. Huibregtse, A.J. Levine, P.M. Howley, The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53, *Cell*. 63 (1990) 1129-1136.

- [11] N. Dyson, P.M. Howley, K. Munger, E. Harlow, The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product, *Science*. 243 (1989) 934-937.
- [12] D. DiMaio, D. Mattoon, Mechanisms of cell transformation by papillomavirus E5 proteins, *Oncogene*. 20 (2001) 7866-7873.
- [13] H. zur Hausen, Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account, *Virology*. 384 (2009) 260-265.
- [14] F. Denis, S. Hanz, S. Alain, [Clearance, persistence and recurrence of HPV infection], *Gynecol Obstet Fertil*. 36 (2008) 430-440.
- [15] J. Perez-Andino, C.B. Buck, K. Ribbeck, Adsorption of human papillomavirus 16 to live human sperm, *PLoS One*. 4 (2009) e5847.
- [16] D. Mortimer, *Practical Laboratory Andrology*, (1994)
- [17] R.W. Kelly, Immunosuppressive mechanisms in semen: implications for contraception, *Hum Reprod*. 10 (1995) 1686-1693.
- [18] X. Wang, J. Zhuang, K. Wu, R. Xu, M. Li, Y. Lu, Human semen: the biological basis of sexual behaviour to promote human papillomavirus infection and cervical cancer, *Med Hypotheses*. 74 (2010) 1015-1016.
- [19] J. Jeremias, S.S. Witkin, Effect of human seminal fluid on production of messenger ribonucleic acid for metalloproteinase 2 and metalloproteinase 9 in cervical epithelial carcinoma cells, *Am J Obstet Gynecol*. 181 (1999) 591-595.
- [20] L.M. Coussens, B. Fingleton, L.M. Matrisian, Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations, *Science*. 295 (2002) 2387-2392.
- [21] M. Libra, A. Scalisi, N. Vella, S. Clementi, R. Sorio, F. Stivala, D.A. Spandidos, C. Mazarino, Uterine cervical carcinoma: role of matrix metalloproteinases (review), *Int J Oncol*. 34 (2009) 897-903.
- [22] K. Wellings, M. Collumbien, E. Slaymaker, S. Singh, Z. Hodges, D. Patel, N. Bajos, Sexual behaviour in context: a global perspective, *Lancet*. 368 (2006) 1706-1728.
- [23] C.J. Hogewoning, M.C. Bleeker, A.J. van den Brule, F.J. Voorhorst, P.J. Snijders, J. Berkhof, P.J. Westenend, C.J. Meijer, Condom use promotes regression of cervical intraepithelial neoplasia and clearance of human papillomavirus: a randomized clinical trial, *Int J Cancer*. 107 (2003) 811-816.

- [24] M. Baniyash, Chronic inflammation, immunosuppression and cancer: new insights and outlook, *Semin Cancer Biol.* 16 (2006) 80-88.
- [25] D.J. Sharkey, A.M. Macpherson, K.P. Tremellen, S.A. Robertson, Seminal plasma differentially regulates inflammatory cytokine gene expression in human cervical and vaginal epithelial cells, *Mol Hum Reprod.* 13 (2007) 491-501.
- [26] K.J. Sales, A.A. Katz, R.P. Millar, H.N. Jabbour, Seminal plasma activates cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 receptor expression and signalling in cervical adenocarcinoma cells, *Mol Hum Reprod.* 8 (2002) 1065-1070.
- [27] M. Herfs, L. Herman, P. Hubert, F. Minner, M. Arafa, P. Roncarati, Y. Henrotin, J. Boniver, P. Delvenne, High expression of PGE2 enzymatic pathways in cervical (pre)neoplastic lesions and functional consequences for antigen-presenting cells, *Cancer Immunol Immunother.* 58 (2009) 603-614.
- [28] D. Wang, R.N. Dubois, Eicosanoids and cancer, *Nat Rev Cancer.* 10 (2010) 181-193.
- [29] C.L. Bos, D.J. Richel, T. Ritsema, M.P. Peppelenbosch, H.H. Versteeg, Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction, *Int J Biochem Cell Biol.* 36 (2004) 1187-1205.
- [30] D.G. Menter, R.N. Dubois, Prostaglandins in cancer cell adhesion, migration, and invasion, *Int J Cell Biol.* 2012 (2012) 723419.
- [31] C.C. Leslie, Regulation of the specific release of arachidonic acid by cytosolic phospholipase A2, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 70 (2004) 373-376.
- [32] K.C. Duggan, M.J. Walters, J. Musee, J.M. Harp, J.R. Kiefer, J.A. Oates, L.J. Marnett, Molecular basis for cyclooxygenase inhibition by the non-steroidal anti-inflammatory drug naproxen, *J Biol Chem.* 285 (2010) 34950-34959.
- [33] C.A. Rouzer, L.J. Marnett, Cyclooxygenases: structural and functional insights, *J Lipid Res.* 50 Suppl (2009) S29-34.
- [34] C.A. Ritter, G. Jedlitschky, H. Meyer zu Schwabedissen, M. Grube, K. Kock, H.K. Kroemer, Cellular export of drugs and signaling molecules by the ATP-binding cassette transporters MRP4 (ABCC4) and MRP5 (ABCC5), *Drug Metab Rev.* 37 (2005) 253-278.

- [35] V.R. Holla, M.G. Backlund, P. Yang, R.A. Newman, R.N. DuBois, Regulation of prostaglandin transporters in colorectal neoplasia, *Cancer Prev Res (Phila)*. 1 (2008) 93-99.
- [36] H.H. Tai, H. Cho, M. Tong, Y. Ding, NAD⁺-linked 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase: structure and biological functions, *Curr Pharm Des*. 12 (2006) 955-962.
- [37] I. Dey, M. Lejeune, K. Chadee, Prostaglandin E2 receptor distribution and function in the gastrointestinal tract, *Br J Pharmacol*. 149 (2006) 611-623.
- [38] M.A. Fortier, K. Krishnaswamy, G. Danyod, S. Boucher-Kovalik, P. Chapdalaine, A postgenomic integrated view of prostaglandins in reproduction: implications for other body systems, *J Physiol Pharmacol*. 59 Suppl 1 (2008) 65-89.
- [39] Y. Sugimoto, S. Narumiya, Prostaglandin E receptors, *J Biol Chem*. 282 (2007) 11613-11617.
- [40] K. Kabashima, D. Sakata, M. Nagamachi, Y. Miyachi, K. Inaba, S. Narumiya, Prostaglandin E2-EP4 signaling initiates skin immune responses by promoting migration and maturation of Langerhans cells, *Nat Med*. 9 (2003) 744-749.
- [41] H. Amano, I. Hayashi, H. Endo, H. Kitasato, S. Yamashina, T. Maruyama, M. Kobayashi, K. Satoh, M. Narita, Y. Sugimoto, T. Murata, H. Yoshimura, S. Narumiya, M. Majima, Host prostaglandin E(2)-EP3 signaling regulates tumor-associated angiogenesis and tumor growth, *J Exp Med*. 197 (2003) 221-232.
- [42] E. Segi, K. Haraguchi, Y. Sugimoto, M. Tsuji, H. Tsunekawa, S. Tamba, K. Tsuboi, S. Tanaka, A. Ichikawa, Expression of messenger RNA for prostaglandin E receptor subtypes EP4/EP2 and cyclooxygenase isozymes in mouse periovulatory follicles and oviducts during superovulation, *Biol Reprod*. 68 (2003) 804-811.
- [43] Y. Matsuoka, T. Furuyashiki, K. Yamada, T. Nagai, H. Bito, Y. Tanaka, S. Kitaoka, F. Ushikubi, T. Nabeshima, S. Narumiya, Prostaglandin E receptor EP1 controls impulsive behavior under stress, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102 (2005) 16066-16071.
- [44] M. Hambek, M. Baghi, J. Wagenblast, J. Schmitt, H. Baumann, R. Knecht, Inverse correlation between serum PGE2 and T classification in head and neck cancer, *Head Neck*. 29 (2007) 244-248.

- [45] H. Reinold, S. Ahmadi, U.B. Depner, B. Layh, C. Heindl, M. Hamza, A. Pahl, K. Brune, S. Narumiya, U. Muller, H.U. Zeilhofer, Spinal inflammatory hyperalgesia is mediated by prostaglandin E receptors of the EP2 subtype, *J Clin Invest.* 115 (2005) 673-679.
- [46] K. Yoshida, H. Oida, T. Kobayashi, T. Maruyama, M. Tanaka, T. Katayama, K. Yamaguchi, E. Segi, T. Tsuboyama, M. Matsushita, K. Ito, Y. Ito, Y. Sugimoto, F. Ushikubi, S. Ohuchida, K. Kondo, T. Nakamura, S. Narumiya, Stimulation of bone formation and prevention of bone loss by prostaglandin E EP4 receptor activation, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99 (2002) 4580-4585.
- [47] U. Yokoyama, S. Minamisawa, H. Quan, S. Ghatak, T. Akaike, E. Segi-Nishida, S. Iwasaki, M. Iwamoto, S. Misra, K. Tamura, H. Hori, S. Yokota, B.P. Toole, Y. Sugimoto, Y. Ishikawa, Chronic activation of the prostaglandin receptor EP4 promotes hyaluronan-mediated neointimal formation in the ductus arteriosus, *J Clin Invest.* 116 (2006) 3026-3034.
- [48] F. Ushikubi, E. Segi, Y. Sugimoto, T. Murata, T. Matsuoka, T. Kobayashi, H. Hizaki, K. Tuboi, M. Katsuyama, A. Ichikawa, T. Tanaka, N. Yoshida, S. Narumiya, Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3, *Nature.* 395 (1998) 281-284.
- [49] K. Takeuchi, H. Ukawa, O. Furukawa, S. Kawauchi, H. Araki, Y. Sugimoto, A. Ishikawa, F. Ushikubi, S. Narumiya, Prostaglandin E receptor subtypes involved in stimulation of gastroduodenal bicarbonate secretion in rats and mice, *J Physiol Pharmacol.* 50 (1999) 155-167.
- [50] B. Rigas, I.S. Goldman, L. Levine, Altered eicosanoid levels in human colon cancer, *J Lab Clin Med.* 122 (1993) 518-523.
- [51] D. Wang, R.N. Dubois, Cyclooxygenase-2: a potential target in breast cancer, *Semin Oncol.* 31 (2004) 64-73.
- [52] T.L. McLemore, W.C. Hubbard, C.L. Litterst, M.C. Liu, S. Miller, N.A. McMahon, J.C. Eggleston, M.R. Boyd, Profiles of prostaglandin biosynthesis in normal lung and tumor tissue from lung cancer patients, *Cancer Res.* 48 (1988) 3140-3147.
- [53] J. Zhou, T. Suzuki, A. Kovacic, R. Saito, Y. Miki, T. Ishida, T. Moriya, E.R. Simpson, H. Sasano, C.D. Clyne, Interactions between prostaglandin E(2), liver receptor homologue-1, and aromatase in breast cancer, *Cancer Res.* 65 (2005) 657-663.

- [54] D. Wang, H. Wang, Q. Shi, S. Katkuri, W. Walhi, B. Desvergne, S.K. Das, S.K. Dey, R.N. DuBois, Prostaglandin E(2) promotes colorectal adenoma growth via transactivation of the nuclear peroxisome proliferator-activated receptor delta, *Cancer Cell*. 6 (2004) 285-295.
- [55] H. Sheng, J. Shao, J.D. Morrow, R.D. Beauchamp, R.N. DuBois, Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells, *Cancer Res*. 58 (1998) 362-366.
- [56] B. Poligone, A.S. Baldwin, Positive and negative regulation of NF-kappaB by COX-2: roles of different prostaglandins, *J Biol Chem*. 276 (2001) 38658-38664.
- [57] M.G. Backlund, J.R. Mann, V.R. Holla, F.G. Buchanan, H.H. Tai, E.S. Musiek, G.L. Milne, S. Katkuri, R.N. DuBois, 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase is down-regulated in colorectal cancer, *J Biol Chem*. 280 (2005) 3217-3223.
- [58] I. Wolf, J. O'Kelly, T. Rubinek, M. Tong, A. Nguyen, B.T. Lin, H.H. Tai, B.Y. Karlan, H.P. Koeffler, 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase is a tumor suppressor of human breast cancer, *Cancer Res*. 66 (2006) 7818-7823.
- [59] A. Thiel, A. Ganesan, J. Mrena, S. Junnila, A. Nykanen, A. Hemmes, H.H. Tai, O. Monni, A. Kokkola, C. Haglund, T.V. Petrova, A. Ristimaki, 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase is down-regulated in gastric cancer, *Clin Cancer Res*. 15 (2009) 4572-4580.
- [60] G. Eibl, D. Bruemmer, Y. Okada, J.P. Duffy, R.E. Law, H.A. Reber, O.J. Hines, PGE(2) is generated by specific COX-2 activity and increases VEGF production in COX-2-expressing human pancreatic cancer cells, *Biochem Biophys Res Commun*. 306 (2003) 887-897.
- [61] M. Kamiyama, A. Pozzi, L. Yang, L.M. DeBusk, R.M. Breyer, P.C. Lin, EP2, a receptor for PGE2, regulates tumor angiogenesis through direct effects on endothelial cell motility and survival, *Oncogene*. 25 (2006) 7019-7028.
- [62] X. Wang, R.D. Klein, Prostaglandin E2 induces vascular endothelial growth factor secretion in prostate cancer cells through EP2 receptor-mediated cAMP pathway, *Mol Carcinog*. 46 (2007) 912-923.
- [63] K. Boniface, K.S. Bak-Jensen, Y. Li, W.M. Blumenschein, M.J. McGeachy, T.K. McClanahan, B.S. McKenzie, R.A. Kastelein, D.J. Cua, R. de Waal Malefyt, Prostaglandin

E2 regulates Th17 cell differentiation and function through cyclic AMP and EP2/EP4 receptor signaling, *J Exp Med.* 206 (2009) 535-548.

[64] Y.M. Sung, G. He, S.M. Fischer, Lack of expression of the EP2 but not EP3 receptor for prostaglandin E2 results in suppression of skin tumor development, *Cancer Res.* 65 (2005) 9304-9311.

[65] Y.M. Sung, G. He, D.H. Hwang, S.M. Fischer, Overexpression of the prostaglandin E2 receptor EP2 results in enhanced skin tumor development, *Oncogene.* 25 (2006) 5507-5516.

[66] H. Fujino, W. Xu, J.W. Regan, Prostaglandin E2 induced functional expression of early growth response factor-1 by EP4, but not EP2, prostanoid receptors via the phosphatidylinositol 3-kinase and extracellular signal-regulated kinases, *J Biol Chem.* 278 (2003) 12151-12156.

[67] Y. Chen, M. Hughes-Fulford, Prostaglandin E2 and the protein kinase A pathway mediate arachidonic acid induction of c-fos in human prostate cancer cells, *Br J Cancer.* 82 (2000) 2000-2006.

[68] F.M. Ashcroft, From molecule to malady, *Nature.* 440 (2006) 440-447.

[69] H. Wulff, N.A. Castle, L.A. Pardo, Voltage-gated potassium channels as therapeutic targets, *Nat Rev Drug Discov.* 8 (2009) 982-1001.

[70] W.D. Kaplan, W.E. Trout, 3rd, The behavior of four neurological mutants of *Drosophila*, *Genetics.* 61 (1969) 399-409.

[71] B. Ganetzky, C.F. Wu, *Drosophila* mutants with opposing effects on nerve excitability: genetic and spatial interactions in repetitive firing, *J Neurophysiol.* 47 (1982) 501-514.

[72] J. Ludwig, H. Terlau, F. Wunder, A. Bruggemann, L.A. Pardo, A. Marquardt, W. Stuhmer, O. Pongs, Functional expression of a rat homologue of the voltage gated ether-a-go-go potassium channel reveals differences in selectivity and activation kinetics between the *Drosophila* channel and its mammalian counterpart, *Embo J.* 13 (1994) 4451-4458.

[73] S. Frings, N. Brull, C. Dzeja, A. Angele, V. Hagen, U.B. Kaupp, A. Baumann, Characterization of ether-a-go-go channels present in photoreceptors reveals

similarity to IKx, a K⁺ current in rod inner segments, *J Gen Physiol.* 111 (1998) 583-599.

[74] T. Occhiodoro, L. Bernheim, J.H. Liu, P. Bijlenga, M. Sinnreich, C.R. Bader, J. Fischer-Lougheed, Cloning of a human ether-a-go-go potassium channel expressed in myoblasts at the onset of fusion, *FEBS Lett.* 434 (1998) 177-182.

[75] L.A. Pardo, D. del Camino, A. Sanchez, F. Alves, A. Bruggemann, S. Beckh, W. Stuhmer, Oncogenic potential of EAG K(+) channels, *Embo J.* 18 (1999) 5540-5547.

[76] B. Hemmerlein, R.M. Weseloh, F. Mello de Queiroz, H. Knotgen, A. Sanchez, M.E. Rubio, S. Martin, T. Schliephacke, M. Jenke, R. Heinz Joachim, W. Stuhmer, L.A. Pardo, Overexpression of Eag1 potassium channels in clinical tumours, *Mol Cancer.* 5 (2006) 41.

[77] L. Diaz, I. Ceja-Ochoa, I. Restrepo-Angulo, F. Larrea, E. Avila-Chavez, R. Garcia-Becerra, E. Borja-Cacho, D. Barrera, E. Ahumada, P. Gariglio, E. Alvarez-Rios, R. Ocadiz-Delgado, E. Garcia-Villa, E. Hernandez-Gallegos, I. Camacho-Arroyo, A. Morales, D. Ordaz-Rosado, E. Garcia-Latorre, J. Escamilla, L.C. Sanchez-Pena, M. Saqui-Salces, A. Gamboa-Dominguez, E. Vera, M. Uribe-Ramirez, J. Murbartian, C.S. Ortiz, C. Rivera-Guevara, A. De Vizcaya-Ruiz, J. Camacho, Estrogens and human papilloma virus oncogenes regulate human ether-a-go-go-1 potassium channel expression, *Cancer Res.* 69 (2009) 3300-3307.

[78] J. Warmke, R. Drysdale, B. Ganetzky, A distinct potassium channel polypeptide encoded by the *Drosophila* eag locus, *Science.* 252 (1991) 1560-1562.

[79] G. Yellen, The voltage-gated potassium channels and their relatives, *Nature.* 419 (2002) 35-42.

[80] C.K. Bauer, J.R. Schwarz, Physiology of EAG K⁺ channels, *J Membr Biol.* 182 (2001) 1-15.

[81] J. Ludwig, D. Owen, O. Pongs, Carboxy-terminal domain mediates assembly of the voltage-gated rat ether-a-go-go potassium channel, *Embo J.* 16 (1997) 6337-6345.

[82] N. Sahoo, R. Schonherr, T. Hoshi, S.H. Heinemann, Cysteines control the N- and C-linker-dependent gating of KCNH1 potassium channels, *Biochim Biophys Acta.* 1818 (2012) 1187-1195.

- [83] J. Camacho, A. Sanchez, W. Stuhmer, L.A. Pardo, Cytoskeletal interactions determine the electrophysiological properties of human EAG potassium channels, *Pflugers Arch.* 441 (2000) 167-174.
- [84] L.A. Pardo, A. Bruggemann, J. Camacho, W. Stuhmer, Cell cycle-related changes in the conducting properties of r-eag K⁺ channels, *J Cell Biol.* 143 (1998) 767-775.
- [85] A. Bruggemann, W. Stuhmer, L.A. Pardo, Mitosis-promoting factor-mediated suppression of a cloned delayed rectifier potassium channel expressed in *Xenopus* oocytes, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94 (1997) 537-542.
- [86] P. Bijlenga, T. Occhiodoro, J.H. Liu, C.R. Bader, L. Bernheim, J. Fischer-Lougheed, An ether -a-go-go K⁺ current, Ih-eag, contributes to the hyperpolarization of human fusion-competent myoblasts, *J Physiol.* 512 (Pt 2) (1998) 317-323.
- [87] J. Ousingsawat, M. Spitzner, S. Puntheeranurak, L. Terracciano, L. Tornillo, L. Bubendorf, K. Kunzelmann, R. Schreiber, Expression of voltage-gated potassium channels in human and mouse colonic carcinoma, *Clin Cancer Res.* 13 (2007) 824-831.
- [88] X.W. Ding, J.J. Yan, P. An, P. Lu, H.S. Luo, Aberrant expression of ether a go-go potassium channel in colorectal cancer patients and cell lines, *World J Gastroenterol.* 13 (2007) 1257-1261.
- [89] X.W. Ding, H.S. Luo, X. Jin, J.J. Yan, Y.W. Ai, Aberrant expression of Eag1 potassium channels in gastric cancer patients and cell lines, *Med Oncol.* 24 (2007) 345-350.
- [90] F. Mello de Queiroz, G. Suarez-Kurtz, W. Stuhmer, L.A. Pardo, Ether a go-go potassium channel expression in soft tissue sarcoma patients, *Mol Cancer.* 5 (2006) 42.
- [91] C. Weber, F. Mello de Queiroz, B.R. Downie, A. Suckow, W. Stuhmer, L.A. Pardo, Silencing the activity and proliferative properties of the human EagI Potassium Channel by RNA Interference, *J Biol Chem.* 281 (2006) 13030-13037.
- [92] L.M. Farias, D.B. Ocana, L. Diaz, F. Larrea, E. Avila-Chavez, A. Cadena, L.M. Hinojosa, G. Lara, L.A. Villanueva, C. Vargas, E. Hernandez-Gallegos, I. Camacho-Arroyo, A. Duenas-Gonzalez, E. Perez-Cardenas, L.A. Pardo, A. Morales, L. Taja-Chayeb, J. Escamilla, C. Sanchez-Pena, J. Camacho, Ether a go-go potassium channels as human cervical cancer markers, *Cancer Res.* 64 (2004) 6996-7001.

- [93] C.S. Ortiz, D. Montante-Montes, M. Saqui-Salces, L.M. Hinojosa, A. Gamboa-Dominguez, E. Hernandez-Gallegos, B. Martinez-Benitez, M. Del Rosario Solis-Pancoatl, E. Garcia-Villa, A. Ramirez, R. Aguilar-Guadarrama, P. Gariglio, L.A. Pardo, W. Stuhmer, J. Camacho, Eag1 potassium channels as markers of cervical dysplasia, *Oncol Rep.* 26 (2011) 1377-1383.
- [94] J. Roy, B. Vantol, E.A. Cowley, J. Blay, P. Linsdell, Pharmacological separation of hEAG and hERG K⁺ channel function in the human mammary carcinoma cell line MCF-7, *Oncol Rep.* 19 (2008) 1511-1516.
- [95] B.R. Downie, A. Sanchez, H. Knotgen, C. Contreras-Jurado, M. Gymnopoulos, C. Weber, W. Stuhmer, L.A. Pardo, Eag1 expression interferes with hypoxia homeostasis and induces angiogenesis in tumors, *J Biol Chem.* 283 (2008) 36234-36240.
- [96] R. Garcia-Becerra, L. Diaz, J. Camacho, D. Barrera, D. Ordaz-Rosado, A. Morales, C.S. Ortiz, E. Avila, E. Bargallo, M. Arrecillas, A. Halhali, F. Larrea, Calcitriol inhibits Ether-a go-go potassium channel expression and cell proliferation in human breast cancer cells, *Exp Cell Res.* 316 (2010) 433-442.
- [97] E. Avila, R. Garcia-Becerra, J.A. Rodriguez-Rasgado, L. Diaz, D. Ordaz-Rosado, U. Zuegel, A. Steinmeyer, D. Barrera, A. Halhali, F. Larrea, J. Camacho, Calcitriol down-regulates human ether a go-go 1 potassium channel expression in cervical cancer cells, *Anticancer Res.* 30 (2010) 2667-2672.
- [98] E. Avila, L. Diaz, D. Barrera, A. Halhali, I. Mendez, L. Gonzalez, U. Zuegel, A. Steinmeyer, F. Larrea, Regulation of Vitamin D hydroxylases gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and cyclic AMP in cultured human syncytiotrophoblasts, *J Steroid Biochem Mol Biol.* 103 (2007) 90-96.
- [99] P. Chomczynski, N. Sacchi, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal Biochem.* 162 (1987) 156-159.
- [100] S. An, J. Yang, M. Xia, E.J. Goetzl, Cloning and expression of the EP2 subtype of human receptors for prostaglandin E₂, *Biochem Biophys Res Commun.* 197 (1993) 263-270.
- [101] T. Scholzen, J. Gerdes, The Ki-67 protein: from the known and the unknown, *J Cell Physiol.* 182 (2000) 311-322.

- [102] K. Cartharius, K. Frech, K. Grote, B. Klocke, M. Haltmeier, A. Klingenhoff, M. Frisch, M. Bayerlein, T. Werner, MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites, *Bioinformatics*. 21 (2005) 2933-2942.
- [103] M. Muller, K.J. Sales, A.A. Katz, H.N. Jabbour, Seminal plasma promotes the expression of tumorigenic and angiogenic genes in cervical adenocarcinoma cells via the E-series prostanoid 4 receptor, *Endocrinology*. 147 (2006) 3356-3365.
- [104] S. Jain, G. Chakraborty, R. Raja, S. Kale, G.C. Kundu, Prostaglandin E2 regulates tumor angiogenesis in prostate cancer, *Cancer Res*. 68 (2008) 7750-7759.
- [105] K.J. Sales, S. Maudsley, H.N. Jabbour, Elevated prostaglandin EP2 receptor in endometrial adenocarcinoma cells promotes vascular endothelial growth factor expression via cyclic 3',5'-adenosine monophosphate-mediated transactivation of the epidermal growth factor receptor and extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling pathways, *Mol Endocrinol*. 18 (2004) 1533-1545.
- [106] H.N. Jabbour, S.A. Milne, A.R. Williams, R.A. Anderson, S.C. Boddy, Expression of COX-2 and PGE synthase and synthesis of PGE(2) in endometrial adenocarcinoma: a possible autocrine/paracrine regulation of neoplastic cell function via EP2/EP4 receptors, *Br J Cancer*. 85 (2001) 1023-1031.
- [107] A. Greenhough, H.J. Smartt, A.E. Moore, H.R. Roberts, A.C. Williams, C. Paraskeva, A. Kaidi, The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment, *Carcinogenesis*. 30 (2009) 377-386.
- [108] H. Seno, M. Oshima, T.O. Ishikawa, H. Oshima, K. Takaku, T. Chiba, S. Narumiya, M.M. Taketo, Cyclooxygenase 2- and prostaglandin E(2) receptor EP(2)-dependent angiogenesis in Apc(Delta716) mouse intestinal polyps, *Cancer Res*. 62 (2002) 506-511.
- [109] M. Sonoshita, K. Takaku, N. Sasaki, Y. Sugimoto, F. Ushikubi, S. Narumiya, M. Oshima, M.M. Taketo, Acceleration of intestinal polyposis through prostaglandin receptor EP2 in Apc(Delta 716) knockout mice, *Nat Med*. 7 (2001) 1048-1051.
- [110] H. Fujino, S. Salvi, J.W. Regan, Differential regulation of phosphorylation of the cAMP response element-binding protein after activation of EP2 and EP4 prostanoid receptors by prostaglandin E2, *Mol Pharmacol*. 68 (2005) 251-259.

- [111] B. Mayr, M. Montminy, Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB, *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2 (2001) 599-609.
- [112] W. Jochum, E. Passegue, E.F. Wagner, AP-1 in mouse development and tumorigenesis, *Oncogene.* 20 (2001) 2401-2412.
- [113] B.K. Prusty, B.C. Das, Constitutive activation of transcription factor AP-1 in cervical cancer and suppression of human papillomavirus (HPV) transcription and AP-1 activity in HeLa cells by curcumin, *Int J Cancer.* 113 (2005) 951-960.